

Biologiczna rola wybranych syntetycznych kannabinoidów w kontekście zwalczania komórek ludzkiego raka jelita grubego

Katarzyna Szwaczko¹, Roman Paduch², Adrian Wiater³, Magdalena Lem², Kamil Dziuba¹; (1) Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej i Krystalochemii; (2) Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Wirusologii i Immunologii; (3) Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej UMCS, Lublin

Wprowadzenie



- Rak jelita grubego, znany również jako rak okrężnicy, jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie i stanowi istotną przyczynę zgonów związanych z nowotworami [1]. Nowotwór ten zwykle rozwija się z polipów jelitowych, które mogą przekształcić się w zmiany złośliwe w wyniku mutacji genetycznych i epigenetycznych.
- Linia komórkowa HT29 jest powszechnym modelem badawczym w badaniach nad rakiem jelita grubego. Pochodzi ona z ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego i ma zdolność do różnicowania się w warunkach hodowli *in vitro*, co czyni ją wartościowym narzędziem do badania mechanizmów molekularnych i biochemicznych związanych z rozwojem i progresją nowotworów jelita grubego.
- Kannabinoidy to naturalne związki chemiczne występujące w konopiach indyjskich (*Cannabis sativa* L.), wykazują szerokie spektrum właściwości biologicznych, w tym potencjał przeciwnowotworowy [2]. Nie wykazujące działania psychoaktywnego związki takie jak: kannabichromen (CBC), kannabidiol (CBD), kannabigerol (CBG) oraz kannabicitran (CBT) zyskują coraz bardziej na znaczeniu w badaniach nad nowotworami. CBD, najczęściej badany z tych związków, wykazuje działanie antyproliferacyjne, proapoptotyczne i antyangiogenne w różnych liniach komórkowych nowotworów, co sugeruje jego potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. CBG wykazuje właściwości przeciwnowotworowe poprzez hamowanie wzrostu komórek nowotworowych i indukowanie ich apoptozy, natomiast CBC jest badane pod kątem swoich właściwości przeciwzapalnych, które mogą wspierać walkę z nowotworami poprzez zmniejszanie stanów zapalnych w mikrośrodowisku guza.

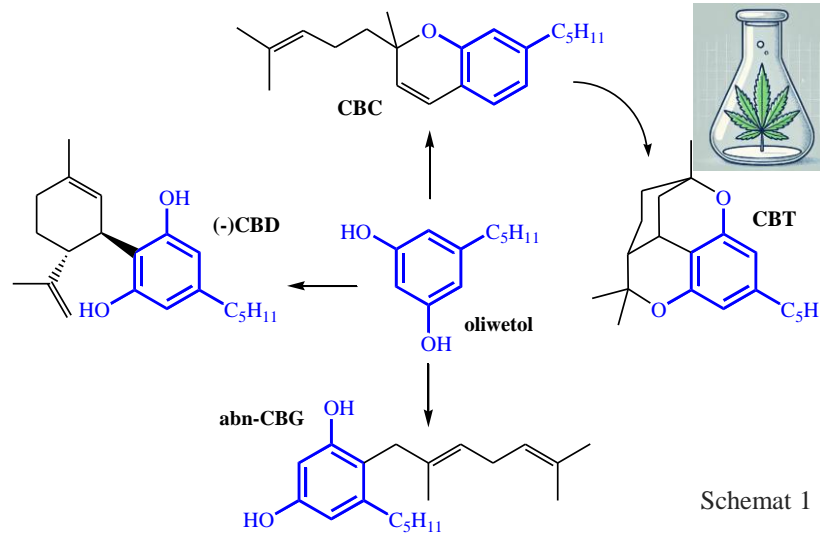
Cel pracy

Celem naszej pracy była synteza a następnie zbadanie i porównanie wpływu wybranych kannabinoidów: CBC, CBD, CBG i CBT na żywotność i proliferację ludzkich nowotworowych komórek jelita grubego linii HT29 oraz sprawdzenie, czy substancje te indukują wytwarzanie tlenków azotu przez komórki.

Materiały i Metody

(1) Synteza kannabinoidów

- Naturalne kannabinoidy są wytwarzane przez rośliny z difosforanu geranylu i kwasu oliwetolowego. Na drodze reakcji syntetycznych można je pozyskiwać poprzez reakcję oliwetolu (lub innych rezorcynoli) z pochodnymi terpenów. Oliwetol jest kluczowym związkiem w chemicznej syntezie fitokannabinoidów i ich pośrednich analogów a wysiłki zmierzające do chemicznej syntezy wyżej wymienionych kannabinoidów obejmują przede wszystkim jego regioselektywną terpenylację (Schemat 1).

