

**OCENA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ
PRODUKTU POSTBIOTYCZNEGO
WZGLĘDEM NOWOTWOROWYCH KOMÓREK
NABŁONKA JELITOWEGO**



Data wykonania raportu:

Kwiecień 2026

Wykonawca badań:

Prof. dr hab. Daria Szymanowska

BADANY PRODUKT

- Suplement diety w płynie dla osób dorosłych z biofermentem postbiotycznym z matchy, marchwi, buraka i kurkumy, ekstraktem z owoców aceroli standaryzowanym na zawartość witaminy C i ekstraktem z kiełków brokuła. [09.02.2027]

I CHARAKTERYSTYKA PRODUKTU POSTBIOTYCZNEGO W ASPEKCIE JEGO WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Postbiotyki - stanowią złożoną grupę bioaktywnych metabolitów mikrobioty jelitowej, obejmujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), w tym maślan, propionian i octan, a także egzopolisacharydy, fragmenty ścian komórkowych, bakteriocyny oraz wtórne metabolity o właściwościach immunomodulacyjnych. Najlepiej scharakteryzowanym składnikiem o działaniu przeciwnowotworowym jest maślan, który działa jako inhibitor deacetylaz histonowych (HDAC), prowadząc do epigenetycznej regulacji ekspresji genów zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego i apoptozę. Wykazano, że maślan indukuje ekspresję p21 oraz p53, promując zatrzymanie cyklu komórkowego oraz programowaną śmierć komórek nowotworowych.

Na poziomie molekularnym postbiotyki modulują szlaki NF- κ B, STAT3 oraz PI3K/Akt, ograniczając przewlekły stan zapalny stanowiący jeden z kluczowych czynników kancerogenezy. Ponadto wpływają na mikrośrodowisko guza poprzez zwiększenie aktywności limfocytów T CD8⁺ oraz komórek NK, a także poprzez modulację odpowiedzi na immunoterapię. Dane kliniczne wskazują, że skład mikrobioty oraz poziom jej metabolitów korelują z odpowiedzią na leczenie przeciwnowotworowe, w tym terapię anty-PD-1.

Źródła literaturowe:

- Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2011 Mar 28;17(12):1519-28. doi: 10.3748/wjg.v17.i12.1519. PMID: 21472114; PMCID: PMC3070119.
- Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin JM, Morrison RM, Deblasio RN, Menna C, Ding Q, Pagliano O, Zidi B, Zhang S, Badger JH, Vetizou M, Cole AM, Fernandes MR, Prescott S, Costa RGF, Balaji AK, Morgun A, Vujkovic-Cvijin I, Wang H, Borhani AA, Schwartz MB, Dubner HM, Ernst SJ, Rose A, Najjar YG, Belkaid Y, Kirkwood JM, Trinchieri G, Zarour HM. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 2021 Feb 5;371(6529):595-602. doi: 10.1126/science.abf3363. PMID: 33542131; PMCID: PMC8097968.
- Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2017 Jan;19(1):29-41. doi: 10.1111/1462-2920.13589. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27928878.
- Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*. 2019 Mar 11;10:277. doi: 10.3389/fimmu.2019.00277. Erratum in: *Front Immunol*. 2019 Jun 28;10:1486. doi: 10.3389/fimmu.2019.01486. PMID: 30915065; PMCID: PMC6421268.
- Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillière R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, Fidelle M, Flament C, Poirier-Colame V, Opolon P, Klein C, Iribarren K, Mondragón L, Jacquilot N, Qu B, Ferrere G, Clémenson C, Mezquita L, Masip JR, Naltet C, Brosseau S, Kaderbhai C, Richard C, Rizvi H, Levenez F, Galleron N, Quinquis B, Pons N, Ryffel B, Minard-Colin V, Gonin P, Soria JC, Deutsch E, Lortet Y, Ghiringhelli F, Zalcman G, Goldwasser F, Escudier B, Hellmann MD, Eggermont A, Raoult D, Albiges L, Kroemer G, Zitvogel L. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):91-97. doi: 10.1126/science.aan3706. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29097494.

Matcha (*Camellia sinensis* L., sproszkowane liście) - matcha, będąca sproszkowaną formą liści zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L.), charakteryzuje się wyjątkowo wysoką zawartością katechin, w tym galusanu epigallokatechiny (EGCG), wynikającą z konsumpcji całego liścia, a nie jedynie naparu. EGCG wykazuje wielokierunkowe działanie przeciwnowotworowe, obejmujące modulację stresu oksydacyjnego, proliferacji komórkowej oraz angiogenezy.

Na poziomie molekularnym EGCG oddziałuje na kluczowe szlaki sygnałowe, w tym PI3K/Akt/mTOR, MAPK oraz Wnt/ β -katenina, prowadząc do zahamowania cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy poprzez aktywację kaspaz i regulację stosunku Bax/Bcl-2. Dodatkowo obserwuje się jego zdolność do hamowania aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2, MMP-9), co ogranicza inwazyjność i potencjał przerzutowy komórek nowotworowych.

EGCG wykazuje również właściwości epigenetyczne, wpływając na metylację DNA oraz ekspresję genów supresorowych, co stanowi istotny mechanizm w chemoprewencji nowotworów.

W badaniach klinicznych potwierdzono, że suplementacja ekstraktami zielonej herbaty bogatymi w EGCG może prowadzić do redukcji markerów proliferacji nowotworowej, stresu oksydacyjnego oraz modulacji biomarkerów związanych z rozwojem raka, szczególnie w kontekście raka prostaty i zmian przednowotworowych.

Źródła literaturowe:

- Chen D, Milacic V, Chen MS, Wan SB, Lam WH, Huo C, Landis-Piowar KR, Cui QC, Wali A, Chan TH, Dou QP. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol Histopathol*. 2008 Apr;23(4):487-96. doi: 10.14670/HH-23.487. PMID: 18228206; PMCID: PMC3763709.
- Fujiki H, Sueoka E, Watanabe T, Suganuma M. Primary cancer prevention by green tea, and tertiary cancer prevention by the combination of green tea catechins and anticancer compounds. *J Cancer Prev*. 2015 Mar;20(1):1-4. doi: 10.15430/JCP.2015.20.1.1. PMID: 25853098; PMCID: PMC4384709.
- Gan RY, Li HB, Sui ZQ, Corke H. Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018 Apr 13;58(6):924-941. doi: 10.1080/10408398.2016.1231168. Epub 2017 Jun 2. PMID: 27645804.
- Henning SM, Wang P, Said JW, Huang M, Grogan T, Elashoff D, Carpenter CL, Heber D, Aronson WJ. Randomized clinical trial of brewed green and black tea in men with prostate cancer prior to prostatectomy. *Prostate*. 2015 Apr 1;75(5):550-9. doi: 10.1002/pros.22943. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25545744; PMCID: PMC4334734.
- Nguyen MM, Ahmann FR, Nagle RB, Hsu CH, Tangrea JA, Parnes HL, Sokoloff MH, Gretzer MB, Chow HH. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of polyphenon E in prostate cancer patients before prostatectomy: evaluation of potential chemopreventive activities. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Feb;5(2):290-8. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0306. Epub 2011 Nov 1. PMID: 22044694; PMCID: PMC3273617.
- Sokary S, Zakaria Z, Bawadi H, Al-Asmakh M. Testing the Anticancer Effect of Matcha Using Zebrafish as an Animal Model. *Nutrients*. 2023 May 18;15(10):2369. doi: 10.3390/nu15102369. PMID: 37242252; PMCID: PMC10220593.

Korzeń marchwi (*Daucus carota* L.) - stanowi źródło bioaktywnych karotenoidów (β -karoten, luteina) oraz poliacetylenów, w szczególności falcarinolu i falcarindiolu, które wykazują istotną aktywność przeciwnowotworową w modelach *in vitro* i *in vivo*.

Poliacetyleny wpływają na regulację cyklu komórkowego poprzez modulację szlaków sygnałowych NF- κ B oraz MAPK, prowadząc do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Wykazano również ich zdolność do indukcji apoptozy poprzez aktywację kaspaz oraz zaburzenie równowagi Bax/Bcl-2.

Dodatkowo falcarinol wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie ekspresji mediatorów zapalnych, co ma istotne znaczenie w kontekście mikrośrodowiska nowotworowego. Karotenoidy obecne w marchwi pełnią funkcję antyoksydacyjną, ograniczając uszkodzenia DNA oraz stres oksydacyjny.

Źródła literaturowe:

- Chen H, Shao F, Zhang F, Miao Q. Association between dietary carrot intake and breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Sep;97(37):e12164. doi: 10.1097/MD.00000000000012164. PMID: 30212943; PMCID: PMC6156046.
- Deding U, Baatrup G, Christensen LP, Kobaek-Larsen M. Carrot Intake and Risk of Colorectal Cancer: A Prospective Cohort Study of 57,053 Danes. *Nutrients*. 2020 Jan 27;12(2):332. doi: 10.3390/nu12020332. PMID: 32012660; PMCID: PMC7071341.
- Deding U, Baatrup G, Kaalby L, Kobaek-Larsen M. Carrot Intake and Risk of Developing Cancer: A Prospective Cohort Study. *Nutrients*. 2023 Jan 29;15(3):678. doi: 10.3390/nu15030678. PMID: 36771385; PMCID: PMC9919376.
- Purup S, Larsen E, Christensen LP. Differential effects of falcarinol and related aliphatic C(17)-polyacetylenes on intestinal cell proliferation. *J Agric Food Chem*. 2009 Sep 23;57(18):8290-6. doi: 10.1021/jf901503a. PMID: 19694436; PMCID: PMC2745230.
- Xu H, Jiang H, Yang W, Song F, Yan S, Wang C, Fu W, Li H, Lyu C, Gan Y, Lu Z. Is carrot consumption associated with a decreased risk of lung cancer? A meta-analysis of observational studies. *Br J Nutr*. 2019 Sep 14;122(5):488-498. doi: 10.1017/S0007114519001107. Erratum in: *Br J Nutr*. 2020 Apr 14;123(7):840. doi: 10.1017/S0007114520000343. PMID: 31552816.
- Xu X, Zhu Y, Ye S, Li S, Xie B, Meng H, Wang S, Xia D. Association of Dietary Carrot Intake With Bladder Cancer Risk in a Prospective Cohort of 99,650 Individuals With 12.5 Years of Follow-Up. *Front Nutr*. 2021 Jul 26;8:669630. doi: 10.3389/fnut.2021.669630. PMID: 34381804; PMCID: PMC8349976.

Korzeń buraka (*Beta vulgaris* L.) - jest bogaty w betalainy, w tym betaninę, które wykazują silne właściwości przeciwnowotworowe poprzez modulację stresu oksydacyjnego oraz kluczowych szlaków sygnałowych komórek nowotworowych.

W badaniach *in vitro* wykazano, że betalainy indukują apoptozę poprzez aktywację kaspaz oraz zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych, prowadząc do ich selektywnej śmierci. Dodatkowo modulują szlak NF- κ B oraz PI3K/Akt, co skutkuje zahamowaniem proliferacji oraz ograniczeniem przeżywalności komórek.

Betalainy wykazują także działanie antyangiogenne oraz zdolność do regulacji enzymów detoksykacyjnych fazy II, wspierając mechanizmy obronne organizmu. Ich silne właściwości antyoksydacyjne ograniczają uszkodzenia lipidów, białek i DNA.

Źródła literaturowe:

- Dwijayanti A, Azizah NN, Erlina L, Kusmardi K, Ningsih SS, Fadilah F, Hashim NM. Beetroot (*Beta vulgaris*) potential in preventing colorectal cancer using in-silico analysis. *Narra J*. 2025 Aug;5(2):e1578. doi: 10.52225/narra.v5i2.1578. Epub 2025 May 2. PMID: 40951484; PMCID: PMC12425526.
- Imamura T, Isozumi N, Higashimura Y, Koga H, Segawa T, Desaka N, Takagi H, Matsumoto K, Ohki S, Mori M. Red-Beet Betalain Pigments Inhibit Amyloid- β Aggregation and Toxicity in Amyloid- β Expressing *Caenorhabditis elegans*. *Plant Foods Hum Nutr*. 2022 Mar;77(1):90-97. doi: 10.1007/s11130-022-00951-w. Epub 2022 Jan 27. PMID: 35088214.
- Lechner JF, Stoner GD. Red Beetroot and Betalains as Cancer Chemopreventative Agents. *Molecules*. 2019 Apr 23;24(8):1602. doi: 10.3390/molecules24081602. PMID: 31018549; PMCID: PMC6515411.
- Romero SA, Pavan ICB, Morelli AP, Mancini MCS, da Silva LGS, Fagundes I, Silva CHR, Ponte LGS, Rostagno MA, Bezerra RMN, Simabuco FM. Anticancer effects of root and beet leaf extracts (*Beta vulgaris* L.) in cervical cancer cells (HeLa). *Phytother Res*. 2021 Nov;35(11):6191-6203. doi: 10.1002/ptr.7255. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34494317.
- Swartz MC, Allen K, Deer RR, Lyons EJ, Swartz MD, Clifford T. A Narrative Review on the Potential of Red Beetroot as an Adjuvant Strategy to Counter Fatigue in Children with Cancer. *Nutrients*. 2019 Dec 7;11(12):3003. doi: 10.3390/nu11123003. PMID: 31817919; PMCID: PMC6949985.
- Tan ML, Hamid SBS. Beetroot as a Potential Functional Food for Cancer Chemoprevention, a Narrative Review. *J Cancer Prev*. 2021 Mar 30;26(1):1-17. doi: 10.15430/JCP.2021.26.1.1. PMID: 33842401; PMCID: PMC8020175.
- Yin Z, Yang Y, Guo T, Veeraraghavan VP, Wang X. Potential chemotherapeutic effect of betalain against human non-small cell lung cancer through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Environ Toxicol*. 2021 Jun;36(6):1011-1020. doi: 10.1002/tox.23100. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33522684.

Kłącze kurkumy (*Curcuma longa* L.) - głównym bioaktywnym składnikiem kurkumy jest kurkumina (diferuloiłometan), należąca do polifenoli z grupy kurkuminoidów, obok demetoksykurkuminy i bisdemetoksykurkuminy. Kurkumina wykazuje szerokie spektrum działania przeciwnowotworowego poprzez modulację licznych szlaków sygnałowych, w tym NF- κ B, STAT3, AP-1 oraz PI3K/Akt/mTOR. Kurkumina hamuje proliferację komórek nowotworowych poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego (G2/M), indukcję apoptozy poprzez aktywację kaspaz oraz zwiększenie ekspresji p53. Dodatkowo ogranicza angiogenezę poprzez hamowanie VEGF oraz migrację komórek poprzez wpływ na MMP. Badania kliniczne wskazują na potencjał kurkuminy jako adiuwantu terapii onkologicznej, szczególnie w nowotworach przewodu pokarmowego.

Źródła literaturowe:

- Howells LM, Iwuij COO, Irving GRB, Barber S, Walter H, Sidat Z, Griffin-Teall N, Singh R, Foreman N, Patel SR, Morgan B, Steward WP, Gescher A, Thomas AL, Brown K. Curcumin Combined with FOLFOLX Chemotherapy Is Safe and Tolerable in Patients with Metastatic Colorectal Cancer in a Randomized Phase IIa Trial. *J Nutr*. 2019 Jul 1;149(7):1133-1139. doi: 10.1093/jn/nxz029. PMID: 31132111; PMCID: PMC6602900.
- Kanai M, Yoshimura K, Asada M, Imaizumi A, Suzuki C, Matsumoto S, Nishimura T, Mori Y, Masui T, Kawaguchi Y, Yanagihara K, Yazumi S, Chiba T, Guha S, Aggarwal BB. A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Jul;68(1):157-64. doi: 10.1007/s00280-010-1470-2. Epub 2010 Sep 22. PMID: 20859741.
- Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Harsha C, Banik K, Gupta SC, Aggarwal BB. Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Jul 5;131(15):1781-1799. doi: 10.1042/CS20160935. PMID: 28679846.
- Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 27;20(5):1033. doi: 10.3390/ijms20051033. PMID: 30818786; PMCID: PMC6429287.

Ekstrakt z owoców aceroli (*Malpighia emarginata*) standaryzowany na zawartość witaminy C - ekstrakt z owoców aceroli (*Malpighia emarginata*), standaryzowany na zawartość kwasu L-askorbinowego, stanowi naturalne źródło witaminy C w obecności współwystępujących bioflawonoidów, polifenoli oraz karotenoidów, które mogą modulować jej biodostępność i aktywność biologiczną.

Kwas askorbinowy pełni funkcję hydrofilowego antyoksydantu, działając jako donor elektronów i bezpośrednio neutralizując reaktywne formy tlenu (ROS), takie jak anion ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy oraz nadtlenek wodoru. Mechanizm ten prowadzi do ograniczenia uszkodzeń DNA, peroksydacji lipidów oraz oksydacyjnej modyfikacji białek, odgrywających istotną rolę w inicjacji i progresji nowotworzenia.

Istotnym aspektem działania ekstraktu z aceroli jest jego zdolność do regeneracji innych antyoksydantów, w tym α -tokoferolu, poprzez redukcję jego formy rodnikowej, co prowadzi do synergistycznego wzmocnienia ochrony antyoksydacyjnej błon komórkowych. Obecność związków towarzyszących w ekstrakcie może dodatkowo stabilizować witaminę C oraz wpływać na jej aktywność biologiczną.

Kwas askorbinowy uczestniczy również w regulacji aktywności enzymów zależnych od Fe^{2+} i α -ketoglutaranu, w tym dioksygenaz TET, zaangażowanych w demetylację DNA i histonów, co wskazuje na jego potencjalny wpływ na epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów związanych z nowotworzeniem.

W badaniach klinicznych wykazano, że wyższe stężenia witaminy C w osoczu korelują z obniżeniem markerów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, takich jak CRP i IL-6, co ma znaczenie w kontekście mikrośrodowiska prokancerogennego.

Źródła literaturowe:

- Abdel-Latif MMM, Babar M, Kelleher D, Reynolds JV. A pilot study of the impact of Vitamin C supplementation with neoadjuvant chemoradiation on regulators of inflammation and carcinogenesis in esophageal cancer patients. J Cancer Res Ther. 2019 Jan-Mar;15(1):185-191. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_763_16. PMID: 30880777.
- Almeida IV, Düsman E, Heck MC, Pamphile JA, Lopes NB, Tonin LT, Vicentini VE. Cytotoxic and mutagenic effects of iodine-131 and radioprotection of acerola (*Malpighia glabra* L.) and beta-carotene in vitro. Genet Mol Res. 2013 Dec 10;12(4):6402-13. doi: 10.4238/2013.December.10.1. PMID: 24390989.
- de Souza VR, Brum MCM, Guimarães IDS, Dos Santos PF, do Amaral TO, Abreu JP, Passos T, Freitas-Silva O, Gimba ERP, Teodoro AJ. Amazon Fruits Inhibit Growth and Promote Pro-apoptotic Effects on Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. Biomolecules. 2019 Nov 6;9(11):707. doi: 10.3390/biom9110707. PMID: 31698710; PMCID: PMC6921045.
- Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radic Res. 2005 Jul;39(7):671-86. doi: 10.1080/10715760500104025. PMID: 16036346.
- Gillberg L, Ørskov AD, Nasif A, Ohtani H, Madaj Z, Hansen JW, Rapin N, Mogensen JB, Liu M, Dufva IH, Lykkesfeldt J, Hajkova P, Jones PA, Grønbæk K. Oral vitamin C supplementation to patients with myeloid cancer on azacitidine treatment: Normalization of plasma vitamin C induces epigenetic changes. Clin Epigenetics. 2019 Oct 17;11(1):143. doi: 10.1186/s13148-019-0739-5. PMID: 31623675; PMCID: PMC6798470.
- Jaffey M. Vitamin C and cancer: examination of the Vale of Leven trial results using broad inductive reasoning. Med Hypotheses. 1982 Jan;8(1):49-84. doi: 10.1016/0306-9877(82)90089-5. PMID: 7038410.
- Taira A, Palin K, Kuosmanen A, Välimäki N, Kuittinen O, Kuusmin O, Kaasinen E, Rajamäki K, Aaltonen LA. Vitamin C boosts DNA demethylation in TET2 germline mutation carriers. Clin Epigenetics. 2023 Jan 14;15(1):7. doi: 10.1186/s13148-022-01404-6. PMID: 36639817; PMCID: PMC9840351.

Ekstrakt z kiełków brokuła (*Brassica oleracea*) - kiełki brokuła stanowią jedno z najbogatszych naturalnych źródeł glukorafaniny - prekursora sulforafanu, izotiocyjanianu powstającego w wyniku hydrolizy enzymatycznej katalizowanej przez mirozynazę. Sulforafan jest związkiem o wysokiej biodostępności i udokumentowanej aktywności biologicznej, szczególnie w kontekście modulacji procesów detoksykacyjnych, stresu oksydacyjnego oraz regulacji epigenetycznej, co czyni go jednym z kluczowych fitozwiązków o potencjale chemoprewencyjnym.

Podstawowym mechanizmem działania sulforafanu jest aktywacja szlaku Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), będącego głównym regulatorem odpowiedzi antyoksydacyjnej komórki. Sulforafan oddziałuje z białkiem Keap1 poprzez modyfikację jego reszt cysteinowych, co prowadzi do uwolnienia Nrf2 i jego translokacji do jądra komórkowego. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne fazy II, takich jak NAD(P)H:chinon oksydoreduktaza 1 (NQO1), transferazy glutationowe (GST), heme oxygenase-1 (HO-1) oraz UDP-glukuronozylotransferazy (UGT). Mechanizm ten prowadzi do zwiększenia zdolności komórki do neutralizacji ksenobiotyków i reaktywnych metabolitów kancerogenów, ograniczając inicjację nowotworzenia.

Równolegle sulforafan wykazuje zdolność do modulacji mechanizmów epigenetycznych poprzez hamowanie aktywności deacetylaz histonowych (HDAC), co skutkuje zwiększoną acetylacją histonów i reaktywacją genów supresorowych nowotworów, takich jak p21 oraz Bax. Dodatkowo wykazano wpływ sulforafanu na metylację DNA poprzez modulację aktywności DNMT, co może prowadzić do odwracalnej regulacji ekspresji genów zaangażowanych w procesy proliferacji i apoptozy. Sulforafan oddziałuje również na kluczowe szlaki sygnałowe związane z progresją nowotworów, w tym NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR oraz MAPK, prowadząc do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych, indukcji apoptozy oraz ograniczenia angiogenezy poprzez obniżenie ekspresji VEGF. Wykazano także jego zdolność do wpływu na populację komórek macierzystych nowotworu (cancer stem cells), co ma istotne znaczenie w kontekście zapobiegania nawrotom choroby.

Istotnym aspektem działania sulforafanu jest jego wpływ na metabolizm kancerogenów. Poprzez indukcję enzymów fazy II oraz jednocześnie hamowanie enzymów fazy I (np. CYP450), sulforafan zmniejsza bioaktywację prokancerogenów, jednocześnie zwiększając ich eliminację z organizmu.

Mechanizm ten został potwierdzony w badaniach klinicznych, w których spożycie napojów zawierających ekstrakt z kiełków brokuła prowadziło do zwiększonego wydalania metabolitów benzenu i akroleiny, co wskazuje na nasilone procesy detoksykacyjne.

Dane kliniczne potwierdzają również wpływ sulforafanu na biomarkery stresu oksydacyjnego i ekspresję genów związanych z odpowiedzią antyoksydacyjną. W badaniach interwencyjnych wykazano zwiększenie ekspresji NQO1 i GST oraz obniżenie markerów uszkodzeń oksydacyjnych DNA, takich jak 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG). Dodatkowo obserwowano modulację markerów zapalnych, co wskazuje na wpływ sulforafanu na mikrośrodowisko sprzyjające kancerogenezie.

Źródła literaturowe:

- Egner PA, Chen JG, Zarth AT, Ng DK, Wang JB, Kensler KH, Jacobson LP, Muñoz A, Johnson JL, Groopman JD, Fahey JW, Talalay P, Zhu J, Chen TY, Qian GS, Carmella SG, Hecht SS, Kensler TW. Rapid and sustainable detoxication of airborne pollutants by broccoli sprout beverage: results of a randomized clinical trial in China. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014 Aug;7(8):813-823. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0103. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24913818; PMCID: PMC4125483.
- Kaufman-Szymczyk A, Majewski G, Lubecka-Pietruszewska K, Fabianowska-Majewska K. The Role of Sulforaphane in Epigenetic Mechanisms, Including Interdependence between Histone Modification and DNA Methylation. *Int J Mol Sci*. 2015 Dec 12;16(12):29732-43. doi: 10.3390/ijms161226195. PMID: 26703571; PMCID: PMC4691138.
- Kensler TW, Ng D, Carmella SG, Chen M, Jacobson LP, Muñoz A, Egner PA, Chen JG, Qian GS, Chen TY, Fahey JW, Talalay P, Groopman JD, Yuan JM, Hecht SS. Modulation of the metabolism of airborne pollutants by glucoraphanin-rich and sulforaphane-rich broccoli sprout beverages in Qidong, China. *Carcinogenesis*. 2012 Jan;33(1):101-7. doi: 10.1093/carcin/bgr229. Epub 2011 Nov 1. Erratum in: *Carcinogenesis*. 2012 Mar;33(3):722. PMID: 22045030; PMCID: PMC3276337.
- Tortorella SM, Royce SG, Licciardi PV, Karagiannis TC. Dietary Sulforaphane in Cancer Chemoprevention: The Role of Epigenetic Regulation and HDAC Inhibition. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Jun 1;22(16):1382-424. doi: 10.1089/ars.2014.6097. Epub 2014 Dec 19. PMID: 25364882; PMCID: PMC4432495.
- Zhang Y, Callaway EC. High cellular accumulation of sulforaphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. *Biochem J*. 2002 May 15;364(Pt 1):301-7. doi: 10.1042/bj3640301. PMID: 11988104; PMCID: PMC1222573.
- Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 12;91(8):3147-50. doi: 10.1073/pnas.91.8.3147. PMID: 8159717; PMCID: PMC43532.

II PRZEGLĄD STANU WIEDZY W ASPEKCIE PROCESU KANCEROGENEZY

Probiotyki jako "fabryki" metabolitów (Er et al., 2015)

Publikacja Er et al., 2015 wskazuje, że żywe bakterie probiotyczne to tylko połowa sukcesu. Badacze skupili się na produktach ich metabolizmu wydzielanych do płynu hodowlanego. Autorzy wskazali, że nawet same związki wydzielane do podłoża hodowlanego przez gatunki *Lactobacillus plantarum* czy *Weissella confusa* wystarczą, by zahamować cykl życiowy komórki nowotworowej. Prawdopodobnie za ten mechanizm odpowiadają kwasy organiczne, peptydy i bakteriocyny, które to molekuły wykazują cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych.

Transformacja wewnątrz jelit (Tomczyk et al., 2018)

Publikacja opisuje wpływ eksudatów z fasoli na mechanizm cytotoksyczności wobec komórek CaCo2 (linia komórek nowotworowych jelita grubego). Autorzy wykazali, że potencjał przeciwnowotworowy eksudatu z fasoli wzrasta niemal 30-krotnie, gdy zostanie on poddany biokonwersji przez bakterie jelitowe. Bakterie zasiedlające przewód pokarmowy uruchamiają mechanizm odcięcia cząsteczki cukru od flawonoidów (deglikozylacja), zamieniając je w formy "agresywne" wobec komórek nowotworowych. Warto wskazać, że matryce spożywcze bogate w polifenole działają jak tarcza ochronna wobec komórek jelita poprzez redukcję wpływu stresu oksydacyjnego.

Precyzyjne działania flawonoidów (Katrin Sak, 2014)

Praca dotyczy aspektu personalizacji związków aktywnych wobec komórek nowotworowych. Autorzy postawili hipotezę, że nie istnieje uniwersalny zestaw flawonoidów cytotoksycznych wobec każdego typu nowotworu. Przykładowo luteolina i apigenina to molekuły aktywne wobec raka szyjki macicy. Kwercetyna wykazuje największą aktywność wobec nowotworów skóry, głównie czerniaka. Natomiast kemferol jest najskuteczniejszy w prewencji raka jajnika. Autorka wskazuje również, że koncentracja flawonoidów we krwi jest zbyt niska aby zahamować proces nowotworzenia. Jednakże jelito grube, miejsce aktywności probiotyków i obecność resztek pokarmowych to obszar, w którym koncentracja flawonoidów jest lokalnie najwyższa.

Warto wskazać, że flawonoidy stanowią istotny łącznik między dietą a prewencją chorób przewlekłych. Analiza specyficzności działania najczęstszych flawonoidów dietetycznych względem różnych linii komórkowych nowotworów złośliwych, wskazuje na różnice w wrażliwości tkanek w zależności od struktury chemicznej związku i typu nowotworu. Wyróżniamy kluczowe grupy flawonoidów:

- 1. Flawonole:** kwercetyna (cebula, jabłka), kemferol (brokuły, herbata), myricetyna (owoce jagodowe)
- 2. Flawony:** apigenina (pietruszka, rumianek), luteolina (seler, papryka), chryzyna (miód, propolis)
- 3. Flawanony:** naringenina i hesperetyna (owoce cytrusowe)
- 4. Antocyjanidyny i izoflawonoidy**

Flawonoidy modulują liczne ścieżki metaboliczne komórek nowotworowych poprzez:

- 1. Indukcję apoptozy:** aktywacja kaspaz i zmiana stosunku białek pro- i antyapoptotycznych (np. Bax/Bcl-2).
- 2. STOP cyklu komórkowego:** hamowanie progresji w fazach G1/S lub G2/M poprzez modulację cyklin i kinaz zależnych od cyklin (CDK).
- 3. Działanie prooksydacyjne:** w przeciwieństwie do powszechnie znanych właściwości antyoksydacyjnych, w komórkach nowotworowych flawonoidy mogą zwiększać poziom reaktywnych form tlenu (ROS), co prowadzi do selektywnej śmierci komórek nowotworowych.
- 4. Inhibicję angiogenezy:** ograniczanie zdolności guza do tworzenia naczyń krwionośnych i migracji.

Badania wielu autorów wykazały, że flawonoidy wykazują specyficzność tkankową. Ważnym parametrem wskazującym na poziom „agresji” danej substancji jest wartość IC50 (stężenie hamujące wzrost o 50%).

W przypadku układu pokarmowego, komórki okrężnicy i wątroby wykazują duże wahania w reakcji, co wiąże się z ekspozycją na różnorodne metabolity powstające podczas trawienia. Luteolina jest wskazywana jako obiecujący związek w leczeniu raka żołądka. W wypadku nowotworów hormonozależnych, apigenina i luteolina są skuteczne zarówno w nowotworach ER-dodatnich, jak i ujemnych, choć apigenina wykazuje nieco wyższą potęgę wobec linii ER+ (nowotwory piersi). Flawonole (kwercetyna, kemferol) działają silniej na komórki zależne od androgenów (AR+). W zaawansowanych stadiach (AR-) skuteczniejsze mogą być naringenina i apigenina (nowotwór prostaty). Komórki białaczkowe są zazwyczaj bardziej wrażliwe na flawonoidy niż guzy lite. Flawonole aglikonowe (np. kwercetyna) wykazują silniejsze działanie wobec linii mieloidalnych niż limfoidalnych. Apigenina, chryzyna i luteolina mają bardzo dobre perspektywy jako środki przeciwnowotworowe w raku szyjki macicy. Kemferol wykazał w badaniach epidemiologicznych zdolność do redukcji ryzyka raka jajnika o 40%. Reasumując, wiedza o specyficznych efektach działania poszczególnych flawonoidów może być wykorzystana w chemoprewencji personalizowanej (dobór diety do indywidualnego ryzyka genetycznego).

BADANIA

Cel badań:

Celem badań była ocena właściwości cytotoksycznych oraz genotoksycznych preparatu postbiotycznego po dezaktywacji komórek bakterii probiotycznych wobec nowotworowych linii komórkowych nabłonka jelitowego Caco-2. W celu odwzorowania procesów zachodzących *in vivo*, badany materiał poddano symulowanemu trawieniu w warunkach *in vitro*, z uwzględnieniem pasażu przez przewód pokarmowy oraz oddziaływania mikrobioty jelitowej. Potencjał cytotoksyczny produktu, zarówno przed, jak i po procesie trawienia, analizowano poprzez oznaczenie kinetyki proliferacji komórek metodą hemocytometryczną oraz ocenę przeżywalności testem MTT.

Jednocześnie badano integralność DNA komórek nabłonka jelitowego z wykorzystaniem testu kometowego pod wpływem produktu. Badano również wariant stresu oksydacyjnego.

Metodologia badawcza:

Hodowla komórkowa

Linie komórkową Caco-2 i HT-29 MTX uzyskano z Europejskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ECACC). Komórki hodowano w plastikowych kolbach do hodowli komórkowej w podłożu Dulbecco's Modified Eagle's Medium uzupełnionym o 3,7 g/l NaHCO₃, 10% (v/v) inaktywowanej cieplnie surowicy płodowej bydlęcej (FBS), 1% (v/v) roztworu nieistotnych aminokwasów, 1% (v/v) L-glutaminy, 100 IU/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Komórki rutynowo utrzymywano poprzez regularne pasażowanie. W eksperymentach cytotoksycznych i transportowych komórki wykorzystywano między 20. a 40. pasażem. Medium hodowlane wymieniano na świeże co 72 godziny.

Badanie żywotności komórek MTT

Test MTT przeprowadzono na komórkach Caco-2. Komórki wysiano na płytki 96-dołkowe do momentu uzyskania monowarstwy komórek. Pożywkę zmieniono raz. Po tygodniu pożywkę usunęto, komórki przemyto PBS i wystawiono na działanie wzrastających stężeń produktu zawieszonego w buforze fosforanowym (PBS). Komórki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Grupy kontrolne inkubowano bez dodatku produktu. Po zakończeniu zabiegu do każdego dołka dodano barwnik MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy, 5 mg/ml) na 3 godziny. Roztwór MTT usunęto i dodano mieszaninę izopropanolu i kwasu solnego (25:1) w celu rozpuszczenia utworzonych kryształów formazanu. Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm względem fali odniesienia 690 nm za pomocą czytnika mikropłytek. Żywotność komórek wyrażono jako procent nieleczzonej kontroli.

Gęstość komórek Caco-2 i HT-29 MTX oznaczano metodą hemocytometryczną.

Ilościowo, aktywność biologiczną związku można wyrazić na dwa sposoby:

1. Dawka (stężenie) wywołujące standardową odpowiedź biologiczną.
2. % odpowiedzi w stosunku do kontroli przy standardowej dawce (stężeniu).

Pierwszy sposób jest najczęściej stosowaną i uznawaną za najbardziej precyzyjną metodę ilościowego wyrażania aktywności biologicznej, w której można wymienić takie miary jak:

IC50 - *inhibitory concentration* - stężenie hamujące wzrost komórek w 50%

EC50 - *effective concentration* - efektywne stężenie związku

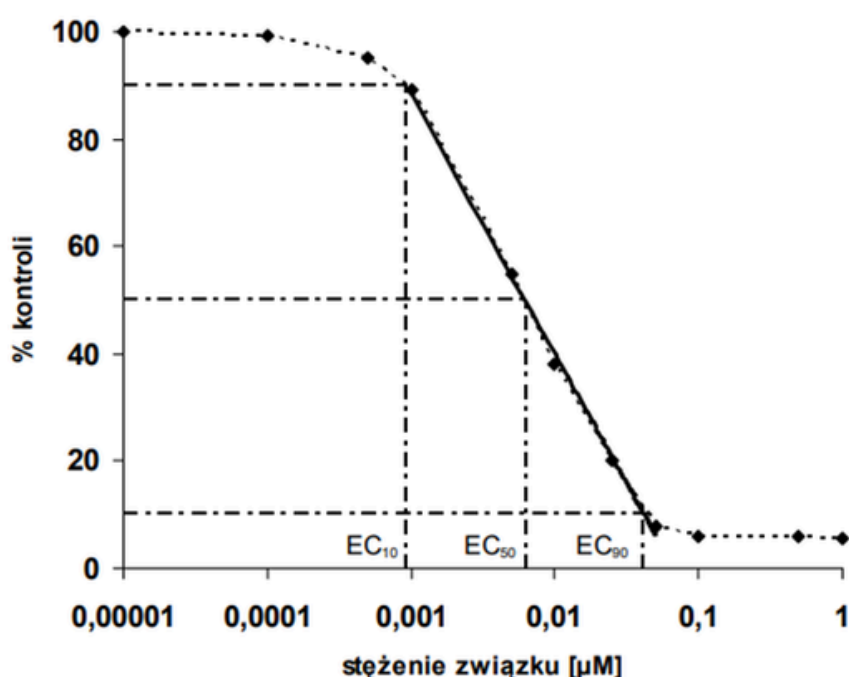
ED50 - *effective dose* - dawka efektywna

LD50 - *lethal dose* - dawka związku powodująca śmierć 50% komórek

MIC - *minimum inhibitory concentration* - minimalne stężenie hamujące wzrost komórek

MTD - *maximum tolerated dose* - maksymalna tolerowana dawka

W celu wyznaczenia tego typu miar aktywności należy wykonać wykres zależności zahamowania wzrostu komórek (wyrażonej jako procent w stosunku do kontroli, którą przyjmuje się za 100%) od stężenia badanego związku (rys.1).



Rys. 1. Zahamowanie wzrostu komórek w zależności od stężenia badanego związku.

Na podstawie liniowego fragmentu tej zależności wyznacza się trzy wielkości, stanowiące podstawę do oceny cytotoksyczności badanego związku. Są to:

- **EC10** - stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli *in vitro* zostaje zahamowana w 10% w stosunku do komórek kontrolnych - tzw. pierwsza dawka toksyczna;
- **EC50** - stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli *in vitro* zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych - tzw. miara cytotoksyczności;
- **EC90** - stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli *in vitro* zostaje zahamowana w 90% w stosunku do komórek kontrolnych - tzw. dawka letalna (śmiertelna).

Symulowany proces trawienia *in vitro*

W badaniach nad wpływem trawienia na produkt wykorzystano model przewodu pokarmowego *in vitro*. Układ eksperymentalny stanowił fermentor o pojemności 1 L (Sartorius - Polska). Temperatura układu eksperymentalnego była utrzymywana na poziomie 37°C. W trakcie prowadzonych prac wykorzystano bufor PBS o pH 7.4 (kontrola, symulacja pustego żołądka) i nośniki w postaci matryc żywnościowych: preparat mleko zastępczy Nutramigen, stosowany w alergii na białko mleka krowiego, bogaty w substancje odżywcze (oleje roślinne, hydrolizat kazeiny, składniki mineralne, witaminy); nieklarowany sok jabłkowo-marchwiowy Bobo Frut - bogate źródło błonnika (2 g/300 ml); kleik ryżowy BoboVita - produkt skrobiowy, skrobia ryżowa jest najłatwiej przyswajalną przez organizm skrobią oraz wykazuje działanie prebiotyczne.

W pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę produktu postbiotycznego z buforem PBS lub produkt postbiotyczny z wybraną matrycą żywieniową (P1)*. Tak przygotowaną próbę badawczą poddano pierwszemu etapowi trawienia *in vitro*, który miał na celu symulację warunków panujących w żołądku. W tym celu do mieszaniny imitującej płyn żołądkowy dodano pepsynę w ilości 300 U/ml i obniżono pH do wartości 4.0 za pomocą 1 M HCl. Etap prowadzono przez 4 h w temp. 37°C (P2). Ruchy perystaltyczne imitowano przez mieszanie zawiesiny przy użyciu mieszadła magnetycznego. Kolejny etap miał na celu odwzorowanie warunków panujących w jelicie cienkim. W tym celu pH płynu wyregulowano do wartości 6.0, stosując 1 M NaHCO₃. Następnie dodano 10 ml ekstraktu trzustkowo-jelitowego (P3). Kolejny etap polegał na podniesieniu pH do 7.4 przez dodanie 1 M NaHCO₃. Ten etap prowadzono przez 2 h (P4). W celu symulacji pasażu produktu przez jelito grube pH podniesiono do wartości 8.0 za pomocą 2 M NaHCO₃. Dalsze trawienie prowadzono w warunkach beztlenowych przez 18 h (P5).

*P = punkt pomiarowy

Do oceny toksyczności produktu postbiotycznego w stosunku do nowotworowych komórek Caco-2 i HT-29 MTX zastosowano model matematyczny w postaci funkcji przedstawionej poniżej:

$$Y_{obl.} = \frac{Y \text{ max.}}{\left(1 + \left(\frac{[C]}{IC50}\right)^s\right)} + Y \text{ min.}$$

gdzie:

Y min. i Y max. - to odpowiednio minimalna i maksymalna wartość liczbową badanej cechy estymowana przez wyznaczony model,

IC50 - odpowiada stężeniu EFK powodującego 50 % redukcję aktywności metabolicznej komórek (punkt przegięcia krzywej), podczas gdy s wyznacza nachylenie krzywej.

Analiza genotoksyczności i potencjału cytoprotekcyjnego produktu postbiotycznego z wykorzystaniem alkalicznej wersji testu kometowego

Celem badania była ocena wpływu produktu postbiotycznego na integralność genomowego DNA w liniach komórkowych gruczołakoraka jelita grubego: Caco-2 oraz HT-29 MTX. Procedurę oparto na elektroforezie żelowej pojedynczych komórek (SCGE - *Single Cell Gel Electrophoresis*) w warunkach zasadowych, co umożliwiło detekcję zarówno jedno-, jak i dwuniciowych pęknięć DNA (SSBs i DSBs) oraz miejsc labilnych alkalicznie.

Kluczowe etapy protokołu badawczego:

ekspozycja i przygotowanie matrycy - po 24-godzinnej inkubacji komórek z produktem postbiotycznym w stężeniach cytotoksycznych, monowarstwy poddano dysocjacji enzymatycznej za pomocą trypsyny. Uzyskaną zawiesinę komórkową standaryzowano do gęstości komórek/ml w buforze PBS o temperaturze 4°C, co miało na celu zahamowanie endogennych procesów naprawczych DNA;

formowanie mikrożeli - komórki unieruchomiono w matrycy z 0,5% agarozы o niskiej temperaturze topnienia (LMP), którą naniesiono na szkiełka podstawowe uprzednio powleczone 1% agarozą o normalnej temperaturze topnienia (NMP), tworząc układ warstwowy stabilizujący materiał biologiczny;

liza i denaturacja - w celu usunięcia struktur błonowych oraz białek komórkowych (głównie histonów), preparaty inkubowano w hipertonicznym buforze lizującym (pH 10) z dodatkiem detergentu Triton X-100. Następnie poddano je denaturacji w silnie alkalicznym elektrolicie (pH > 13), co pozwoliło na rozplecenie podwójnej helisy DNA i wyeksponowanie uszkodzeń;

elektroforeza i detekcja - rozdział elektroforetyczny prowadzony przy napięciu 230 V przez 40 minut umożliwił migrację uszkodzonych, ujemnie naładowanych fragmentów DNA w kierunku anody, tworząc charakterystyczny obraz „ogona komety”. Po neutralizacji i odwodnieniu w etanolu, chromatynę wybarwiono wysokoczułym barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Gold;

analiza ilościowa - pomiary morfometryczne komet wykonano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej oraz oprogramowania CometScore™. Podstawowym parametrem oceny genotoksyczności był procent DNA w ogonie komety (% DNA in tail), wyznaczany dla populacji minimum 80 komórek z każdego wariantu badawczego.

W końcowej fazie eksperymentu model ten wykorzystano do weryfikacji właściwości antymutagennych produktu postbiotycznego poprzez ocenę zdolności badanego czynnika do redukcji uszkodzeń indukowanych stresem oksydacyjnym.

WYNIKI BADAŃ

1. Badanie cytotoksyczności produktu w stosunku do komórek Caco-2 i HT-29 MTX

Analiza uzyskanych wyników wykazała istotną statystycznie, zależną od dawki, aktywność antyproliferacyjną badanego produktu postbiotycznego.

Wyniki bazowe przedstawiono w tabelach poniżej.

Tab. 1. Wpływ produktu postbiotycznego na wzrost komórek Caco-2 i HT-29 MTX

Stężenie preparatu postbiotycznego	Gęstość komórek ($\times 10^4/\text{cm}^2$)							
	kontrola	1%	5%	10%	30%	50%	70%	100%
Caco-2	$20 \times 10^4/\text{cm}^2$	$18 \times 10^4/\text{cm}^2$	$18 \times 10^4/\text{cm}^2$	$17 \times 10^4/\text{cm}^2$	$8 \times 10^4/\text{cm}^2$	$5 \times 10^4/\text{cm}^2$	$9 \times 10^4/\text{cm}^2$	$13 \times 10^4/\text{cm}^2$
HT-29-MTX	$10 \times 10^4/\text{cm}^2$	$10 \times 10^4/\text{cm}^2$	$13 \times 10^4/\text{cm}^2$	$10 \times 10^4/\text{cm}^2$	$7 \times 10^4/\text{cm}^2$	$6 \times 10^4/\text{cm}^2$	$10 \times 10^4/\text{cm}^2$	$7 \times 10^4/\text{cm}^2$

Tab. 2. Aktywność mitochondrialna komórek Caco-2 i HT-29 MTX hodowanych w obecności preparatu postbiotycznego

Stężenie preparatu postbiotycznego	Aktywność enzymów mitochondrialnych komórek linii nowotworowych w stosunku do kontroli [%]							
	kontrola	1%	5%	10%	30%	50%	70%	100%
Caco-2	100	100	100	100	99	77	64	63
HT-29-MTX	100	100	100	100	83	79	68	59

Na podstawie danych zawartych w raporcie, poniżej przedstawiono analizę wyników oraz wyliczone wartości (IC50) dla badanego produktu postbiotycznego.

Obliczenia (IC50) (Stężenie hamujące wzrost o 50%)

Wartość (IC50) określa stężenie preparatu, przy którym żywotność komórek lub ich proliferacja spada do 50% w stosunku do kontroli. Na podstawie tabel wskazujących na wpływ produktu postbiotycznego na wzrost komórek, wartości te kształtują się następująco:

1. Dla linii Caco-2:

- o Kontrola (0%): 20×10^4 komórek/ cm^2 .
- o Wartość docelowa (50%): 10×10^4 komórek/ cm^2 .
- o Z tabeli wynika, że przy stężeniu 10% gęstość wynosi 17×10^4 komórek/ cm^2 , a przy 30% spada do 8×10^4 komórek/ cm^2 .
- o Wyliczone IC50: ok. 25,5%

2. Dla linii HT-29-MTX:

- o Kontrola (0%): 10×10^4 komórek/cm²
- o Wartość docelowa (50%): 5×10^4 komórek/cm²
- o Z tabeli wynika, że przy stężeniu 30% gęstość wynosi 7×10^4 komórek/cm², a przy 50% wynosi 6×10^4 komórek/cm²
- o Wyliczone IC50: ok. 54%

Tab. 3. Aktywność antyproliferacyjna produktu postbiotycznego - wartości IC50 dla komórek Caco-2 i HT-29-MTX

LINIA KOMÓRKOWA	PRODUKT POSTBIOTYCZNY
Caco-2	25,5%
HT-29-MTX	54,0%

Wykazano, że proces trawienia w warunkach sztucznego przewodu pokarmowego, przy uwzględnieniu przedłużonej ekspozycji na aktywność mikrobioty jelitowej, prowadzi do zwiększenia cytotoksyczności produktu postbiotycznego względem linii HT-29 MTX. Wyniki badań genotoksyczności dowiodły, że produkt postbiotyczny nie wykazuje negatywnego wpływu na stabilność genomową komórek jelitowych. Jednocześnie stwierdzono jego działanie genoprotekcyjne, objawiające się skutecznym ograniczaniem uszkodzeń oksydacyjnych DNA indukowanych przez nadtlenek wodoru w komórkach HT-29 MTX.

2. Ocena genotoksyczności produktu postbiotycznego wobec *in vitro* modeli nabłonka jelitowego

W celu kompleksowej oceny bezpieczeństwa biologicznego trawionego preparatu postbiotycznego, poddano analizie jego wpływ na stabilność genetyczną komórek linii Caco-2 oraz HT-29 MTX. Badania prowadzono w warunkach 24-godzinnej ekspozycji komórek na produkt nie poddany rozcieńczeniom.

Do detekcji uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczych komórek wykorzystano alkaliczną odmianę testu kometowego (SCGE - *Single Cell Gel Electrophoresis*). Metoda ta pozwoliła na ilościową ocenę fragmentacji DNA poprzez pomiar intensywności fluorescencji materiału genetycznego migrującego w polu elektrycznym poza obręb jądra komórkowego (formującego tzw. ogon komety). Kluczowym parametrem poddanym analizie była procentowa zawartość DNA w ogonie, która jest wprost proporcjonalna do częstotliwości pęknięć nici DNA (jedno- i dwuniciowych) oraz miejsc wrażliwych na działanie alkaliów.

Tab. 4. Wpływ produktu postbiotycznego na stopień uszkodzeń DNA w komórkach Caco-2, różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli: * $p \leq 0,05$

STĘŻENIE PREPARATU POSTBIOTYCZNEGO	100%
	DNA w ogniu (%)
Kontrola	18
Preparat postbiotyczny	12
Nadtlenek wodoru	95
Nadtlenek wodoru i preparat postbiotyczny	87

Tab. 5. Wpływ produktu postbiotycznego na stopień uszkodzeń DNA w komórkach HT-29 MTX, różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli: * $p \leq 0,05$

STĘŻENIE PREPARATU POSTBIOTYCZNEGO	100%
	DNA w ogniu (%)
Kontrola	18
Preparat postbiotyczny	12
Nadtlenek wodoru	95
Nadtlenek wodoru i preparat postbiotyczny	89

Analiza danych eksperymentalnych przedstawionych w tabelach pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

- **Warunki standardowe (bez stresu oksydacyjnego)** - w obu liniach (Caco-2 i HT-29 MTX) po dodaniu preparatu poziom fragmentacji spadł z 18% do 12%. Oznacza to obniżenie fragmentacji o 33,3% w stosunku do próby kontrolnej.
- **Warunki stresu oksydacyjnego (inkubacja w H_2O_2)**
 - **Dla HT-29 MTX:** Preparat ograniczył uszkodzenia wywołane wodą utlenioną z 95% do 89%. Jest to spadek o ok. 6,3% w stosunku do próby obciążonej samym utleniaczem.
 - **Dla Caco-2:** Preparat ograniczył uszkodzenia z 95% do 87%. Jest to spadek o ok. 8,4% w stosunku do próby inkubowanej w H_2O_2 .

Wniosek:

Produkt nie tylko nie uszkadza DNA, ale wykazuje działanie genoprotekcyjne, redukując naturalny poziom fragmentacji DNA o 1/3 oraz łagodząc skutki stresu oksydacyjnego.

Porównując wrażliwość obu linii komórkowych można stwierdzić, że linia HT-29 MTX posiada zdolność do produkcji śluzu, co teoretycznie powinno zapewniać komórkom ochronę, jednak z uzyskanych wyników eksperymentów wynika, że jest znacznie bardziej wrażliwa na płyn postbiotyczny niż standardowa linia Caco-2. Proces symulowanego trawienia *in vitro* pozwala na zwiększenie cytotoksyczności produktu wobec linii HT-29 MTX. W efekcie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników można postawić hipotezę, że wzrost toksyczności po pasażu przez "sztuczne jelito grube" wynika z dwóch zjawisk. Pierwszym z nich jest deglikozylacja. Bakterie jelitowe posiadają enzymy (beta-glukozydazy, ramnozydazy), które odcinają cząsteczki cukru od antocyjanów i flawonoidów (np. cyjanidyny połączonej z ramnozą). Wolne aglikony są znacznie silniejszymi inhibitorami proliferacji nowotworowej. Uwalnianie składników biofunkcjonalnych z matrycy tj. produktu postbiotycznego przyczyniają się do aktywacji tego mechanizmu.

Badania wykazały, że produkt postbiotyczny nawet w wysokich stężeniach nie indukuje pęknięć nici DNA. W komórkach HT-29 MTX poddanych stresowi oksydacyjnemu (H_2O_2), obecność płynu zawierającego postbiotyki ograniczyła migrację fragmentów DNA do "ogona komety". Sugeruje to, że polifenole wchodzące w skład produktu postbiotycznego mogą bezpośrednio neutralizować wolne rodniki lub aktywować komórkowe systemy naprawy DNA przed wystąpieniem trwałych uszkodzeń.

WNIOSKI

Podsumowując, preparat postbiotyczny zawiera pulę związków aktywnych wykazujących właściwości przeciwnowotworowe. Badanie sugeruje, że ich spożywanie może mieć realny wpływ na hamowanie wczesnych etapów kancerogenezy jelita grubego poprzez bezpośrednią cytotoksyczność wobec zmutowanych komórek i ochronę DNA zdrowych komórek przed utlenianiem.

Warto wskazać, że do tej pory w dotychczasowych badaniach *in vitro* dowiedziono, że wymienione składniki istotnie spowalniają proces nowotworzenia poprzez wiele mechanizmów, m.in. przez bezpośredni udział w reakcjach unieczynniania wolnych rodników, ale także w sposób bardziej złożony: poprzez oddziaływanie na białka zaangażowane w regulowanie procesów proliferacji i apoptozy czy modulowanie aktywności enzymów kluczowych przy detoksykacji kancerogenów. Wiele prowadzonych analiz dotyczy związków fenolowych występujących czystej postaci, niezwiązanych z matrycą substancji.

Z uwagi na to, że składniki te są związane w materiale roślinnym i rzadko występują jako aglikony, natomiast częściej tworzą formy glikozydowe, a ponadto po obróbce technologicznej i przedostaniu się do przewodu pokarmowego ulegają licznym przemianom, większego znaczenia nabierają badania z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych bądź surowców wyjściowych.

Główne wnioski z badań:

1. **Selektywna cytotoksyczność:** produkt wykazuje istotną aktywność antyproliferacyjną wobec obu linii nowotworowych. Wyższe stężenia (powyżej 50%) drastycznie hamują wzrost komórek (nawet o 90-95%).
2. **Wpływ trawienia:** symulowany pasaż przez układ pokarmowy i działanie mikrobioty (deglikozylacja) zwiększają "agresywność" preparatu. Uwolnione aglikony flawonoidów stają się silniejszymi inhibitorami komórek nowotworowych.
3. **Bezpieczeństwo i genoprotekcja:**
 - a. Sam produkt nie jest genotoksyczny (nie uszkadza DNA zdrowych komórek).
 - b. Wykazuje działanie ochronne (cytoprotekcyjne) w linii HT-29 MTX - preinkubacja z postbiotykiem zmniejszyła uszkodzenia DNA wywołane stresem oksydacyjnym generowanym przez H_2O_2 z 95% do 89%.
4. **Różnice między liniami komórkowymi:** linia HT-29 MTX (zdolna do produkcji śluzu) jest bardziej wrażliwa na działanie płynu postbiotycznego niż standardowa linia Caco-2.

Autor raportu:
prof. dr hab. Daria Szymanowska