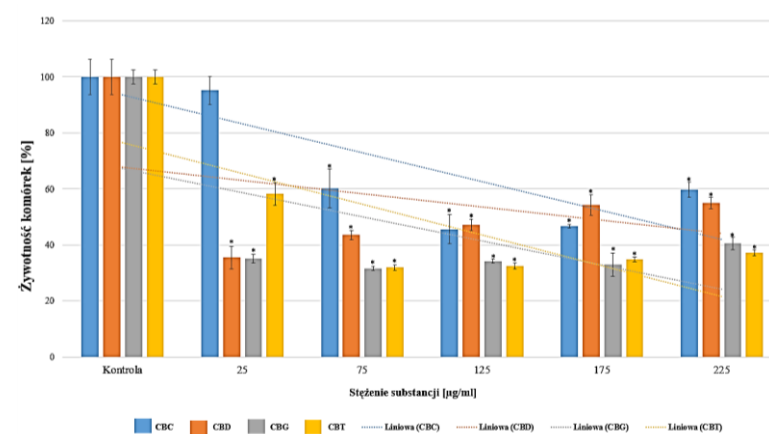


Schemat 1

- Kannabinoidy otrzymaliśmy modyfikując odpowiednio znane w literaturze metody ich syntezy [3]. Wydajności chemiczne czystych związków wynosiły od 35 do 68%.

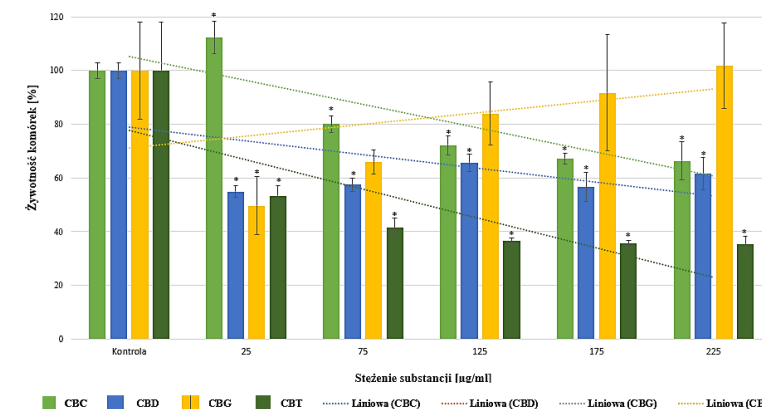
(2) Badania biologiczne

- W ramach badań przeprowadzono serię eksperymentów, w których testowano wpływ wybranych syntetycznych kannabinoidów na linię komórkową ludzkiego raka jelita grubego. Stosowane metody obejmowały: testy cytotoksyczności: metoda MTT i NR do oceny wpływu kannabinoidów na żywotność komórek rakowych; badanie redukcji wolnych rodników: metoda DPPH do oceny aktywności przeciwutleniającej; badanie aktywności redukcyjnej jonów żelaza: metoda FRAP oraz badanie stężenia azotynów: metoda Griessa.
- (a) Metoda MTT i NR**
Celem metody MTT było zbadanie cytotoksyczności wybranych kannabinoidów na komórki nowotworowe linii HT-29 w porównaniu do kontroli nie poddanej działaniu badanych substancji. Wyniki oraz analizę statystyczną na wykresie 1.



Wykres 1. Zależność żywotności komórek linii HT-29 od stężenia kannabinoidów w metodzie MTT (* oznaczono wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,01$)

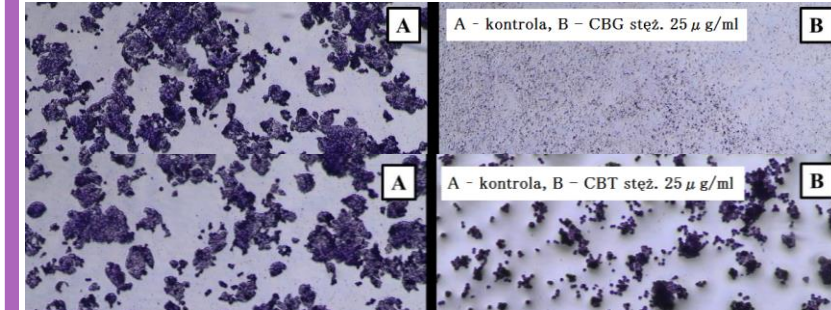
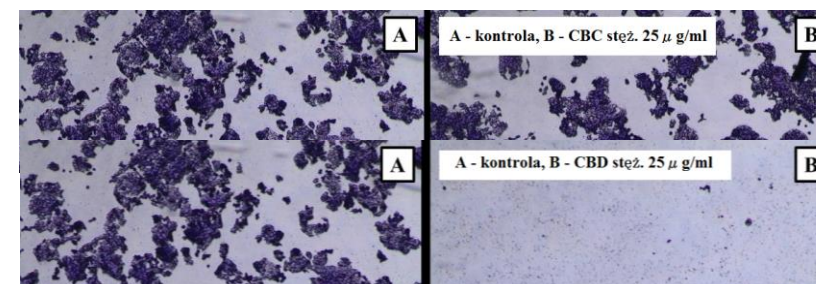
- Wszystkie badane kannabinoidy wykazywały efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych linii HT-29, a wyniki są istotne statystycznie (wyjątek stanowi CBC o stężeniu 25µg/ml). Największy spadek żywotności spośród kannabinoidów powodował CBG.
- Metoda NR polegała na określeniu czy badane substancje wpływają na integralność błon komórkowych, a tym samym czy posiadają właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych linii HT-29. Wyniki oraz analizę statystyczną przedstawiono na wykresie 2. Badane kannabinoidy CBC, CBD oraz CBT zmniejszały żywotność/proliferaację komórek nowotworowych. CBC oraz CBT wraz ze wzrostem stężeń, powodowały stopniowy spadek odsetka żywych komórek. W przypadku CBT jest on również najwyższy, w porównaniu do innych kannabinoidów. W przypadku CBD żywotność względem kontroli obniża się, ale utrzymuje się na podobnym poziomie 54,9 – 65,5% w całym zakresie badanych stężeń.



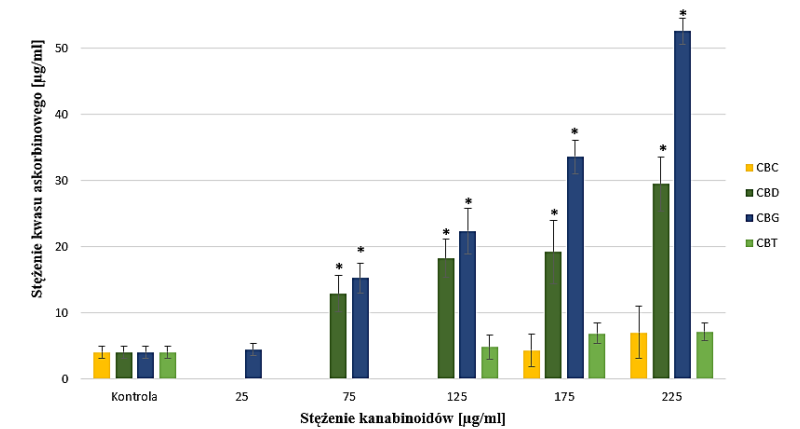
Wykres 2. Zależność żywotności komórek linii HT-29 od stężenia kannabinoidów w metodzie NR (* oznaczono wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,01$).

- (b) Metoda Griess'a**
W metodzie tej sprawdzano poziom wytworzonego tlenku azotu (NOx) przez komórki linii HT-29 inkubowane z kannabinoidami. Niestety w badaniu tym nie uzyskano istotnych statystycznie wyników związanych ze zmianą poziomu tlenku azotu pod wpływem działania wybranych stężeń badanych kannabinoidów.
- (c) Metoda May-Grünwalda-Giemsy** zastosowano w celu uwidocznienia zmian liczebności i morfologii badanych komórek względem próby kontrolnej pod wpływem aktywności wybranych stężeń badanych kannabinoidów. Wybrane wyniki przedstawiono na rysunkach poniżej.

Linia HT-29 traktowana



- (d) W metodzie FRAP oznaczano zdolność redukowania jonów żelaza wybranych kannabinoidów, w stężeniach 25, 75, 125, 175, 225 µg/ml względem kwasu askorbinowego. Wyniki w odniesieniu do kontroli negatywnej oraz analizę statystyczną przedstawiono na wykresie 3. Substancje CBD oraz CBG wraz ze wzrostem stężeń wykazywały wzrost działania redukcyjnego.



Wykres 3. Aktywność redukcyjna żelaza badanych kannabinoidów względem kwasu askorbinowego (* oznaczono wyniki istotne statystycznie dla $p < 0,01$)

Wnioski



Otrzymano syntetyczne kannabinoidy CBC, CBD, CBG i CBT, następnie zbadano ich aktywność na linii komórek jelita grubego linii HT-29. Kannabinoidy CBC, CBD i CBG wykazywały wzrastającą ze stężeniem aktywność antyrodnikową względem troloxu. CBD oraz CBG wykazywały aktywność redukującą jony żelaza, wzrastającą wraz ze wzrostem stężenia kannabinoidów. Wszystkie badane związki wpływały na metabolizm komórek nowotworowych linii HT-29. CBG było w tym zestawieniu najbardziej aktywnym związkiem. Badane kannabinoidy CBC, CBD oraz CBT wpływają na integralność błony cytoplazmatycznej, ale nie powodowały uwalniania tlenku azotu (NOx) przez komórki nowotworowe. Kannabinoidy CBD, CBG, CBT w odróżnieniu od CBC powodowały istotne zmiany morfologiczne i ilościowe komórek nowotworowych.

Literatura [1] Deptała A. (Red.), Onkologia w praktyce. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2006; [2] Borrelli, F. i wsp., *Carcinogenesis*, 2014, 35, 2787-2797; [3] artykuł w przygotowaniu



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE