

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Dyscyplina naukowa: weterynaria

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

lek.wet. Bartłomiej Szymczak

**Zmiany aktywności komórek nowotworowych
eksponowanych
na działanie Lisosanu G w przebiegu doświadczalnie
wywołanego raka wątrobowokomórkowego (HCC) u
szczurów**

*Changes in the activity of neoplastic cells exposed to Lisosan G
during experimentally induced hepatocellular carcinoma (HCC) in rats*

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Patofizjologii
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Promotor: dr hab. Marta Wójcik, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: Luisa Pozzo, DVM, PhD

Lublin, 2026 r.

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować Pani Promotor za cierpliwość, zaangażowanie oraz nieocenione wsparcie na wszystkich etapach powstawania niniejszej rozprawy.

Dziękuję współpracownikom z Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, którzy byli bezpośrednio zaangażowani w realizację niniejszego projektu, za pomoc, życzliwość i wsparcie.

Desidero ringraziare sinceramente la mia co-supervisora, Luisa Pozzo, e tutti i colleghi dell'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria del CNR per l'accoglienza, la disponibilità, il calore umano e l'enorme quantità di conoscenze che mi avete trasmesso durante il mio soggiorno a Pisa. Vi sono profondamente grato per questa esperienza scientifica e personale.

Dziękuję Paulinie, Kacprowi i Marcinowi za przyjaźń, obecność i bezinteresowną pomoc, na którą zawsze mogłem liczyć.

Szczególne podziękowania kieruję do Rodziców, Babci i Brata. Dzięki Waszemu zaangażowaniu, poświęceniu i nieustannemu wsparciu mogłem zawsze realizować swoje pasje i podążać wybraną drogą.

Wszystkim tym, którzy byli stałą w doświadczeniu pełnym zmiennych.

Załącznik Nr 2

Oświadczenie promotora pracy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 06.10.2026

Podpis promotora pracy Małgorzata Wojda

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 06/10/2026

Podpis autora pracy Bartłomiej Szymuszek

Spis treści

Oświadczenie promotora pracy doktorskiej	3
1. Streszczenie.....	6
2. Abstract	7
3. Wykaz skrótów	8
4. Wstęp.....	11
4.1 Pierwotne nowotwory wątroby u zwierząt towarzyszących	12
4.2 Modele zwierzęce w badaniach nad HCC	13
4.3 Wybrane czynniki etiologiczne HCC u zwierząt towarzyszących i ludzi	15
4.3.1 Predyspozycje genetyczne i rasowe.....	15
4.3.2 Zakażenia wirusowe.....	16
4.3.3 Choroby metaboliczne i stłuszczeniowe wątroby.....	17
4.3.4 Przewlekły proces zapalny	18
4.3.5 Toksyny i kancerogeny chemiczne.....	20
4.4 Rola biotransformacji ksenobiotyków i bariery redoks w hepatokarcynogenezie	22
4.4.1 Faza I biotransformacji ksenobiotyków	23
4.4.2 Faza II biotransformacji ksenobiotyków	24
4.5 Programowana śmierć komórki i transformacja nowotworowa.....	26
4.5.1 Inicjacja	28
4.5.2 Promocja.....	29
4.5.3 Progresja.....	29
4.6 Nutraceutyki jako element wsparcia żywieniowego i terapii wspomagającej w HCC	30
4.7 Cel pracy i hipotezy badawcze.....	33
5. Materiał i metody.....	35
5.1 Układ doświadczalny i przebieg doświadczenia	35
5.1.1 Zwierzęta	36
5.1.2 Układ doświadczalny	36
5.2 Pobieranie materiału biologicznego.....	37
5.3 Izolacja i hodowla hepatocytów	38
5.4 Analizy biochemiczne surowicy krwi	40
5.5 Izolacja RNA i qPCR.....	40
5.6 Testy immunoenzymatyczne	42
5.7 Izolacja frakcji mikrosomalnej i cytozolowej	43
5.8 Określenie aktywności enzymów cytochromu P450, detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych	44
5.8.1 Aktywność ECOD	45
5.8.2 Aktywność EROD	46
5.8.3 Aktywność AnH	46
5.8.4 Aktywność BqD	47
5.8.5 Aktywność katalazy	47
5.8.6 Aktywność DT-diaforazy	47
5.8.7 Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)	48
5.8.8 Aktywność GST	48
5.8.9 Oznaczenie stężenia malonodialdehydu (MDA).....	49
5.8.10 Oznaczenie stężenia białek karbonylowanych	49
5.9 Analiza statystyczna	50

6. Wyniki	51
6.1 Masa ciała, spożycie paszy i wody	51
6.2 Parametry biochemiczne surowicy krwi	54
6.2.1 Albumina	54
6.2.2 Fosfataza alkaliczna	56
6.2.3 Aminotransferaza alaninowa	58
6.2.4 Aminotransferaza asparaginianowa	60
6.2.5 γ -glutamylotransferaza	62
6.3 Enzymy biotransformacji i markery stresu oksydacyjnego	64
6.3.1 Enzymy biotransformacji fazy I	64
6.3.2 Enzymy fazy II i układ antyoksydacyjny	68
6.4 Markery białkowe oznaczane metodą ELISA	74
6.5 Ekspresja genów markerów różnicowania i programowanej śmierci	80
6.6 Aktywność izolowanych pierwotnych hepatocytów	82
6.7 Ocena histopatologiczna wątroby	87
7. Dyskusja	88
7.1 Lisosan G a wczesne etapy hepatokarcynogenezy: inicjacja i podatność na uszkodzenie	89
7.2 Lisosan G a promocja nowotworzenia: przewlekłe zapalenie i śmierć komórkowa	92
7.3 Lisosan G a progresja i fenotyp komórki nowotworowej	94
7.4 Lisosan G a rezerwa czynnościowa wątroby i ogólna kondycja organizmu	95
7.5 Nieliniowy charakter odpowiedzi na zróżnicowany udział LG w diecie	96
7.6 Znaczenie translacyjne i kierunki dalszych badań	97
8. Wnioski	99
9. Bibliografia	100

1. Streszczenie

Rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma*, HCC) należy do najczęstszych pierwotnych nowotworów wątroby i rozwija się zwykle w środowisku przewlekłego uszkodzenia narządu, w którym współistnieją zapalenie, stres oksydacyjny, zaburzenia biotransformacji ksenobiotyków oraz przebudowa struktury narządu. Biorąc to pod uwagę, poszukuje się czynników mogących niwelować niekorzystne konsekwencje tych procesów. Lisosan G (LG) jest nutraceutykiem o właściwościach antyoksydacyjnych i cytoprotekcyjnych, jednak jego wpływ na przebieg HCC nie został dotychczas wystarczająco poznany. Celem pracy była ocena wpływu LG na przebieg hepatokancerogenezy u szczurów, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności układów biotransformacji, stresu oksydacyjnego, procesów zapalnych, markerów różnicowania i śmierci komórkowej oraz funkcji izolowanych hepatocytów.

Badania przeprowadzono na 90 samicach szczurów Wistar losowo przydzielonych do dziewięciu grup doświadczalnych, obejmujących zwierzęta zdrowe, po częściowej hepatektomii oraz z HCC. Zwierzęta w wyżej wymienionych grupach żywione były dietą standardową lub dietą z dodatkiem 2,5% lub 5% LG. Nowotwór indukowano w modelu łączącym częściową hepatektomię z ekspozycją na dietylonitrozoaminę.

Uzyskane wyniki wykazały, że LG najsilniej oddziaływał w wątrobie objętej procesem nowotworowym, gdzie zwiększał aktywność enzymów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych, w tym GST, SOD i katalazy, oraz obniżał stężenie MDA i białek karbonylowanych. Jednocześnie w grupach HCC przyjmujących LG obserwowano niższe stężenia IL-6 i RIPK3 oraz spadek poziomu NO i anionorodnika ponadtlenkowego. Dodatek LG w diecie wiązał się też z wyższą ekspresją HNF4 α i TP53 oraz z obniżeniem poziomów AFP i PKM2.

Uzyskane wyniki potwierdziły antyoksydacyjne działanie LG wyrażone ograniczeniem peroksydacji lipidów i oksydacyjnego uszkodzenia białek. O ile LG hamuje odróżnicowywanie komórek nowotworowych, o tyle pozostaje bez dodatniego wpływu na szlaki regulujące programowaną śmierć komórkową - apoptozę i nekroptozę. Brak jednoznacznego wpływu LG w przebiegu HCC uzasadnia konieczność dalszych badań przed zastosowaniem tego nutraceutyku w terapii wspomagającej leczenie nowotworów wątroby.

2. Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common primary liver cancers and typically develops in the setting of chronic liver injury, in which inflammation, oxidative stress, disturbances in xenobiotic biotransformation, and structural remodelling of the organ coexist. Consequently, considerable attention has been directed towards identifying agents capable of mitigating the adverse consequences of these processes. Lisosan G (LG) is a nutraceutical with antioxidant and cytoprotective properties. However, its effects on the course of HCC have not yet been sufficiently elucidated. The aim of this study was to evaluate the effects of LG on hepatocarcinogenesis in rats, with particular emphasis on the activity of biotransformation systems, oxidative stress, inflammatory processes, markers of cellular differentiation and cell death, and the functional activity of isolated hepatocytes.

The study was conducted on 90 female Wistar rats randomly assigned to nine experimental groups comprising healthy animals, animals subjected to partial hepatectomy, and animals with HCC. Within these groups, the animals were fed either a standard diet or a diet supplemented with 2.5% or 5% LG. HCC was induced using a model combining partial hepatectomy with exposure to diethylnitrosamine.

The results demonstrated that the effects of LG were most pronounced in livers affected by neoplastic transformation. In HCC, LG increased the activity of antioxidant and detoxification enzymes, including GST, SOD, and catalase, while reducing the concentrations of MDA and protein carbonyls. In addition, the HCC groups receiving LG exhibited lower concentrations of IL-6 and RIPK3, as well as reduced levels of NO and superoxide anion. Dietary supplementation with LG was also associated with increased expression of HNF4 α and TP53, together with reduced levels of AFP and PKM2.

The obtained results confirmed the antioxidant activity of LG, evidenced by the attenuation of lipid peroxidation and oxidative protein damage. Although LG inhibits tumor cell dedifferentiation, it exerts no beneficial effect on the pathways regulating programmed cell death, namely apoptosis and necroptosis. The lack of an unambiguous effect of LG in the course of HCC justifies the need for further studies prior to the application of this nutraceutical in the adjuvant treatment of liver cancer.

3. Wykaz skrótów

AFB1 — *aflatoxin B1* — aflatoksyna B1

AFP — *alpha-fetoprotein* —
alfafetoproteina

AhR — *aryl hydrocarbon receptor* —
receptor arylowych węglowodorów

ALB/ALP — *albumin-to-alkaline
phosphatase ratio* — stosunek stężenia
albuminy do aktywności fosfatazy
alkalicznej

ALBI — *albumin-bilirubin score* —
wskaźnik albuminowo-bilirubinowy

ALP — *alkaline phosphatase* — fosfataza
alkaliczna

ALT — *alanine aminotransferase* —
aminotransferaza alaninowa

AnH — *aniline hydroxylase* —
hydroksylaza anilinowa

ARE — *antioxidant response element* —
element odpowiedzi antyoksydacyjnej

ARRIVE — *Animal Research: Reporting
of In Vivo Experiments* — wytyczne
raportowania badań in vivo na zwierzętach

AST — *aspartate aminotransferase* —
aminotransferaza asparaginianowa

ATP — *adenosine triphosphate* —
adenozynotrifosforan

ATP7A — *ATPase copper transporting
alpha* — ATP-aza transportująca miedź
typu alfa

ATP7B — *ATPase copper transporting
beta* — ATP-aza transportująca miedź typu
beta

BAX — *BCL2-associated X protein* —
białko proapoptotyczne BAX

BCAA — *branched-chain amino acids* —
aminokwasy rozgałęzione

BCL-2 — *B-cell lymphoma 2* — białko
antyapoptotyczne BCL-2

BCLC — *Barcelona Clinic Liver Cancer*
— system klasyfikacji zaawansowania i
leczenia raka wątrobowokomórkowego
Barcelona Clinic Liver Cancer

BHT — *butylated hydroxytoluene* —
butylowany hydroksytoluen

BqD — *7-benzyloxyquinoline debenzylase*
— debenzylaza 7-benzylooksychinoliny

cDNA — *complementary DNA* —
komplementarny DNA

CDK4/6 — *cyclin-dependent kinases 4 and
6* — kinazy zależne od cyklin 4 i 6

CDKN2A / p16 — *cyclin-dependent kinase
inhibitor 2A* — inhibitor kinaz zależnych
od cyklin 2A

CDNB — *1-chloro-2,4-dinitrobenzene* —
1-chloro-2,4-dinitrobenzen

COMMD1 — *copper metabolism MURR1
domain-containing-* białko zawierające
domenę MURR1, związane z
metabolizmem miedzi 1

CYP — *cytochrome P450* — cytochrom
P450

CYP1A1 — *cytochrome P450 family 1
subfamily A member 1* cytochrom P450,
rodzina 1, podrodzina A, izoforma 1

CYP1A2 — *cytochrome P450 family 1
subfamily A member 2* cytochrom P450,
rodzina 1, podrodzina A, izoforma 2

CYP2E1 — *cytochrome P450 family 2
subfamily E member 1* - cytochrom P450,
rodzina 2, podrodzina E, izoforma 1

CYP3A4 — *cytochrome P450 family 3
subfamily A member 4* cytochrom P450,
rodzina 3, podrodzina A, izoforma 4

DAMP — *damage-associated molecular
patterns* — wzorce molekularne związane z
uszkodzeniem

DCH — *domestic cat hepadnavirus* —
hepadnawirus kota domowego

DCPIP — *2,6-dichlorophenolindophenol*
— 2,6-dichlorofenolindofenol

DEN — *diethylnitrosamine* —
dietylonitrozoamina / N-
nitrozodietylamina

DMEM — *Dulbecco's Modified Eagle
Medium* — zmodyfikowane podłoże
Eagle'a według Dulbecco

DNA — *deoxyribonucleic acid* — kwas
deoksyrybonukleinowy

DNPH — *2,4-dinitrophenylhydrazine* —
2,4-dinitrofenylohydrazyna

DT-diaforaza / NQO1 —

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
oksydoreduktaza chinonowa 1 zależna od
NAD(P)H

E2F — *E2F transcription factor* —
czynn timeranskrypcyjny E2F

EASL — *European Association for the
Study of the Liver* — Europejskie
Stowarzyszenie Badań nad Wątrobą

ECM — *extracellular matrix* — macierz
zewnątrzkomórkowa

ECOD — *7-ethoxycoumarin O-deethylase*
— O-deetylaza 7-etoksykumaryny

EDTA — *ethylenediaminetetraacetic acid*
— kwas etylenodiaminotetraoctowy
ELISA — *enzyme-linked immunosorbent assay* — test immunoenzymatyczny
EMT — *epithelial-mesenchymal transition*
— przejście epitelialno-mezenchymalne
EROD — *7-ethoxyresorufin O-deethylase*
— O-deetylaza 7-etoksyrezorfiny
FBS — *fetal bovine serum* — płodowa surowica bydlęca
FDR — *false discovery rate* — odsetek fałszywych odkryć
G6P — *glucose-6-phosphate* — glukoza-6-fosforan
G6PDH — *glucose-6-phosphate dehydrogenase*
dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa
GGT — *gamma-glutamyltransferase* — gamma-glutamylotransferaza
GSH — *reduced glutathione* — glutation zredukowany
GST — *glutathione S-transferase* — glutationowa S-transferaza
GSTP1 — *glutathione S-transferase pi 1* — glutationowa S-transferaza pi 1
HBV — *hepatitis B virus* — wirus zapalenia wątroby typu B
HCC — *hepatocellular carcinoma* — rak wątrobowokomórkowy
HCV — *hepatitis C virus* — wirus zapalenia wątroby typu C
HE — *hematoxylin and eosin* — hematoksylina i eozyna
HNF4α — *hepatocyte nuclear factor 4 alpha* — jądrowy czynnik hepatocytarny 4 alfa
HO-1 — *heme oxygenase 1* — oksygenaza hemowa 1
IL-1α — *interleukin 1 alpha* — interleukina 1 alfa
IL-6 — *interleukin 6* — interleukina 6
JAK — *Janus kinase* — kinaza Janusowa
Keap1 — *Kelch-like ECH-associated protein 1* — białko 1 podobne do Kelch, związane z ECH
LG — Lisosan G
LG2,5% — dieta z 2,5% dodatkiem Lisosanu G
LG5% — dieta z 5% dodatkiem Lisosanu G
MAPK — *mitogen-activated protein kinase* — kinaza białkowa aktywowana mitogenami
MASLD — *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease* —

stłuszczeniowa choroba wątroby związana z dysfunkcją metaboliczną
MASH — *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis* — stłuszczeniowe zapalenie wątroby związane z dysfunkcją metaboliczną
MBOAT7 — *membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7* — białko zawierające domenę O-acylotransferazy błonowej 7
MDA — *malondialdehyde* — malonodialdehyd
miRNA — *microRNA* — mikroRNA
miR-122 — *microRNA-122* — mikroRNA-122
MLKL — *mixed lineage kinase domain-like pseudokinase* — pseudokinaza podobna do domeny kinazy linii mieszanej
mRNA — *messenger RNA* — informacyjny (matrycowy) RNA
MST1/2 — *mammalian STE20-like protein kinases 1 and 2* — kinazy białkowe podobne do STE20 ssaków 1 i 2
mTOR — *mechanistic target of rapamycin* — mechanistyczny cel rapamycyny
MTT — *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* — bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylotetrazolium
NADP⁺ — *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form* — fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma utleniona
NADPH — *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form* — fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana
NANOG — *Nanog homeobox* — czynnik transkrypcyjny NANOG
NBT — *nitroblue tetrazolium* — błękit nitrotetrazoliowy
NF-κB — *nuclear factor kappa B* — jądrowy czynnik κB
NK — *natural killer cells* — komórki NK / komórki naturalnej cytotoxyczości
NO — *nitric oxide* — tlenek azotu
Nrf2 — *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* — czynnik transkrypcyjny Nrf2
p21 — *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* — inhibitor kinaz zależnych od cyklin 1A
p27 — *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* — inhibitor kinaz zależnych od cyklin 1B
p53 — *tumor protein p53* — białko p53

PA — *pyrrolizidine alkaloids* — alkaloidy pirolizydynowe
PAMP — *pathogen-associated molecular patterns* — wzorce molekularne związane z patogenami
PBS — *phosphate-buffered saline* — buforowany roztwór soli fosforanowej
PCR — *polymerase chain reaction* — reakcja łańcuchowa polimerazy
PD-L1 — *programmed death-ligand 1* — ligand programowanej śmierci 1
PDX — *patient-derived xenograft* — ksenograft pochodzący od pacjenta
PGA — *polyglycolic acid* — kwas poliglikolowy
PH — *partial hepatectomy* — częściowa hepatektomia
PI3K/Akt — *phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B* kinaza 3-fosfatydyloinozytolu / kinaza białkowa B
PKM2 — *pyruvate kinase M2* — kinaza pirogronianowa M2
PNPLA3 — *patatin-like phospholipase domain-containing 3* białko zawierające domenę fosfolipazy podobnej do patatyny 3
PP2A — *protein phosphatase 2A* — fosfataza białkowa 2A
qPCR — *quantitative polymerase chain reaction* — ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
RASSF1A — *Ras association domain family member 1 isoform A* — białko rodziny domeny asocjacyjnej Ras 1, izoforma A
RB — *retinoblastoma protein* — białko retinoblastoma
RIPK1 — *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* — kinaza białkowa serynowo-treoninowa 1 oddziałująca z receptorem
RIPK3 — *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3* — kinaza białkowa serynowo-treoninowa 3 oddziałująca z receptorem
RNA — *ribonucleic acid* — kwas rybonukleinowy
RNS — *reactive nitrogen species* — reaktywne formy azotu
ROS — *reactive oxygen species* — reaktywne formy tlenu
RT-qPCR — *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction* —

ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją
SD — *standard diet* — dieta standardowa
SDS — *sodium dodecyl sulfate* — dodecylosiarczan sodu
SOCS1 — *suppressor of cytokine signaling 1* — supresor sygnalizacji cytokin 1
SOD — *superoxide dismutase* — dysmutaza ponadtlenkowa
STAM — *streptozotocin and high-fat diet model* — model łączący streptozotocynę z dietą wysokotłuszczową
STAT — *signal transducer and activator of transcription* przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
STAT3 — *signal transducer and activator of transcription 3* przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3
TAM — *tumor-associated macrophages* — makrofagi związane z nowotworem
TBA — *thiobarbituric acid* — kwas tiobarbiturowy
TCA — *trichloroacetic acid* — kwas trichlorooctowy
TM6SF2 — *transmembrane 6 superfamily member 2* — białko przez błonowe nadrodziny 6, izoforma 2
TME — *tumor microenvironment* — mikrośrodowisko nowotworowe
TNF-α — *tumor necrosis factor alpha* — czynnik martwicy nowotworów alfa
TNFR1 — *tumor necrosis factor receptor 1* — receptor czynnika martwicy nowotworów 1
TP53 — *tumor protein p53* — gen kodujący białko p53
Tris-HCl — *tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride* — chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminometanu
UBA2 — *ubiquitin-like modifier activating enzyme 2* — enzym aktywujący modyfikator ubikwitynopodobny 2
VLDL — *very low-density lipoprotein* — lipoproteina o bardzo małej gęstości
YAP/TAZ — *Yes-associated protein / transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* — białko związane z Yes / koaktywator transkrypcyjny z motywem wiążącym PDZ

4. Wstęp

Rak wątrobowokomórkowy (ang. *hepatocellular carcinoma*; HCC) stanowi około 75–85% przypadków pierwotnych nowotworów wątroby u ludzi¹. Niepokojące są prognozy wskazujące, że do 2040 r. liczba nowych przypadków raka wątroby oraz zgonów z jego powodu może wzrosnąć o ponad 55%, osiągając odpowiednio około 1,4 mln nowych rozpoznań i 1,3 mln zgonów rocznie². Podobna tendencja wzrostowa obserwowana jest również w medycynie weterynaryjnej, w której HCC rozpoznawane u zwierząt towarzyszących jest istotnym problemem zarówno diagnostycznym, jak i terapeutycznym.

Niezależnie od pierwotnego czynnika etiologicznego HCC rozwija się najczęściej w środowisku przewlekłego uszkodzenia wątroby, w którym utrzymują się bodźce prozapalne, stres oksydacyjny oraz procesy włóknienia³. W wytycznych EASL (European Association for the Study of the Liver) podkreśla się, że około 80–90% przypadków HCC rozwija się u pacjentów z marskością wątroby⁴. Ma to istotne znaczenie kliniczne ponieważ rokowanie po rozpoznaniu HCC jest w dużej mierze determinowane przez rezerwę czynnościową wątroby, a nie wyłącznie przez agresywność komórek nowotworowych. W wielu przypadkach niekorzystne rokowanie w HCC wynika z nakładania się kilku czynników: późnego rozpoznania, współistnienia przewlekłej choroby wątroby oraz trwałej przebudowy miększego narządu, której towarzyszy naciek komórek zapalnych. Dodatkowo rokowanie pogarszają: wysokie ryzyko wznowy, nawet po pełnej resekcji, oraz heterogenność biologiczna guza, która może sprzyjać oporności na chemioterapię. Dane kliniczne opisane w literaturze wskazują, że wczesne rozpoznanie i zakwalifikowanie pacjenta do leczenia radykalnego (obejmującego resekcję, transplantację lub techniki ablacyjne) przekładają się na wydłużenie przeżycia pacjentów^{5,6}. Dominujące patomechanizmy HCC obejmują przewlekłe zapalenie, nasilony stres oksydacyjny oraz zaburzoną biotransformację ksenobiotyków. Procesy te nie dotyczą wyłącznie komórek nowotworowych, lecz obejmują również komórki i struktury tworzące mikrośrodowisko guza (ang. tumor microenvironment, TME). Z tego względu coraz większe znaczenie przypisuje się strategiom terapeutycznym ukierunkowanym nie tylko na bezpośrednie zwalczanie komórek nowotworowych, ale również na modulację prokancerogenego mikrośrodowiska tkankowego. Ma to szczególne znaczenie w przewlekłych chorobach

wątroby, w których eliminacja czynnika pierwotnego jest niemożliwa, opóźniona lub niepełna.

4.1 Pierwotne nowotwory wątroby u zwierząt towarzyszących

W medycynie weterynaryjnej HCC oraz inne pierwotne nowotwory wątroby stanowią istotny problem kliniczny u zwierząt towarzyszących, jednak rzeczywista liczba ostatecznych diagnoz pozostaje niedoszacowana. Wynika to przede wszystkim z trudności diagnostycznych oraz ograniczonej swoistości objawów klinicznych. Nowotwory wątroby są często rozpoznawane w stadium zaawansowanym, niekiedy przypadkowo podczas badań obrazowych wykonywanych z innych wskazań. Ponadto, nawet po ustaleniu rozpoznania wdrożenie leczenia onkologicznego, w tym chemio- i radioterapii, bywa ograniczone czynnikami ekonomicznymi po stronie opiekunów zwierzęcia. U psów HCC jest jedną z najczęściej rozpoznawanych postaci pierwotnych nowotworów wątroby, a jego obraz kliniczny i rokowanie zależą ściśle od postaci guza (guz lity, forma guzkowa/wieloogniskowa lub rozlana) oraz jego lokalizacji, która bezpośrednio warunkuje możliwość resekcji⁷⁻¹⁰. W badaniach klinicznych wykazano, że u psów z guzem litym, ograniczonym do jednego płata leczenie chirurgiczne wiąże się z długim przeżyciem sięgającym ponad 1460 dni^{11,12}. Korzystne rokowanie dotyczy przede wszystkim przypadków resekcyjnych. Postacie wieloogniskowe lub rozlane, a także guzy naciekające okoliczne naczynia krwionośne, istotnie ograniczają możliwości skutecznej terapii.

W świetle dotychczas opublikowanych danych klinicznych i sekcyjnych, u kotów nowotwory wątroby rozpoznaje się rzadziej niż u psów, przy czym obok HCC istotny udział w tej grupie mają również nowotwory wywodzące się z przewodów żółciowych^{13,14}. Najnowsze prace przeglądowe wskazują na związek zakażenia hepadnawirusem kotów domowych (ang. domestic cat hepadnavirus, DCH) z zapaleniem wątroby oraz przypadkami nowotworów wątroby u kotów¹⁵⁻¹⁷.

Pomimo różnic etiologicznych część patomechanizmów HCC pozostaje wspólna dla ludzi i zwierząt towarzyszących. Należą do nich przewlekłe zapalenie, aktywacja fibrogenezy, stres oksydacyjny, zmiany w mikrośrodowisku i strukturze narządu oraz nadzór immunologiczny. W konsekwencji uzasadnione staje się poszukiwanie czynników zdolnych do ograniczania procesów podtrzymujących prokancerogenną

przebudowę wątroby, szczególnie takich, które mogłyby znaleźć zastosowanie zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej.

Należy również podkreślić, że w weterynaryjnej praktyce klinicznej problem nowotworów wątroby nie ogranicza się wyłącznie do trudności diagnostycznych i terapeutycznych związanych z guzami pierwotnymi. W praktyce małych zwierząt, w tym u psów, wątroba jest częstym miejscem przerzutów między innymi w przebiegu chłoniaka, raka trzustki, raka gruczołu mlekowego, raka jelita, naczyniakomięsaka oraz nowotworów z komórek tłuszczowych, natomiast u kotów przede wszystkim w przebiegu chłoniaka, nowotworów z komórek tłuszczowych oraz raków trzustki, jelit i nerki. Z tego względu diagnostyka powinna mieć charakter wieloetapowy i opierać się na łącznej ocenie wyników badań obrazowych, parametrów biochemicznych oraz weryfikacji cytologicznej i histopatologicznej.

4.2 Modele zwierzęce w badaniach nad HCC

Modele zwierzęce stanowią podstawowe narzędzie badania hepatokancerogenezy, ponieważ umożliwiają analizę zależności między inicjacją nowotworzenia, przewlekłym uszkodzeniem mięszu, odpowiedzią zapalną, włóknieniem i progresją zmian nowotworowych.

W badaniach nad HCC wykorzystuje się szereg modeli doświadczalnych, jednak do tych najlepiej poznanych i ugruntowanych w literaturze zaliczyć należy: modele chemicznej indukcji (toksykologiczne), modele dietetyczno-metaboliczne, modele zwierząt modyfikowanych genetycznie, a także modele transplantacyjne obejmujące ksenografty, modele syngeniczne oraz ksenografty pochodzące od pacjenta (patient-derived xenografts, PDX)^{18,19}.

Modele oparte na działaniu N-nitrozodietylaminy (ang. diethylnitrosamine, DEN) należą do najpowszechniej stosowanych modeli badania hepatokancerogenezy. Ten genotoksyczny kancerogen po bioaktywacji w wątrobie generuje uszkodzenia DNA, prowadząc do rozwoju ognisk przednowotworowych, a ostatecznie do HCC. Kancerogenne działanie DEN zależy od wieku, płci i predyspozycji genetycznych zwierząt, co przekłada się na różnice w biologii guza, typie utrwalonych mutacji oraz fenotypie zmian^{20–22}. W literaturze dobrze opisano modele dwuetapowe, obejmujące

inicjację i promocję, a także warianty tych modeli uwzględniające regenerację narządu, na przykład częściową hepatektomię (ang. partial hepatectomy, PH).

W układzie eksperymentalnym opisanym w niniejszej dysertacji zastosowano klasyczny dwuetapowy model kancerogenezy łączący wymuszoną regenerację (PH) z inicjacją zależną od DEN^{23,24}.

Rozwój modeli dietetyczno-metabolicznych wynikał z potrzeby coraz wierniejszego odtworzenia tych postaci HCC, które nie rozwijają się na tle ekspozycji toksycznej ani zakażeń wirusowych, lecz stanowią odległe następstwo przewlekłych zaburzeń metabolicznych prowadzących do stłuszczenia, zapalenia i włóknienia wątroby. Wraz ze wzrostem udziału metabolicznie uwarunkowanej stłuszczeniowej choroby wątroby (ang. metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) oraz metabolicznie uwarunkowanego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (ang. metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) w etiologii HCC zwiększyło się znaczenie modeli, w których rak wątrobowokomórkowy pojawia się jako późne powikłanie długotrwałej dysfunkcji metabolicznej. Mimo wielu korzyści płynących z wykorzystania modeli dietetyczno-metabolicznych pamiętać należy o ich ograniczeniach. Przykładem tych ograniczeń może być brak klasycznej sekwencji etapów transformacji nowotworowej obserwowanej u ludzi albo odmienny od ludzkiego fenotyp metaboliczny, na przykład bez typowej otyłości lub insulinooporności. Obserwowana może być również nadmierna toksyczność zastosowanej diety, co opisano w przypadku modeli mysich niealkoholowej choroby stłuszczeniowej wątroby²⁵.

Do grupy modeli dietetyczno-metabolicznych należy między innymi model STAM, łączący podanie streptozotocyny z dietą wysokotłuszczową lub modele dietetyczne oparte na niedoborze choliny (w tym dieta pozbawiona choliny, oparta na zdefiniowanej mieszaninie

L-aminokwasów oraz dieta wysokotłuszczowa z niedoborem choliny). Niedobór choliny zaburza syntezę fosfatydylocholiny a w konsekwencji upośledza eksport lipoprotein o bardzo małej gęstości (ang. very-low density lipoprotein, VLDL) z wątroby. Defekt ten sprzyja kumulacji triglicerydów w hepatocytach, nasileniu stresu oksydacyjnego oraz aktywacji odpowiedzi zapalnej i fibrogenezy²⁶.

Modele ksenograftów, polegające na wszczepieniu komórek ludzkich myszom immunoniekompetentnym są użyteczne w badaniach farmakologicznych, ale ich ograniczeniem pozostaje brak pełnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz

często uproszczone TME. Modele ortotopowe, w których materiał nowotworowy wszczepia się do wątroby, lepiej odtwarzają warunki narządowe, w tym perfuzję, macierz i lokalne interakcje komórkowe, dlatego są częściej rekomendowane do badań terapii miejscowych oraz oceny inwazyjności²⁷. Modele PDX prowadzą do zachowania heterogenności guza dzięki czemu wierniej odzwierciedlają typ guza obserwowany u pacjentów z HCC, jednak wymagają immunoniekompetentnego gospodarza. Modele humanizowane, zawierające komponent ludzkiej odpowiedzi immunologicznej, są obiecujące, lecz kosztowne i obarczone zmiennością rekonstrukcji układu immunologicznego.

4.3 Wybrane czynniki etiologiczne HCC u zwierząt towarzyszących i ludzi.

4.3.1 Predyspozycje genetyczne i rasowe

W etiologii HCC coraz większe znaczenie przypisuje się predyspozycjom genetycznym, które mogą warunkować przebieg włóknienia, odpowiedź na uszkodzenie miększu wątroby oraz mechanizmy magazynowania i usuwania lipidów przez hepatocyty. W medycynie człowieka dobrze udokumentowano związek polimorfizmów genów uczestniczących w metabolizmie lipidów i patogenezie MASLD z ryzykiem rozwoju HCC, dotyczy to przede wszystkim polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w genach PNPLA3 (I148M), TM6SF2 (E167K) oraz MBOAT7 (rs641738). Fizjologicznie białko PNPLA3 uczestniczy w hydrolizie triglicerydów zgromadzonych w kroplach tłuszczowych, natomiast polimorfizm I148M osłabia ten proces i sprzyja kumulacji lipidów w hepatocytach. Białko TM6SF2 warunkuje prawidłowy montaż i wydzielanie cząsteczek VLDL, a powodujący substytucję aminokwasu allel E167K ogranicza eksport triglicerydów z wątroby, nasilając ich wewnątrzkomórkową akumulację. Z kolei MBOAT7 katalizuje acylację fosfatydyloinozytolu i uczestniczy w przebudowie fosfolipidów błonowych, podczas gdy obecność allelu rs641738 wiąże się z obniżeniem aktywności tego szlaku, zaburzeniem składu lipidów błonowych oraz nasileniem odpowiedzi zapalnej.

Konsekwencją zaburzeń funkcji wymienionych genów jest akumulacja lipidów w hepatocytach, wzrost lipotoksyczności, nasilenie stresu oksydacyjnego i utrzymywanie

się przewlekłego zapalenia, co sprzyja włóknieniu oraz zwiększa ryzyko rozwoju HCC^{28,29}.

U zwierząt towarzyszących najlepiej scharakteryzowano genetycznie uwarunkowane zaburzenia gospodarki miedzią, prowadzące do jej przewlekłego gromadzenia w wątrobie. Delecja COMMD1 u bedlington terrierów zaburza szlak odpowiedzialny za usuwanie miedzi z hepatocytów i upośledza jej wydzielanie do żółci. U labrador retrieverów i dobermanów istotne znaczenie przypisuje się mutacjom w genie ATP7B, kodującym ATP-azę transportującą miedź do aparatu Golgiego i do żółci. U labrador retrieverów opisano również polimorfizm genu ATP7A, kodującego białko odpowiedzialne za transport miedzi przez błony komórkowe, zwłaszcza w enterocytach. Zmiana ta może wpływać na ilość miedzi wchłanianej i ostatecznie odkładanej w wątrobie. W konsekwencji zaburzenia funkcji tych genów prowadzą do przewlekłej retencji miedzi w wątrobie, nasilenia stresu oksydacyjnego, uszkodzeń białek i DNA oraz podtrzymywania przewlekłego procesu zapalnego. Należy jednak podkreślić, że u części ras psów predysponowanych do chorób spichrzeniowych miedzi, takich jak west highland white terrier czy dalmatyńczyk, występowanie tej jednostki chorobowej jest dobrze udokumentowane w literaturze klinicznej, jednak dotychczas molekularne podłoże tej predyspozycji nie zostało jednoznacznie określone³⁰.

Aktualne dane wskazują również, że do czynników ryzyka rozwoju HCC u psów należy przede wszystkim wiek zwierzęcia. Choroba ta najczęściej rozpoznawana jest u osobników starszych, zwykle w wieku ≥ 10 lat⁷. Z kolei w badaniu przeprowadzonym na Uniwersytecie Tokijskim w latach 2006–2012 wykazano, że shih tzu i yorkshire terrier należały do ras o najwyższej częstości HCC wśród nowotworów hepatocytarnych³¹.

4.3.2 Zakażenia wirusowe

Przewlekłe zakażenia wirusowe wątroby należą do najważniejszych przyczyn HCC u ludzi, a zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (*hepatitis B virus*, HBV) i wirusem zapalenia wątroby typu C (*hepatitis C virus*, HCV) przez wiele dekad stanowiły dominujące czynniki etiologiczne³². W przebiegu przewlekłej infekcji wirusowej utrzymujący się proces zapalny prowadzi do aktywacji komórek gwiazdzistych wątroby, włóknienia oraz stopniowej przebudowy prawidłowej struktury miększu. Procesy te tworzą środowisko sprzyjające transformacji nowotworowej³³. Kancerogenne działanie

HBV wynika z integracji wirusowego DNA z genomem gospodarza oraz modyfikacji licznych szlaków komórkowych, w tym m.in. Wnt/ β -katenina, MAPK, STAT, PI3K/Akt oraz Notch, prowadzących do zwiększonej proliferacji hepatocytów, zahamowania apoptozy, zaburzeń różnicowania i progresji nowotworu. Z kolei HCV jako wirus RNA, oprócz wywoływania przewlekłego zapalenia w wątrobie indukuje charakterystyczne zmiany epigenetyczne, obejmujące między innymi hipermetylację promotorów genów supresorowych³⁴. Te epigenetyczne modyfikacje obniżają ekspresję genów i osłabiają mechanizmy ograniczające proliferację komórkową. Szczególnie istotne są modyfikacje rejonów promotorowych dotyczące genu CDKN2A/p16, kodującego inhibitor kinaz cyklinozależnych 4 i 6 (CDK4/6), hamującego przejście komórki z fazy G1 do fazy S. W wyniku utraty lub osłabienia aktywności tego inhibitora białko retinoblastoma (RB) ulega fosforylacji a czynnik transkrypcyjny E2F zostaje uwolniony spod jego hamującego wpływu, czego skutkiem jest niedostateczna kontrola cyklu komórkowego. Wyciszeniu w przebiegu zakażenia HCV ulega również gen RASSF1A kodujący białko supresorowe o tej samej nazwie, uczestniczące w kontroli cyklu komórkowego, stabilizacji mikrotubul oraz aktywacji szlaków proapoptotycznych, w tym osi Hippo/MST. Jego hipermetylacja osłabia apoptozę i sprzyja przeżyciu komórek z uszkodzonym genomem. Wirus ten wpływa również na białko hamujące sygnalizację cytokinową zależną od osi JAK/STAT.

Metylacja rejonów promotorowych genu SOCS1 prowadzi do przedłużonej aktywacji szlaków proliferacyjnych i prozapalnych³⁵. Następstwem zakażenia HCV jest też zaburzona regulacja potranskrypcyjna zależna od miR-122, osłabiająca kontrolę genów związanych z proliferacją, odpowiedzią zapalną i transformacją nowotworową przez nadekspresję tych protoonkogenów³⁶.

Mimo iż do niedawna infekcje wirusowe były uznawane za główne czynniki etiologiczne HCC u ludzi, obecnie coraz większe znaczenie przypisuje się stłuszczeniowym chorobom wątroby. Warto zaznaczyć, że u zwierząt czynniki wirusowe nie stanowią wiodącej przyczyny rozwoju HCC. Jednak jak wskazano wcześniej, najnowsze prace sugerują udział zakażenia DCH w onkogenezie wątrobowej u kotów, co może być związane z mechanizmami przypominającymi HBV-zależną hepatokancerogenezę, ponieważ DCH jest filogenetycznym analogiem tego wirusa.¹⁷

4.3.3 Choroby metaboliczne i stłuszczeniowe wątroby

Jak wspomniano powyżej, u ludzi coraz większy udział w etiologii HCC mają zaburzenia metaboliczne związane z otyłością, insulinoopornością i cukrzycą typu 2, które sprzyjają włóknieniu, stresowi oksydacyjnemu oraz prokancerogennemu TME^{37–39}. Podobne zjawisko obserwowane jest u psów i kotów, u których coraz częściej notowane są przypadki otyłości i zaburzeń metabolicznych. Liczni autorzy wskazują ścisłą korelację występowania otyłości u kotów z rozwojem insulinooporności, wyższym ryzykiem cukrzycy typu 2 oraz nadmierną akumulacją kropli tłuszczu w wątrobie prowadzących do lipidozy wątrobowej^{40,41}.

Stłuszczenie wątroby u psów bywa obserwowane w przebiegu wybranych chorób, w tym wrodzonych zespołów wrotno-obocznych oraz zaburzeń endokrynnych. Dostępne dane sugerują, że akumulacja lipidów w wątrobie psów może współwystępować z nadczynnością kory nadnerczy, a także rozwojem przewlekłego procesu zapalnego i włóknienia, sprzyjającego transformacji nowotworowej hepatocytów. Ze względu na ograniczoną liczbę danych pro- i retrospektywnych wiążących stłuszczeniową chorobę wątroby z HCC zależność ta wymaga dalszego potwierdzenia^{42,43}.

4.3.4 Przewlekły proces zapalny

W patogenezie HCC przewlekłe choroby przebiegające z utrzymującym się procesem zapalnym, w tym choroby autoimmunologiczne i cholestatyczne należy rozpatrywać nie tylko jako odrębne jednostki chorobowe, lecz także jako element zjawiska typu *field effect* czyli „pola nowotworowego”. W takim środowisku współistnieją i wzajemnie wzmacniają się procesy zwiększające zarówno tempo powstawania zmian somatycznych, jak i prawdopodobieństwo ich utrwalenia w wyniku presji selekcyjnej. W przebudowującej się wątrobie zwiększa się liczba cykli proliferacyjnych hepatocytów i komórek progenitorowych, co statystycznie zwiększa liczbę szans na wystąpienie błędów replikacyjnych i ich utrwalenie w komórkach potomnych. Jednocześnie w przebiegu przewlekłego zapalenia w tkance narządu utrzymuje się stres oksydacyjny i nitrozacyjny generowany przez komórki odczynu zapalnego, dysfunkcyjne mitochondria, a w cholestazie również przez toksyczne kwasy żółciowe^{44,45}. Należy również pamiętać o charakterystycznej dla procesu przewlekłego przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM). Zmiana składu ECM polega na wzroście zawartości kolagenu, zmianie składu proteoglikanów oraz zwiększeniu mechanicznej „sztywności tkanki”, rozumianej jako zmniejszenie jej fizjologicznej

elastyczności i podatności na odkształcenia⁴⁶. Konsekwencją tych zmian jakościowych w tkance jest zwiększona częstotliwość aktywacji szlaków mechanotransdukcji za pośrednictwem integryn oraz efektorów YAP/TAZ. Procesy te sprzyjają przeżyciu komórek w warunkach stresu, promują komórki odznaczające się mniej zróżnicowanym fenotypem i ułatwiają adaptację hepatocytów do mikrośrodowiska o ograniczonej perfuzji oraz zmienionej waskulaturze^{47,48}. W przewlekłych hepatopatiach długotrwała ekspozycja na cytokiny i mediatory zapalne, m.in. interleukinę 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), interleukinę 1 α (IL-1 α) aktywuje szlaki transkrypcyjne łączące proces zapalny z mechanizmami przeżycia i kontroli cyklu komórkowego.

Jednymi z najlepiej poznanych i udokumentowanych w kontekście kancerogenezy wątrobowej są szlak jądrowego czynnika κ B (NF- κ B) oraz oś IL-6/JAK/STAT3⁴⁹. Po translokacji do jądra komórkowego NF- κ B integruje sygnały odbierane z mikrośrodowiska narządu i w zależności od panujących w nim warunków może promować przeżycie komórek z uszkodzonym DNA, nasilać ekspresję czynników proangiogennych oraz przebudowujących ECM, a także wzmacniać szlaki zapalne podtrzymujące remodeling tkanki⁴⁵. Podobnie aktywacja osi IL-6/JAK/STAT3 w przewlekłej chorobie wątroby sprzyja proliferacji, ogranicza apoptozę i wspiera immunosupresyjne TME. Ponadto w literaturze podkreśla się, że białko STAT3 jako ważny efektor łączący zapalenie z nowotworzeniem, ma nie tylko znaczenie patogenetyczne, lecz także translacyjne i terapeutyczne⁵⁰.

Przewlekłe zapalenie wątroby u psów jest jednostką heterogenną⁵¹, jednak wiele mechanizmów przewlekłej hepatopatii wykazuje podobieństwo między gatunkami. Dlatego również u tego gatunku podczas hepatokancerogenezy powstaje mikrośrodowisko zapewniające przewagę adaptacyjną i proliferacyjną transformowanym hepatocytom. Jednocześnie retrospektywne analizy patomorfologiczne wskazują, że marskość wątroby występuje tylko u niewielkiego odsetka psów z HCC. Odróżnia to ten gatunek od ludzi, u których rak wątrobowokomórkowy najczęściej rozwija się na podłożu marskości miększego. Sugeruje to, że u psów część przypadków HCC powstaje *de novo* lub w przebiegu przewlekłych hepatopatii związanych z utrzymywaniem się niszy prozapalnej i profibrotycznej^{7,10}.

Warunki sprzyjające inicjacji i progresji procesu nowotworowego u kotów tworzą natomiast przewlekłe zespoły zapalne dróg żółciowych (cholangitis/cholangiohepatitis

complex). Aktualne dane literaturowe wskazują, że szczególna podatność kotów na choroby dróg żółciowych może wynikać m.in. ze specyfiki ich anatomii. Przewód żółciowy wspólny u tego gatunku uchodzi do dwunastnicy wspólnie z przewodem trzustkowym. Anatomia ta sprzyja szerzeniu się procesów chorobowych w obrębie wątroby, dróg żółciowych i trzustki. Cholangitis u kotów stanowi jednostkę heterogenną i obejmuje przede wszystkim postać neutrofilową oraz limfocytarną, różniące się etiopatogenezą, przebiegiem klinicznym i konsekwencjami dla tkanek narządu. Z tego względu przewlekłe zespoły zapalne dróg żółciowych u kotów można uznać za istotną przyczynę długotrwałej przebudowy mięszu wątroby, przy czym bezpośrednie dane epidemiologiczne łączące określone fenotypy cholangitis z rozwojem HCC pozostają jednak ograniczone.^{52,53}.

Centralna rola zapalenia i stresu oksydacyjnego w hepatokancerogenezie uzasadnia wdrażanie interwencji terapeutycznych ukierunkowanych na ograniczanie obu tych procesów. Utrzymujące się sygnały zapalne oraz przewlekłe obciążenie oksydacyjne nie tylko zwiększają częstość uszkodzeń DNA, lecz także podtrzymują mikrośrodowisko sprzyjające przeżyciu w nim wyłącznie komórek cechujących się przewagą wzrostową a tym samym progresji zmian przednowotworowych. Z tego względu procesy te stanowią racjonalne cele zarówno w profilaktyce jak i w terapii. W tym kontekście na znaczeniu nabierają produkty pochodzenia naturalnego oraz nutraceutyki, przy czym ich potencjalna użyteczność nie musi wynikać z działania przeciwnowotworowego *sensu stricto*, lecz z modulacji szlaków zapalnych i prooksydacyjnych poprzedzających etap transformacji.

Szczególnie istotny może być wpływ takich interwencji na biotransformację ksenobiotyków poprzez regulację aktywności enzymów cytochromu P450 (CYP P450) oraz równoległe wzmacnianie endogennej obrony antyoksydacyjnej. W konsekwencji ukierunkowana modulacja zapalenia oraz reakcji oksydoredukcyjnych może stanowić komponent profilaktyki, a przede wszystkim terapii wspomagającej u pacjentów z HCC, zarówno ludzi jak i zwierząt, u których eliminacja przyczyny pierwotnej nie zawsze jest możliwa lub wystarczająca.

4.3.5 Toksyny i kancerogeny chemiczne

Ze względu na kluczową rolę w biotransformacji związków chemicznych wątroba jest znacznie bardziej narażona na działanie substancji toksycznych niż inne narządy. Wynika to zarówno z wysokiej aktywności metabolicznej hepatocytów, w tym układów zależnych od CYP P450, jak i ze specyfiki ukrwienia czynnościowego, które dostarcza do wątroby substancje wchłonięte z przewodu pokarmowego. W hepatocytach związki te są następnie poddawane metabolizmowi, biotransformacji i sprzęganiu. W konsekwencji wątroba staje się jednym z głównych narządów docelowych dla prokancerogennych związków o potencjale genotoksycznym lub cytotoksycznym, z których w warunkach przewlekłej ekspozycji powstają znaczne ilości reaktywnych metabolitów.

Aflatoksyna B1, metabolit grzybów z rodzaju *Aspergillus*, m.in. *A. flavus*, *A. parasiticus*, często zanieczyszczający produkty spożywcze, takie jak ziarna zbóż, orzechy i kukurydza, a także pasze dla zwierząt, należy do najlepiej opisanych mykotoksyn o potencjale kancerogennym. Podczas biotransformacji aflatoksyna B1 zostaje przekształcona przez izoformy cytochromu P450, przede wszystkim CYP3A4 i CYP1A2, do aktywnego biologicznie epoksydu (AFB1-8,9-exo-epoxide). Metabolit ten wykazuje silną reaktywność z DNA, tworząc głównie addukty do guaniny. Powstawanie takich adduktów sprzyja niestabilności genomu i transformacji nowotworowej⁵⁴. Równocześnie biotransformacja aflatoksyny B1 prowadzi do generowania reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), czego następstwem jest nasilony stres oksydacyjny, a w konsekwencji peroksydacja lipidów oraz uszkodzenie białek, błon komórkowych i mitochondriów⁵⁵.

W literaturze opisano również inne mykotoksyny stanowiące potencjalne zagrożenie, jednak w odniesieniu do wielu z nich dane pozostają fragmentaryczne⁵⁶. Odrębną grupę hepatotoksyn stanowią toksyny sinicowe w tym mikrocystyna-LR⁵⁷. U zwierząt ekspozycja na mikrocystyny, wynikająca przede wszystkim ze spożycia wody ze zbiornika objętego zakwitem sinic, może w warunkach przewlekłego uszkodzenia miększu sprzyjać promocji hepatokancerogenezy.

Spożycie alkoholu stanowi u ludzi jeden z głównych czynników etiologicznych marskości wątroby, a w konsekwencji także HCC. Ryzyko zależy od dawki i czasu ekspozycji, a progresja choroby zależna jest m.in. od płci, wieku, współistnienia chorób metabolicznych, takich jak otyłość i cukrzyca oraz predyspozycji genetycznych. Patomechanizm zmian indukowanych alkoholem obejmuje: 1) powstawanie aldehydu octowego oraz adduktów białkowych i DNA, 2) stres oksydacyjny wynikający m.in. z

aktywacji szlaków zależnych od enzymów CYP, 3) zaburzenie integralności bariery jelitowej i napływ wzorców molekularnych związanych z patogenami (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) oraz wzorców związanych z uszkodzeniem (ang. damage associated molecular patterns, DAMP) które nasilają proces zapalny, 4) przyspieszenie procesu włóknienia i przebudowy wątroby^{38,58,59}.

Obok wcześniej omówionych czynników istotną rolę odgrywają chemiczne kancerogeny i prokancerogeny, których znaczenie ujawnia się szczególnie wyraźnie w warunkach przewlekłej ekspozycji oraz współistniejącego uszkodzenia wątroby. Do tej grupy należy zaliczyć N-nitrozoaminy oraz ich prekursory, azotyny i azotany. Związki te występują w niektórych produktach spożywczych, zwłaszcza fermentowanych, konserwowanych i peklowanych, lecz powstają również endogennie w warunkach nasilonej nitrozacji. W przebiegu przewlekłego procesu zapalnego, w tym o podłożu infekcyjnym, zwiększona produkcja tlenu azotu i jego reaktywnych pochodnych sprzyja tworzeniu związków N-nitrozowych. Istotne znaczenie ma również przewlekła ekspozycja na metale ciężkie i półmetale, w tym arsen nieorganiczny obecny w wodzie pitnej. Wykazano związek między długotrwałym spożywaniem wody zanieczyszczonej tym pierwiastkiem a zwiększonym ryzykiem zgonu z powodu raka wątroby. Kolejnym szeroko rozpowszechnionym czynnikiem środowiskowym jest dym tytoniowy, który zawiera liczne prokancerogeny wymagające bioaktywacji, w tym wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Dane literaturowe wskazują, że zarówno palenie tytoniu jak i ekspozycja bierna na dym tytoniowy zwiększają ryzyko rozwoju HCC.

U zwierząt gospodarskich i wolno żyjących dobrze opisanym problemem są alkaloidy pirolizydynowe (PA), obecne w niektórych roślinach oraz występujące jako zanieczyszczenia pasz. Po bioaktywacji w wątrobie związki te wykazują właściwości genotoksyczne. Przewlekłe narażenie na PA może prowadzić do dysfunkcji wątroby, a w modelach doświadczalnych wykazano ich potencjał kancerogeny.

4.4 Rola biotransformacji ksenobiotyków i bariery redoks w hepatokarcynogenezie

Cytochromy P450 tworzą nadrodzinę hemoprotein zlokalizowanych głównie w siateczce śródplazmatycznej hepatocytów, a częściowo także w mitochondriach. Pełnią funkcję podstawowego układu metabolicznego odpowiedzialnego za biotransformację

ksenobiotyków oraz licznych związków endogennych. Cykl katalityczny enzymów CYP, sprzężony z reduktazą NADPH-cytochrom P450, umożliwia przebieg reakcji utleniania, lecz jednocześnie może prowadzić do „ucieczki” elektronów i generowania ROS, co czyni te enzymy potencjalnym źródłem stresu oksydacyjnego oraz uszkodzeń DNA w wątrobie^{60,61}. Biotransformacja ksenobiotyków może zatem działać ochronnie przez ograniczanie kumulacji toksyn, ale również w wyniku bioaktywacji prokancerogenów, zwiększać pulę reaktywnych metabolitów zdolnych do tworzenia adduktów DNA i inicjowania hepatokancerogenezy^{62,63}.

4.4.1 Faza I biotransformacji ksenobiotyków

Faza I biotransformacji obejmuje reakcje funkcjonalizacji, takie jak hydroksylacja, O-dealkilacja i epoksydacja. Ich zasadniczym skutkiem jest zwykle zwiększenie polarności cząsteczek, co przygotowuje je do dalszego metabolizmu i wydalenia. Należy jednak podkreślić, że proces ten nie zawsze ma charakter ochronny. W wielu przypadkach prowadzi bowiem do powstawania metabolitów bardziej reaktywnych biologicznie niż związek pierwotny.

Do enzymów zaangażowanych w te reakcje należy m.in. rodzina CYP1, obejmująca izoformy CYP1A1 i CYP1A2. Enzymy te uczestniczą w metabolizmie związków polarnych i arylowych, w tym wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Ich aktywność pozostaje silnie zależna od aktywacji receptora arylowego (ang. aryl hydrocarbon receptor, AhR). Pobudzenie AhR nasila ekspresję enzymów z rodziny CYP1, zwiększając zdolność komórki do bioaktywacji części prokancerogenów. W konsekwencji rośnie pula reaktywnych metabolitów pośrednich zdolnych do uszkodzania DNA. Jeżeli wysokiej aktywności tej izoformy towarzyszy proces zapalny oraz ograniczona wydolność endogennych układów antyoksydacyjnych, zwiększa się prawdopodobieństwo utrwalenia niekorzystnych mutacji podczas podziałów komórkowych.

Funkcjonalnym markerem aktywności enzymów z rodziny CYP1, zwłaszcza CYP1A1, jest aktywność O-deetylazy 7-etoksyrezorfiny (ang. 7-ethoxyresorufin O-deethylase, EROD)^{62,64}.

Izoforma CYP2E1 stanowi jeden z najważniejszych enzymów łączących ekspozycję na nitrozoaminy z inicjacją hepatokancerogenezy. W modelu indukcji HCC przez DEN

związek ten pełniący funkcję inicjatora genotoksycznego ujawnia swój mutageny potencjał dopiero po metabolicznej aktywacji zależnej od CYP2E1. W wyniku tego procesu powstają reaktywne metabolity pośrednie, w tym związki etylujące zasady azotowe DNA^{65,66}. Potwierdzeniem udziału CYP2E1 w bioaktywacji DEN są wyniki doświadczeń z wykorzystaniem myszy z unieczynnionym genem *Cyp2e1*. U zwierząt tych wykazano znaczne osłabienie hepatokancerogenezy indukowanej DEN, co jednoznacznie wskazuje, że enzym CYP2E1 jest główną izoformą odpowiedzialną za bioaktywację tego kancerogenu w warunkach *in vivo*⁶⁷. Jednocześnie w modelach przewlekłej ekspozycji na DEN opisywano spadek ekspresji i aktywności CYP2E1 w zaawansowanych zmianach nowotworowych⁶⁸. Wykazano również, że niska ekspresja CYP2E1 w tkance guza może współwystępować z bardziej agresywnym fenotypem oraz być niepomysłnym czynnikiem rokowniczym⁶⁹. Funkcjonalnym wskaźnikiem aktywności CYP2E1 we frakcji mikrosomalnej jest aktywność hydroksylazy aniliny (ang. aniline hydroxylase, AnH)⁷⁰.

Rodzina CYP3A, a zwłaszcza izoforma CYP3A4, odpowiada za wątrobowy metabolizm wielu leków i innych związków egzogennych. Od sprawności tego układu zależy również poziom ekspozycji tkanek obwodowych na substancje pochodzące z przewodu pokarmowego⁷¹. W toku hepatokancerogenezy dochodzi do odróżnicowania metabolicznego komórek nowotworowych, co przejawia się utratą wyspecjalizowanych funkcji enzymatycznych mięszu wątroby. Proces ten obejmuje m.in. uproszczenie profilu metabolicznego oraz istotny spadek ekspresji i aktywności enzymów detoksykacyjnych, w tym CYP3A4, co ogranicza zdolność komórek guza do prawidłowej biotransformacji ksenobiotyków⁷².

Zjawisko to ma znaczenie kliniczne, ponieważ niska ekspresja CYP3A4, podobnie jak innych przedstawicieli rodziny CYP3A, była wiązana z krótszym przeżyciem chorych. Część autorów uznaje zatem utratę aktywności CYP3A4 za cechę współwystępującą z wyższym stopniem odróżnicowania komórek guza oraz bardziej agresywnym przebiegiem choroby⁷³. Markerem aktywności CYP3A4/CYP3A w mikrosomach wątrobowych jest aktywność debenzylazy 7-benzylooksychinoliny (ang. 7-benzyloxyquinoline debenzylase, BqD).⁷⁴.

4.4.2 Faza II biotransformacji ksenobiotyków

Faza II biotransformacji obejmuje reakcje sprzęgania, m.in. z glutationem, siarczanami i kwasem glukuronowym. Ich wspólnym celem jest zwiększenie rozpuszczalności metabolitów w środowisku wodnym oraz zmniejszenie ich reaktywności chemicznej. W konsekwencji metabolity powstałe w fazie I tracą w fazie II zdolność do uszkodzania struktur komórkowych i ulegają eliminacji z organizmu.

Szczególnie istotne w hepatokancerogenezie są układy zależne od glutationu, ponieważ uczestniczą w bezpośredniej neutralizacji reaktywnych metabolitów generowanych w fazie I. Glutathiono-S-transferaza (ang. glutathione S-transferase; GST) katalizuje ich sprzęganie z glutationem, ograniczając zdolność tych związków do tworzenia adduktów z DNA i białkami. W przewlekle uszkodzonej wątrobie ekspresja izoformy GSTP1 może ulegać obniżeniu. Jednocześnie wykazano, że wyższa aktywność GSTP1 w komórkach HCC może wiązać się z hamowaniem proliferacji i korzystniejszym fenotypem guza.⁷⁵

Konsekwencje zmian aktywności enzymów detoksykacyjnych zależą od etapu procesu nowotworowego. Na etapie inicjacji sprawna detoksykacja ogranicza uszkodzenia DNA, natomiast w guzie już uformowanym te same układy mogą zwiększać przeżycie komórek nowotworowych i pogarszać odpowiedź na leczenie. Z tego względu zmiany aktywności GST należy interpretować zarówno z punktu widzenia podatności komórek na uszkodzenia materiału genetycznego, jak i w kontekście oporności na wybrane leki cytostatyczne⁷⁶.

Oksydoreduktaza NAD(P)H:chinon 1 (ang. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1), określana także jako DT-diaforaza, jest kolejnym enzymem zaliczanym do II fazy biotransformacji oraz do układu obrony antyoksydacyjnej. Katalizuje ona dwuelektronową redukcję chinonów, dzięki czemu ogranicza powstawanie ROS w przebiegu reakcji redoks. W wielu nowotworach, w tym w HCC, obserwuje się jej nadekspresję⁷⁷. Zjawisko to ma niekorzystne znaczenie rokownicze, ponieważ zwiększona aktywność DT-diaforazy wiąże się ze stabilizacją białek antyapoptotycznych, co sprzyja przeżyciu komórek nowotworowych⁷⁸.

Poza enzymami fazy II ważną rolę w ograniczaniu stresu oksydacyjnego podczas biotransformacji odgrywają klasyczne enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase, SOD) i katalaza. Ich zadaniem jest neutralizacja ROS powstających w komórce. Wykazano, że w przebiegu HCC wyższa aktywność SOD w tkance guza może wiązać się z dłuższym czasem przeżycia pacjentów

po resekcji. Nie oznacza to jednak, że wzmacnianie obrony antyoksydacyjnej jest w każdym kontekście korzystne⁷⁹.

W dojrzałych komórkach nowotworowych może ono stać się elementem adaptacji do warunków stresu metabolicznego. Długotrwała aktywacja szlaków antyoksydacyjnych, na przykład zależnych od jądrowego czynnika erytroidealnego 2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2), zmniejsza nasilenie stresu oksydacyjnego i peroksydacji lipidów oraz hamuje ferroptozę, co w konsekwencji ułatwia przeżycie komórek guza i zwiększa ich oporność na stosowaną terapię.⁸⁰

4.5 Programowana śmierć komórki i transformacja nowotworowa

Hepatokancerogeneza jest procesem wieloetapowym. Rozpoczyna się od uszkodzeń materiału genetycznego oraz zaburzeń szlaków kontrolujących proliferację komórkową. Zmiany te są następnie utrwalane w kolejnych cyklach podziałowych pod wpływem przewlekłego zapalenia, stresu oksydacyjnego i postępującej przebudowy struktury narządu. W konsekwencji dochodzi do powstania komórek cechujących się zdolnością do autonomicznej proliferacji, unikania nadzoru immunologicznego, ekspansji klonalnej oraz nieśmiertelności replikacyjnej⁸¹.

Zaburzenie równowagi między sygnałami proapoptotycznymi i antyapoptotycznymi stanowi kluczowe zjawisko w przebiegu transformacji nowotworowej. Do przeżycia komórek z uszkodzonym genomem przyczyniają się zarówno spadek aktywności białek proapoptotycznych, jak i wzrost ekspresji czynników hamujących śmierć komórki. Zmiana ta nie tylko zwiększa szansę przetrwania komórki już uszkodzonej, lecz także ułatwia dalszą selekcję subpopulacji komórkowych bardziej odpornych na stres środowiskowy, hipoksję i działanie czynników cytotoksycznych^{82,83}.

Najlepiej poznaną formą programowanej śmierci komórki pozostaje apoptoza. Jest to proces ściśle kontrolowany, przebiegający z udziałem kaspaz i nieaktywujący reakcji zapalnej. W jej toku obserwowane jest obkurczenie komórki, kondensacja chromatyny, fragmentacja jądra oraz powstawanie ciałek apoptotycznych, które następnie są usuwane przez komórki fagocytyczne⁸⁴.

Sprawna apoptoza ma znaczenie fundamentalne, ponieważ pozwala eliminować komórki z uszkodzonym DNA, nieprawidłowo aktywowanymi szlakami

proliferacyjnymi lub zaburzoną kontrolą cyklu komórkowego. Osłabienie tego mechanizmu umożliwia przeżycie i dalszą proliferację komórek obciążonych niestabilnością genetyczną, co zwiększa prawdopodobieństwo utrwalenia zmian inicjujących kancerogenezę⁸⁵.

Apoptoza nie jest jedyną formą programowanej śmierci komórki, której zaburzenia przyczyniają się do hepatokancerogenezy. Coraz większą uwagę zwraca się na nekroptozę, czyli programowaną śmierć komórki związaną z utratą integralności błony komórkowej i uwalnianiem DAMP. Aktywacja tego szlaku regulowanej śmierci skutkuje rekrutacją komórek układu odpornościowego, nasileniem miejscowego procesu zapalnego oraz wtórnym pobudzeniem procesów naprawczych i proliferacyjnych. Rola nekroptozy w procesach nowotworowych jest zatem niejednoznaczna. Może ona sprzyjać eliminacji komórek zmienionych nowotworowo, jednak jej przewlekła aktywacja może również współtworzyć środowisko sprzyjające przebudowie tkanki i dalszemu rozwojowi nowotworu^{86,87}. Proces ten jest najczęściej indukowany przez sygnalizację zależną od receptorów śmierci, zwłaszcza TNFR1, w warunkach jednoczesnego zahamowania aktywności kaspazy 8. Zahamowanie szlaków apoptozy prowadzi do aktywacji w komórce kinaz RIP1 i RIP3 oraz utworzenia tzw. nekrosomu. Następnie RIPK3 fosforyluje białko MLKL (mixed lineage kinase domain like pseudokinase), które po oligomeryzacji przemieszcza się do błony komórkowej. Dochodzi wówczas do formowania w niej porów oraz napływu jonów, co w konsekwencji prowadzi do obrzęku komórki i jej ostatecznego pęknięcia. W HCC wspomniana powyżej niejednoznaczna natura nekroptozy jest szczególnie wyraźna. Dane doświadczalne wskazują, że osłabienie osi RIPK3/MLKL może zmniejszać częstość rozwoju raka wątroby, co przemawia za udziałem nekroptozy w podtrzymywaniu przewlekłego zapalenia sprzyjającego hepatokancerogenezie. Jednocześnie w materiale pochodzącym od chorych wzrost ekspresji markerów nekroptozy bywał wiązany z większym naciekiem limfocytów T i lepszym rokowaniem. Oznacza to, że nekroptoza może działać zarówno przeciwnowotworowo, przez zwiększenie immunogenności guza, jak i pronowotworowo, przez utrwalanie zapalnej przebudowy TME.

W procesach nowotworowych znaczenie przypisuje się również innym formom regulowanej śmierci komórki, takim jak pyroptoza i ferroptoza, choć ich rola w HCC jest bardziej złożona. Pyroptoza wiąże się z aktywacją zapalnej odpowiedzi komórkowej i

uwalnianiem cytokin prozapalnych, natomiast ferroptaza jest ściśle związana z zaburzeniami gospodarki żelazem oraz nasileniem peroksydacji lipidów.

Obie formy śmierci mogą w określonych warunkach ograniczać przeżycie komórek nowotworowych, ale mogą też wtórnie wpływać na TME przez nasilenie stresu oksydacyjnego, reakcji zapalnej i odpowiedzi regeneracyjnej⁸⁸.

W wątrobie zachowanie prawidłowego obrotu komórkowego rozumianego jako równowaga między śmiercią komórek a proliferacją ma szczególne znaczenie. Jest to narząd o dużym potencjale regeneracyjnym, dlatego każdy wzrost śmierci komórkowej uruchamia mechanizmy odnowy tkankowej. W warunkach krótkotrwałego uszkodzenia odpowiedź taka ma charakter adaptacyjny i służy przywróceniu prawidłowej struktury narządu. Inaczej dzieje się wtedy, gdy uszkodzenie, zapalenie i stres oksydacyjny utrzymują się przewlekłe. Powtarzające się procesy śmierci i odnowy komórek zwiększają liczbę podziałów proliferujących hepatocytów, a tym samym zwiększają ryzyko utrwalania mutacji i selekcji hepatocytów o przewadze wzrostowej⁸⁹.

W warunkach przewlekłego uszkodzenia narządu powstaje układ, w którym uszkodzenie komórek, ich śmierć i następcza odnowa tkanki pozostają ze sobą ściśle sprzężone. Taki stan sprzyja utrwalaniu mutacji i tworzy warunki do selekcji klonalnej obciążonych komórek⁹⁰.

4.5.1 Inicjacja

Etap inicjacji obejmuje utrwalenie zmian genetycznych i epigenetycznych, które nadają komórce przewagę przeżywalności lub zdolność do proliferacji w warunkach stresu tkankowego. Kluczową rolę pełnią tu szlaki odpowiedzi na uszkodzenie DNA oraz mechanizmy kontroli cyklu komórkowego, których centralnym elementem jest białko p53 kodowane przez gen TP53⁹¹. Mutacje w tym genie w HCC wiążą się z agresywnym fenotypem guza i gorszym rokowaniem dla pacjenta⁹². Wynika to z osłabienia eliminacji komórek z krytycznymi uszkodzeniami genomu oraz ich zwiększonej skłonności do nabywania cech komórek progenitorowych. Jak opisano powyżej, podczas inicjacji kancerogenezy szczególnego znaczenia nabiera równowaga między sygnałami proapoptotycznymi z ekspresją BAX na czele a antyapoptotycznymi, gdzie kluczową rolę odgrywa m.in. inhibitor apoptozy BCL-2. Ocena ekspresji wyżej wymienionych białek w tkance nowotworowej stanowi funkcjonalny marker podatności komórki na eliminację lub przeżycie, w związku z tym zmiany ich ekspresji analizowano jako jeden z

biomarkerów prognostycznych⁸¹. Podkreśla to, że przełamanie apoptozy jest jednym z kluczowych warunków utrwalenia zmian inicjujących⁸³. Równolegle do zaburzeń szlaków śmierci komórkowej, zachodzi wczesne zachwianie różnicowania hepatocytów. Jądrowy czynnik hepatocytów 4 α (ang. hepatocyte nuclear factor 4 alpha, HNF4 α) odpowiada w komórce za rozwój dojrzałego fenotypu hepatocytarnego. Dane literaturowe wskazują, że wysoka ekspresja HNF4 α blokuje ich przejście w komórki o cechach komórek macierzystych. Ponadto czynnik ten jest inhibitorem przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek (ang. epithelial–mesenchymal transition; EMT), które odgrywa kluczową rolę w procesie metastazy.^{93,94} W praktyce oznacza to, że na wczesnym etapie transformacji istotna jest nie tylko liczba mutacji, ale także to, czy komórka utrzymuje fenotyp dojrzałego hepatocytu, czy przechodzi w fenotyp mniej zróżnicowany, bardziej plastyczny i podatny na selekcję. Mając na względzie powyższe, wskazuje się, że zwiększanie ekspresji HNF4 α leży u podstaw tak zwanej terapii różnicującej w HCC.

4.5.2 Promocja

Promocja wiąże się z aktywacją niekontrolowanej proliferacji komórek zmienionych w warunkach przewlekłego procesu zapalnego. Cytokiny prozapalne, zwłaszcza IL-6 i TNF- α , pełnią funkcję kluczowych mediatorów osi zapalenie–przeżycie–proliferaacja. Aktywacja osi IL-6/JAK/STAT3 jest szeroko opisywana jako mechanizm promujący rozwój HCC, między innymi przez nasilenie szlaków proliferacyjnych, hamowanie apoptozy i kształtowanie immunosupresyjnych właściwości TME^{50,95}. Szlaki mediowane przez TNF- α mogą kierować los komórki w odmienny sposób. W warunkach sprawnej aktywności kaspaz sygnał TNF- α może uruchamiać apoptozę, natomiast przy blokadzie apoptozy lub zaburzeniu aktywności kaspazy 8 dochodzi do aktywacji nekroptozy regulowanej przez RIPK1 i RIPK3. Rola aktywacji osi RIPK1/RIPK3 jest jednak złożona, ponieważ jak już wspomniano szlak ten może działać korzystnie przez indukcję programowanej śmierci i wzmacniać procesy zapalne. Z tego względu w HCC obserwuje się niejednoznaczność efektów związanych z aktywacją tych kinaz^{96–99}.

4.5.3 Progresja

Na etapie progresji komórki nowotworowe przystosowują się do wzrostu w niekorzystnych warunkach, przekształcają mikrośrodowisko i wymykają się nadzorowi immunologicznemu. Ważnym elementem tej adaptacji jest przeprogramowanie metabolizmu. Opisane przez Ottona Warburga nasilenie glikolizy mimo dostępności tlenu wiąże się z wysoką aktywnością kinazy pirogronianowej M2 (ang. pyruvate kinase M2, PKM2). Znaczenie PKM2 wykracza jednak poza jej funkcję metaboliczną. Jej wysoka aktywność może również sprzyjać unikaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej przez zwiększanie ekspresji ligandu programowanej śmierci komórek 1 (ang. programmed death-ligand 1, PD-L1)^{100,101}.

Zmianom metabolicznym towarzyszą utrata cech dojrzałego hepatocytu (odróżnicowanie) oraz wzrost plastyczności fenotypowej komórek guza. Odróżnicowanie nie ogranicza się przy tym do zmiany morfologii komórek, lecz obejmuje także osłabienie ekspresji genów odpowiedzialnych za funkcje hepatocytów oraz reekspresję białek płodowych lub białek typowych dla komórek macierzystych. Postępujące odróżnicowanie komórek HCC zwiększa ich zdolność do przystosowania się do hipoksji, niedoboru substratów energetycznych i zmiennych sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska. Nabywanie cech komórek macierzystych sprzyja ponadto samoodnowie, odtwarzaniu heterogenicznej populacji komórek guza oraz mniejszej wrażliwości na chemioterapeutyki, co może zwiększać ryzyko rozwoju w guzie pierwotnym subpopulacji komórek lekoopornych i późniejszego nawrotu choroby. Odróżnicowanie może również współwystępować z EMT, ułatwiając migrację, naciekanie otaczających tkanek i rozsiew komórek nowotworowych. Stan zróżnicowania należy zatem traktować jako dynamiczny element progresji HCC, przy czym przesunięcie w stronę fenotypu progenitorowego wiąże się z większą agresywnością guza i gorszym rokowaniem.^{102,103}

Jednym z przejawów tych procesów może być ponowna ekspresja alfa-fetoproteiny (AFP), biomarkera onkofetalnego szeroko wykorzystywanego w praktyce klinicznej u chorych na HCC. Ponowna wysoka ekspresja tego białka nie ogranicza się wyłącznie do roli biomarkera diagnostycznego i prognostycznego w HCC^{104,105}. Opisywano udział AFP w procesach związanych z inwazją, przerzutowaniem i lekoopornością, a także z osłabieniem odpowiedzi przeciwnowotworowej przez modulowanie funkcji komórek dendrytycznych, komórek NK i limfocytów T^{106,107}.

4.6 Nutraceutyki jako element wsparcia żywieniowego i terapii wspomagającej w HCC

Pojęcie nutraceutyku, mimo braku ugruntowanej, jednoznacznej definicji odnosi się do substancji lub mieszanin pochodzenia żywnościowego, takich jak produkty fermentacji, frakcje roślinne, wybrane aminokwasy, lipidy bioaktywne i związki fitochemiczne, które w dawkach przekraczających standardowe spożycie wraz z dietą, mogą wywierać mierzalny efekt biologiczny. W ujęciu funkcjonalnym nutraceutyk zajmuje miejsce pośrednie między klasyczną interwencją żywieniową a farmakoterapią. Celem jego zastosowania nie jest wyłącznie korekta niedoborów ani wzbogacenie diety, lecz ukierunkowane oddziaływanie na określone patomechanizmy. W tym znaczeniu nutraceutyki należy odróżnić od żywności funkcjonalnej, której efekt wynika z typowego spożycia w ramach diety, oraz od suplementów diety rozumianych jako preparaty uzupełniające niedobory żywieniowe.

Korzyści z włączenia nutraceutyków w HCC wynikają przede wszystkim z ich potencjalnej zdolności do modulowania patomechanizmów, które poprzedzają transformację nowotworową lub podtrzymują mikrośrodowisko sprzyjające selekcji klonalnej. Do kluczowych celów takiej interwencji należą: (1) przewlekłe zapalenie i sygnalizacja proliferacyjna obejmująca szlaki NF- κ B, IL-6/JAK/STAT3, (2) stres oksydacyjny i adaptacja redoks w tym oś Nrf2–ARE oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych, (3) deregulacja biotransformacji ksenobiotyków związana z zaburzeniem równowagi między fazą I i II, oraz (4) zaburzenia osi jelito–wątroba wynikające ze zmiany mikrobioty, przepuszczalności bariery jelitowej i napływu sygnałów prozapalnych do krążenia wrotnego.

W praktyce nutraceutyki należy zatem rozważać nie jako leczenie przeciwnowotworowe *sensu stricto*, lecz jako związki niwelujące niekorzystne tło prozapalno-prooksydacyjne, czyli warunki sprzyjające inicjacji, promocji i progresji zmian nowotworowych. Należy jednak uwzględnić odmienne konsekwencje takiej interwencji w zależności od etapu choroby. W fazie inicjacji i promocji wzmacnianie bariery redoks może ograniczać uszkodzenia DNA, natomiast w rozwiniętym guzie przewlekła aktywacja odpowiedzi antyoksydacyjnej może stać się elementem adaptacji komórek nowotworowych i sprzyjać ich przeżyciu w warunkach stresu.^{108,109}

W odróżnieniu od rutynowych modyfikacji żywieniowych, nutraceutyki mogą wchodzić w obszar potencjalnie istotnych interakcji farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. Część z nich może modulować ekspresję i aktywność enzymów CYP P450, enzymów II fazy biotransformacji oraz transporterów błonowych. W przewlekłych chorobach wątroby znaczenie tych interakcji wzrasta ze względu na zmniejszoną rezerwę metaboliczną narządu, częstą polifarmakoterapię oraz wąskie okno terapeutyczne wielu stosowanych leków.

Z perspektywy klinicznej i badawczej nutraceutyk powinien być zatem traktowany jako preparat mogący modyfikować odpowiedź na farmakoterapię a przed włączeniem takiego związku jako terapii wspomagającej należy również uwzględnić ryzyko działań niepożądanych, w tym hepatotoksyczności idiosynkratycznej lub zależnej od dawki. Ograniczeniem ich zastosowania jest też trudność w utrzymaniu ich jakości i powtarzalności składu. Dotyczy to zwłaszcza kompozycji wieloskładnikowych, ponieważ brak standaryzacji, zmienność między partiami oraz niestabilność składników aktywnych istotnie rzutują na przewidywalność efektu klinicznego. W praktyce zastosowanie nutraceutyku powinno być poprzedzone szczegółową oceną: (1) standaryzacji i jakości preparatu, (2) bezpieczeństwa stosowania w warunkach niewydolności wątroby, (3) ryzyka interakcji z lekami, oraz (4) wytypowaniem grupy pacjentów z HCC, u których włączenie dodatkowego postępowania przynosi wymierne korzyści.

W literaturze klinicznej najlepiej udokumentowane są nutraceutyki ukierunkowane na stan odżywienia i ograniczenie sarkopenii, ponieważ czynniki te bezpośrednio wpływają na rokowanie pacjentów, tolerancję na leczenie oraz ryzyko powikłań u pacjentów z przewlekłą chorobą wątroby lub HCC. Przykładem takiej interwencji jest zwiększona podaż aminokwasów rozgałęzionych (BCAA), której celem jest poprawa bilansu białkowego i zachowanie kondycji tkanki mięśniowej. Prace przeglądowe dotyczące wsparcia żywieniowego wymieniają również kurkuminoidy, stilbeny, w tym resweratrol, katechiny, flawonoidy oraz izotiocyjaniany jako cząsteczki plejotropowe, zdolne do hamowania sygnałów prozapalnych, utrzymania homeostazy redoks i regulacji ekspresji genów. Swoje działanie ujawniają również poprzez mechanizmy epigenetyczne i regulację miRNA^{110,111}. Kurkumina wykazuje działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne hamując m.in. szlak IL-6/JAK/STAT3. Jej wpływ na parametry biochemiczne oraz tło metaboliczne i zapalne w MASLD jest dobrze opisany, jednak

wciąż brakuje jednoznacznych dowodów potwierdzających jej bezpośrednią skuteczność w HCC¹¹².

Jednym z kandydatów do dalszych badań w obszarze terapii wspomagającej i potencjalnej profilaktyki wtórnej jest Lisosan G (LG), wieloskładnikowy nutraceutyk pochodzenia roślinnego. Preparat ten jest pozyskiwany z ziarna pszenicy (*Triticum sativum*) w procesie fermentacji z udziałem bakterii mlekowych i drożdży, a następnie utrwalany w postaci proszku do podaży doustnej. Zainteresowanie LG wynika z jego potencjalnego wielokierunkowego działania. Kompleks związków fenolowych, frakcji błonnika oraz mikroskładników odżywczych może modyfikować odpowiedź zapalną, homeostazę redoks i układy detoksykacyjne, czyli szlaki kluczowe w inicjacji i promocji hepatokancerogenezy. W badaniach na pierwotnych hepatocytach szczura wykazano wzrost aktywności antyoksydacyjnej i detoksykacyjnej pod wpływem LG, natomiast w modelach *in vivo* obserwowano działanie cytoprotekcyjne w warunkach nasilonego obciążenia oksydacyjnego i zapalnego. Opisywano również ograniczenie toksyczności wywołanej cisplatyną^{113–115}. Frakcja fenolowa LG aktywuje szlaki cytoprotekcyjne, w tym oś Nrf2–ARE oraz zwiększa aktywność enzymów fazy II biotransformacji i obrony antyoksydacyjnej, do których zaliczyć należy DT-diaforazę, HO-1 i układ glutationowy, ograniczając pulę reaktywnych metabolitów i poziom stresu oksydacyjnego w hepatocytach. Frakcja błonnikowa może korzystnie wpływać na mikrobiotę i procesy fermentacji jelitowej, podczas gdy antyoksydanty lipofilne, tokoferole i tokotrienole stabilizują potencjał redoks błon komórkowych hamując peroksydację lipidów. Jednocześnie wieloskładnikowa natura LG wymaga funkcjonalnej oceny jego zastosowania. Kluczowe pozostaje zatem pytanie, czy żywieniowy dodatek LG modyfikuje przebieg procesu nowotworowego przekładając się na wymierne korzyści z jego stosowania. Z tego względu zasadne jest ukierunkowanie badań własnych na parametry bezpośrednio powiązane z dynamiką HCC oraz na funkcjonalną ocenę aktywności układów biotransformacji i obrony antyoksydacyjnej. Taki sformułowany problem badawczy tworzy pomost pomiędzy teoretycznymi przesłankami o działaniu tego nutraceutyku a weryfikacją jego działaniem w modelu *in vivo*.

4.7 Cel pracy i hipotezy badawcze

Celem niniejszej pracy jest ocena wpływu Lisosan G, nutraceutyku pochodzenia roślinnego na wybrane parametry biochemiczne, molekularne i komórkowe w przebiegu doświadczalnie wywołanego HCC u szczurów ze szczególnym uwzględnieniem aktywności układów biotransformacji ksenobiotyków i obrony antyoksydacyjnej oraz markerów odpowiedzi zapalnej, różnicowania, metabolizmu i regulacji śmierci komórkowej.

W ramach realizacji celu głównego wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Ocena wpływu LG na przyrosty masy ciała oraz wybrane parametry biochemiczne surowicy krwi, obejmujące aktywność wybranych enzymów wątrobowych oraz stężenie albuminy.
2. Określenie wpływu LG na aktywność wybranych reakcji biotransformacji ksenobiotyków zależnych od cytochromu P450 oraz aktywność enzymów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych w wątrobie.
3. Ocena wpływu LG wobec oksydacyjnych modyfikacji lipidów i białek.
4. Określenie wpływu LG na stężenie wybranych białek związanych z odpowiedzią zapalną, regulacją śmierci komórkowej oraz fenotypem komórek wątroby.
5. Ocena aktywności metabolicznej oraz statusu oksydacyjnego hepatocytów *in vitro*.

Przyjęto następujące hipotezy badawcze:

1. Lisosan G modyfikuje aktywność układów biotransformacji ksenobiotyków i obrony antyoksydacyjnej w nowotworowej wątrobie szczurów poprzez ograniczenie oksydacyjnych uszkodzeń lipidów i białek.
2. Lisosan G wpływa na wybrane markery odpowiedzi zapalnej a regulując cząsteczki włączone w programowaną śmierć wzbudza w komórkach nowotworowych szlaki apoptozy i nekrotozy.
3. Lisosan G nasila różnicowanie komórek nowotworowych wątroby poprzez regulację ekspresji genów związanych z tym procesem
4. Odpowiedź na Lisosan G jest zróżnicowana w zależności od jego zawartości diecie oraz rodzaju uszkodzenia wątroby

5. Materiał i metody

5.1 Układ doświadczalny i przebieg doświadczenia

5.1.1 Zwierzęta

Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem 90 samic szczurów wędrownych (*Rattus norvegicus*) szczepu Wistar w wieku 8 tygodni, pozyskanych z Ośrodka Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zwierzęta poddano standardowemu okresowi kwarantanny i aklimatyzacji, w trakcie którego losowo przydzielono je do grup kontrolnych i eksperymentalnych. Szczury utrzymywano w standardowych dla gatunku warunkach środowiskowych obejmujących temperaturę w zakresie $22^{\circ}\text{C}\pm 2$, cykl światło/ciemność – 12h/12h oraz wilgotność $55\%\pm 10$. Przez cały okres eksperymentu zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i paszy.

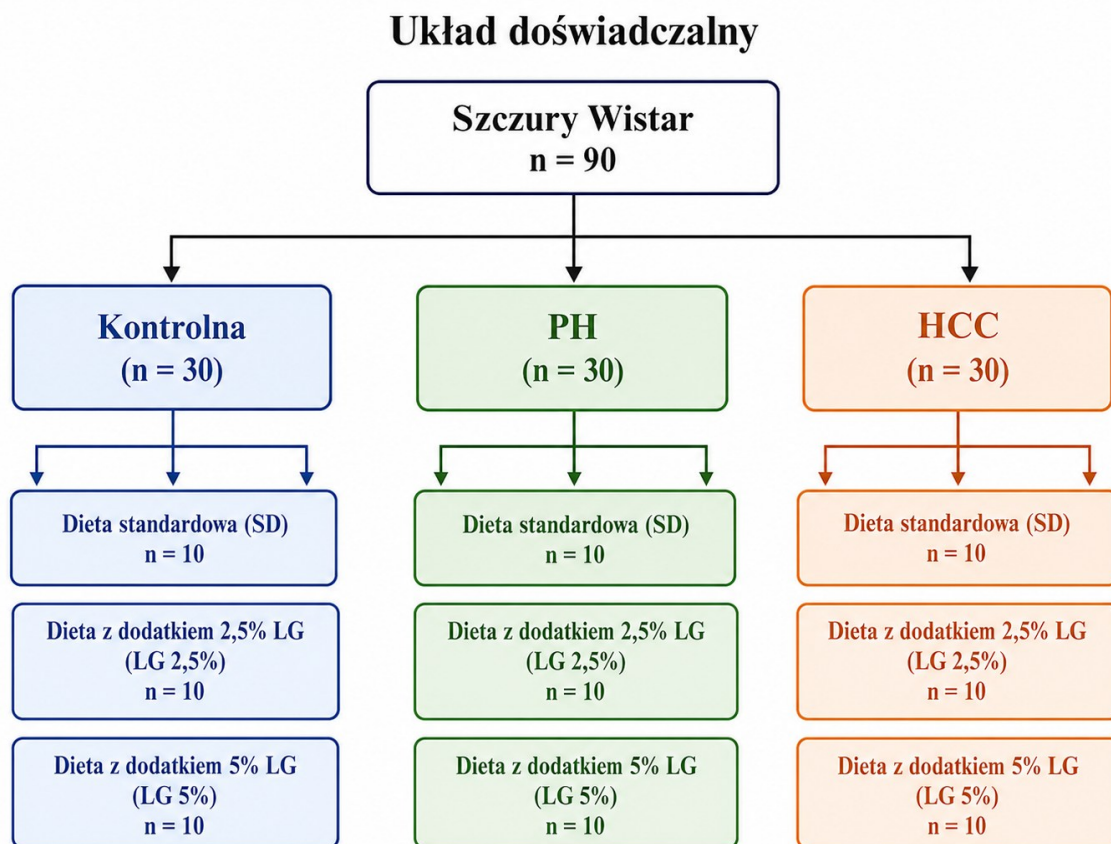
Dietę standardową (SD) stanowiła pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla zwierząt laboratoryjnych (LSM, Agropol, Motycz, Polska). Diety eksperymentalne, przygotowane przez wyżej wymienioną firmę, przygotowano na bazie SD przez dodatek 2,5% nutraceutyku LG (LG2,5%) oraz 5% LG (LG5%). Diety eksperymentalne były izokaloryczne i izobiałkowe w stosunku do SD. Skład SD przedstawiono w tabeli 1.

Składnik analityczny	Jednostka	Zawartość
Białko ogólne	%	16,00
Tłuszcz surowy	%	2,80
Popiół surowy	%	7,00
Włókno surowe	%	5,00
Lizyna	%	0,80
Aminokwasy siarkowe	%	0,50
Wapń	%	1,10
Fosfor	%	0,70
Sód	%	0,22
Witamina A	j.m./kg	8000
Witamina D3	j.m./kg	1000
Witamina E	mg/kg	50

Tabela 1. – Skład pełnoporcjowej mieszanki paszowej stanowiącej dietę standardową (SD) oraz podstawę diet eksperymentalnych (LG 2,5% i LG5%)

5.1.2 Układ doświadczalny

Schemat układu doświadczalnego przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schematyczny układ grup doświadczalnych

W pierwszym dniu doświadczenia (T0) przeprowadzono zabieg częściowej hepatektomii (PH). Zabieg polegał na resekcji 2/3 masy wątroby i był wykonywany zgodnie z klasycznym modelem Higginsa i Andersona¹¹⁶ u zwierząt z grup PH i HCC. Szczury znieczulano ogólnie przy użyciu chlorowodorku medetomidyny (Dorbene Vet, 1 mg/ml, Laboratorios SYVA, León, Hiszpania) w dawce 0,1 mg/kg m.c. i.m. oraz ketaminy (Vetaketam, 100 mg/ml, Vet-Agro, Lublin, Polska) w dawce 90 mg/kg m.c. i.m.

Po indukcji znieczulenia jamę brzuszną otwierano w linii białej, a następnie usuwano dwa płaty wątroby po wcześniejszym podwiązaniu naczyń nicią PGA (Atramat, Meksyk). Ranę zamykano dwuwarstwowo i zabezpieczano zgodnie z zasadami postępowania w chirurgii drobnych gryzoni.

W okresie pozabiegowym zwierzęta objęto antybiotykoterapią (amoksycylina, Amoxycylina 20% LA, Alfasan International B.V., Woerden, Holandia, 20 mg/kg m.c.) oraz analgezyją (meloksykam, Melovem 5 mg/ml, Dopharma Research B.V., Raamsdonksveer, Holandia, 2 mg/kg m.c.). Po siedmiodniowym okresie rekonwalescencji rozpoczęto podawanie paszy eksperymentalnej a szczurom z grup HCC rozpoczęto podawanie DEN - genotoksycznego kancerogenu, w wodzie do picia w stężeniu 50 mg/L, zgodnie z opisanym przez Solta i wsp¹¹⁷. dwuetapowym modelem indukcji HCC. W okresie indukcji HCC zwierzęta monitorowano klinicznie oraz raz w tygodniu kontrolowano masę ciała. Ponadto określano tygodniowe spożycie paszy i wody.

Doświadczenie przeprowadzono na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie (uchwała nr 37/2023 z dnia 3 kwietnia 2023 r. do wniosku nr 28/2023). Procedury eksperymentalne z wykorzystaniem zwierząt przeprowadzono w Wiwarium Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Wszystkie procedury wykonano zgodnie z obowiązującymi krajowymi i europejskimi aktami prawnymi oraz wytycznymi ARRIVE 2.0

5.2 Pobieranie materiału biologicznego

O ile nie zaznaczono inaczej w tekście, wszystkie odczynniki chemiczne użyte w doświadczeniu pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Merck, St. Louis, MO, USA).

W czterech punktach czasowych, obejmujących T0 (przed rozpoczęciem doświadczenia), T1 (14 dzień doświadczenia), T6 (49 dzień doświadczenia) oraz T12 (91 dzień, zakończenie doświadczenia) od każdego zwierzęcia pobierano krew pełną z żyły ogonowej. Materiał umieszczano w jałowych probówkach bez antykoagulantu. Probówki bez antykoagulantu niezwłocznie wirowano w celu oddzielenia surowicy, którą następnie transportowano na lodzie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analiz biochemicznych.

W czasie T12, podczas procedury rozpoczynającej izolację komórek wątroby, po uprzednim wykonaniu perfuzji wątroby roztworem Krebsa–Ringera (szczegółowy opis procedury przedstawiono w rozdziale dotyczącym izolacji pierwotnych hepatocytów) pobierano fragmenty wybranych płatów wątroby i dokładnie je przemywano w celu

wypłukania elementów morfotycznych krwi. W grupach HCC materiał pobierano z miejsc objętych procesem nowotworzenia. Po pobraniu wycinka miejsce to zabezpieczano jałową gąbką żelatynową Spongostan (Ethicon, Raritan, NJ, USA).

Część świeżego materiału przeznaczano do przygotowania homogenatów wykorzystywanych w dalszych analizach, w tym w testach ELISA. Próbkę umieszczano w jałowych krioprobówkach, natychmiast schładzano na lodzie, homogenizowano w roztworze buforowym z dodatkiem inhibitorów proteaz (cOmplete™, Roche, Bazylea, Szwajcaria), a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych oznaczeń. Drugą część tkanki przeznaczano do izolacji RNA; fragmenty o masie nieprzekraczającej 30 mg niezwłocznie przenoszono do roztworu stabilizującego RNA (RNAlater, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a następnie przechowywano w warunkach ultraniskiej temperatury, bez rozmrażania, zgodnie z zaleceniami producenta zestawów do izolacji.

Kolejne fragmenty tkanek utrwalano w 10% obojętnej, buforowanej formalinie w celu wykonania analiz histopatologicznych. Próbkę natychmiast zanurzano w roztworze, zachowując stosunek objętości formaliny do objętości tkanki wynoszący co najmniej 10:1, a następnie przechowywano przez minimum 24 godziny w temperaturze pokojowej przed dalszym procesowaniem histologicznym.

Cały pobrany materiał utrzymywano pod ścisłą kontrolą temperatury i zabezpieczano przed degradacją enzymatyczną oraz oksydacyjną poprzez szybkie chłodzenie, ograniczenie czasu manipulacji próbkami do niezbędnego minimum oraz maksymalne zmniejszenie ekspozycji na podwyższoną temperaturę. Każdą próbkę oznaczano datą pobrania, numerem zwierzęcia oraz numerem grupy doświadczalnej, co zapewniało pełną identyfikowalność materiału biologicznego.

5.3 Izolacja i hodowla hepatocytów

Izolację hepatocytów przeprowadzano metodą enzymatycznej perfuzji wątroby, stanowiącą standardową metodę izolacji hepatocytów ssaczych^{118,119}. Po wykonaniu laparotomii i odsłonięciu narządów jamy brzusznej kaniulowano żyłę wrotną przy użyciu jałowej kaniuli, zapewniając stabilne umocowanie kaniuli oraz brak przecieku roztworu perfuzyjnego. Następnie wątrobę poddawano sekwencyjnej perfuzji grawitacyjnej przy stałym przepływie 25–35 ml/min. Procedurę rozpoczynano od perfuzji buforem Krebsa-

Ringera pozbawionym jonów Ca^{2+} i zawierającym 0,5 mmol/L EDTA, którego zadaniem było rozluźnienie połączeń międzykomórkowych przez chelatację jonów wapnia. Po etapie chelatacji narząd przepłukiwano buforem Krebsa-Ringera bez Ca^{2+} i EDTA w celu usunięcia pozostałości roztworu chelatującego. Ostatnim etapem perfuzji było podanie roztworu Krebsa-Ringera zawierającego kolagenazę typu IV w stężeniu 0,05%–0,1%, w temperaturze 37°C, w celu kontrolowanej degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i rozluźnienia struktury zrazikowej. Perfuzję prowadzono do momentu widocznego zwiotczenia płatów wątrobowych, świadczącego o utracie integralności zrębu tkanki.

Po zakończeniu perfuzji wątrobę przenoszono aseptycznie na jałową szalkę Petriego zawierającą podłoże hodowlane DMEM/Ham's F-12 (1:1, v/v), gdzie rozdrabniano ją mechanicznie. Uzyskaną zawiesinę komórek przesączono przez nylonowe sita o średnicy porów 100 μm , a następnie kilkukrotnie wirowano przy małej prędkości (ok. 2500 rpm przez 3 minuty) w celu płukania zawiesiny i usunięcia zanieczyszczeń. Żywotność komórek oceniano bezpośrednio po izolacji metodą barwienia błękitem trypanu, odrzucając preparaty, w których żywotność spadała poniżej 85%.

Ostateczną zawiesinę hepatocytów przygotowywano w podłożu DMEM/Ham's-F12 z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS), deksametazonu, insuliny i mieszaniny antybiotyków (penicylina/streptomycyna/nystatyna). Komórki wysiewano na 24-dółkowe płytki hodowlane w gęstości 2×10^6 komórek/ml, dbając o równomierne rozmieszczenie zawiesiny i zapewnienie odpowiedniej adhezji komórek do podłoża. Hodowle utrzymywano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO_2 i 95% wilgotności. Doświadczenie *in vitro* rozpoczynano po 48 godzinach od wysiewu, kiedy hepatocyty osiągały pełną adhezję. Analizy wykonywano w czterech punktach czasowych: po 24 h, 48 h, oraz 7 i 14 dniach od uzyskania adhezji.

Aktywność metaboliczną hepatocytów oceniano za pomocą testu MTT, opartego na redukcji żółtej soli tetrazolowej, bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego, do nierozpuszczalnego, purpurowego formazanu przez mitochondrialne dehydrogenazy komórkowe. Po zakończeniu inkubacji podłoże w dołkach usuwano i zastępowano roztworem MTT (0,5 mg/ml), inkubowano przez 2–4 godziny, a następnie rozpuszczano powstały formazan w 10% roztworze dodecyllosiarczanu sodu (SDS). Absorbancję oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm z korekcją tła przy 630–690 nm. Wyniki przedstawiano jako procent aktywności metabolicznej względem kontroli.

Wytwarzanie tlenku azotu (NO) oceniano pośrednio na podstawie stężenia azotynów (NO_2^-), stanowiących stabilny produkt przemian NO w podłożu hodowlanym. Równe objętości próbki podłoża oraz świeżo przygotowanego odczynnika Griessa, zawierającego sulfanilamid (10 mg), dichlorowodorek N-(1-naftylo)etylenodiaminy (1 mg) oraz 2,5% kwas ortofosforowy(V) (H_3PO_4 ; Avantor Performance Materials), mieszano, a następnie inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Po inkubacji oznaczano absorbancję spektrofotometrycznie. Stężenie azotynów wyznaczano na podstawie krzywej standardowej sporządzonej z NaNO_2 i wyrażano w μM .

Wytwarzanie anionorodnika ponadtlennkowego (O_2^-) oceniano metodą redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT). Równe objętości podłoża hodowlanego i 0,1% roztworu NBT mieszano oraz inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Absorbancję powstającego produktu redukcji NBT oznaczano spektrofotometrycznie. Stopień redukcji NBT interpretowano jako pośredni wskaźnik wytwarzania O_2^- .

5.4 Analizy biochemiczne surowicy krwi

Oznaczenia parametrów biochemicznych w surowicy, obejmujące aktywność aminotransferaz alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST), γ -glutamylotransferazy (GGT), fosfatazy alkaicznej (ALP) oraz stężenie albuminy, wykonywano przy użyciu analizatora biochemicznego BS-120 (Mindray, Shenzhen, Chiny), zgodnie z zaleceniami producenta dotyczącymi metodyki i procedur kalibracyjnych.

5.5 Izolacja RNA i qPCR

Izolację całkowitego RNA z fragmentów wątroby przeprowadzano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Fragment tkanki o masie nieprzekraczającej 20 mg homogenizowano mechanicznie w 350 μl buforu RLT zawierającego 1% β -merkaptioetanolu, do uzyskania jednorodnego homogenatu. Następnie homogenat przenoszono do probówek RNase-free i wirowano przez 3 minuty przy 30 000 rpm w celu usunięcia nierozdrobnionych fragmentów tkanki. Klarowny supernatant przenoszono do nowych probówek, dodawano równą objętość 70% etanolu, a całość dokładnie mieszano przez kilkukrotne odwrócenie probówki.

Uzyskaną mieszaninę nanoszono na kolumny RNeasy Mini, umożliwiając wiązanie RNA z membraną krzemionkową. Kolumny poddawano sekwencyjnemu płukaniu buforami RW1 oraz dwukrotnie RPE, każdorazowo odwirowując zgodnie z instrukcją zestawu (ok. 10 000 rpm przez 15 s). Po zakończeniu płukania kolumnę dodatkowo wirowano w celu jej osuszenia, a następnie RNA eluowano w objętości 40 µl wody RNase-free. Elucję poprzedzano 1-minutową inkubacją na membranie, po czym prowadzono wirowanie przy 10 000 rpm przez 60 s. Otrzymany preparat RNA przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz, unikając powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania. Stężenie oraz czystość wyizolowanego RNA oznaczano spektrofotometrycznie z użyciem aparatu NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Do syntezy komplementarnego DNA (cDNA) wykorzystywano 250 ng RNA całkowitego. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z użyciem zestawu TranScriba Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), w obecności starterów oligo(dT), zgodnie z zaleceniami producenta, w termocyklerze T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Uzyskane cDNA wykorzystywano następnie do analizy ekspresji genów metodą real-time PCR (RT-qPCR) z zastosowaniem barwnika SYBR™ Green. Reakcje prowadzono z użyciem zestawu RT PCR Mix SYBR™ (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), w obecności specyficznych starterów (Genomed, Warszawa, Polska; sekwencje starterów przedstawiono w tabeli 2), w objętości końcowej 10 µl, zgodnie z zaleceniami producenta. Amplifikację prowadzono w aparacie CFX Opus 96 Real-Time PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Wartości Ct odczytywano i analizowano z wykorzystaniem oprogramowania CFX Maestro Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Względną ekspresję genów obliczano metodą $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, przyjmując ekspresję β -aktyny jako kontrolę endogenną (gen referencyjny). W obliczeniach stosowano zależności:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{genu docelowego}) - \text{Ct}(\text{genu referencyjnego}),$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{próby badanej}) - \Delta\text{Ct}(\text{próby kontrolnej}),$$

a znormalizowaną ekspresję wyrażano jako współczynnik zmian R (fold change): $R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Wartości R interpretowano następująco: 0,8–1,2 jako ekspresję porównywalną z kontrolą,

$R < 0,8$ jako obniżoną ekspresję, natomiast $R > 1,2$ jako podwyższoną ekspresję genu.

Gen	Sekwencja startera	Temperatura przyłączania	Źródło literaturowe
<i>Tp53</i>	F: 5'-GAAGACTCCAGGTAGGAAGC-3'	52°C	120
	R: 5'-GTCTCTCCCAGGACAGGTA-3'		
<i>Bax</i>	F: 5'- CGAGCTGATCAGAACCATCA-3'	52 °C	121
	R: 5'-CTCAGCCCATCTTCTTCCAG-3'		
<i>Bcl2</i>	F: 5'-TGCAGAGATGTCCAGTCAGC-3'	59°C	122
	R: 5'-CATCCACAGAGCGATGTTGT-3'		
<i>Hnf4α</i>	F: 5'-AAATGTGCAGGTGTTGACCA-3'	57°C	123
	R: 5'-CACGCTCCTCCTGAAGAATC-3'		
β -aktyna	F: 5'-CCCGCGGAGTACAACCTTCT-3'	60°C	124
	R: 5'- CGT CAT CCA TGG CGA ACT-3'		

Tabela 2. Sekwencje starterów użyte do reakcji real-time PCR.

5.6 Testy immunoenzymatyczne

Stężenia wybranych białek prozapalnych oraz białek regulatorowych szlaków śmierci komórkowej w homogenatach wątroby oznaczano z wykorzystaniem komercyjnych zestawów immunoenzymatycznych typu ELISA firmy Cloud-Clone Corp. (Katy, TX, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Analizowano: RIPK3, RIPK1, BAX, IL-6, TNF- α , AFP, PKM2.

Fragmenty wątroby o masie nieprzekraczającej 100 mg homogenizowano w schłodzonym buforze do homogenizacji tkanek, przygotowanym na bazie buforu fosforanowego z dodatkiem inhibitorów proteaz. Homogenizację prowadzono mechanicznie przy użyciu homogenizatora (Diox 900, Heidolph Instruments, Schwabach, Niemcy) w warunkach chłodzenia na lodzie, a następnie próbki wirowano w temperaturze 4°C (10 000 rpm, 10–15 min), w celu usunięcia resztek tkanek oraz frakcji nierozpuszczalnych. Klarowny supernatant przenoszono do nowych, jałowych probówek, oznaczano w nim stężenie białka metodą Lowry'ego, po czym próbek używano bezpośrednio do testów ELISA.

Przed wykonaniem oznaczeń wszystkie odczynniki oraz próbki doprowadzano do temperatury pokojowej. Płytki dostarczone w zestawach zawierały studzienki opłaszczane przeciwciałami swoistymi dla odpowiednich antygenów (RIPK1, RIPK3,

BAX, IL-6, TNF- α , AFP, PKM2). Krzywe wzorcowe przygotowywano przez seryjne rozcieńczenia standardów dostarczonych przez producenta w odpowiednim buforze rozcieńczającym, zgodnie z kartą katalogową zestawu. Homogenaty tkanek rozcieńczano w buforze dostarczonym w zestawie, tak aby mieściły się w zakresie liniowości krzywej kalibracyjnej. Do każdej studzienki nanoszono odpowiednią objętość standardu lub próbek badanych. Następnie dodawano roztwór przeciwciała detekcyjnego, a płytki inkubowano przez czas określony przez producenta w temperaturze pokojowej lub 37°C. Po zakończeniu inkubacji płytki kilkakrotnie płukano buforem do mycia w celu usunięcia niezwiązanego materiału. Po etapie wiązania antygen–przeciwciało oraz dodaniu koniugatu enzymatycznego do studzienek wprowadzano roztwór substratu chromogenego. Płytki inkubowano w ciemności przez czas wskazany przez producenta, a następnie reakcję zatrzymywano przez dodanie roztworu hamującego reakcję. Absorbancję w poszczególnych studzienkach mierzono przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika płytek SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Niemcy).

Zgodnie z wytycznymi producenta zestawów wyniki wyrażano jako stężenie oznaczanego białka odniesione do zawartości białka całkowitego oznaczonego metodą Lowry’ego, co umożliwiało porównanie próbek o zróżnicowanej zawartości białka. Wszystkie pomiary wykonywano w co najmniej dwóch powtórzeniach technicznych, a w każdej serii oznaczeń uwzględniano kontrolę tła (blank) oraz kontrolę bez antygenu, co pozwalało na ocenę ewentualnego sygnału nieswoistego.

5.7 Izolacja frakcji mikrosomalnej i cytozolowej

Izolację frakcji mikrosomalnej i cytozolowej z tkanki wątroby prowadzono metodą różnicowego ultrawierowania. Jako bufor homogenizacyjny zastosowano roztwór zawierający fosforan dipotasowy (K_2HPO_4) w stężeniu 0,10 mol/l, chlorek potasu (KCl) w stężeniu 0,15 mol/l oraz EDTA w stężeniu 1,4 mmol/l, o pH 7,4. Wszystkie roztwory przygotowywano w wodzie dejonizowanej, a następnie schładzano do 4°C przed użyciem.

Około 1 g świeżej tkanki wątrobowej homogenizowano na lodzie w odpowiedniej objętości schłodzonego bufora homogenizacyjnego (4 ml/g tkanki), wykorzystując homogenizator mechaniczny, do uzyskania jednorodnego homogenatu pozbawionego widocznych fragmentów tkankowych. Uzyskany homogenat przenoszono do

schłodzonych probówek i wirowano przez 30 minut w temperaturze 4°C z prędkością 10 000 rpm. Po zakończeniu wirowania supernatant, zawierający lżejsze frakcje subkomórkowe, ostrożnie zbierano, unikając naruszenia osadu, i przenoszono do probówek przystosowanych do ultrawirowania.

Następnie supernatant wirowano w ultrawirówce w temperaturze 4°C przez 70 minut z prędkością 33 000 rpm. Uzyskany po tym etapie supernatant stanowił frakcję cytozolową. Frakcję tę niezwłocznie rozdzielano na odpowiednie objętościowo alikwoty w jałowych, schłodzonych probówkach, a następnie natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze –80°C do czasu analiz, unikając wielokrotnych cykli zamrażania i rozmrażania.

Osad powstały po pierwszym ultrawirowaniu, zawierający głównie frakcje błonowe, w tym struktury mikrosomalne, zawieszano ponownie w 15 ml schłodzonego buforu homogenizacyjnego. Zawiesinę dokładnie mieszano na lodzie do pełnego rozproszenia osadu, a następnie ponownie wirowano w ultrawirówce w identycznych warunkach przez 45 minut. Po zakończeniu drugiego ultrawirowania supernatant odrzucano, natomiast osad pozostający na dnie probówki uznawano za frakcję mikrosomalną. Osad ten zawieszano w odpowiedniej objętości schłodzonego buforu homogenizacyjnego, uzyskując koncentrat frakcji mikrosomalnej, który następnie natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze –80°C do czasu dalszych oznaczeń enzymatycznych.

Wszystkie etapy procedury, począwszy od homogenizacji, przez kolejne etapy wirowania, aż po porcjowanie i zamrażanie frakcji, prowadzono w warunkach obniżonej temperatury (na lodzie lub w 4°C), ograniczając czas manipulacji próbkami do niezbędnego minimum. Celem takiego postępowania była maksymalna ochrona badanych frakcji przed degradacją białek i spadkiem aktywności enzymatycznej, co jest kluczowe dla wiarygodności późniejszych analiz biochemicznych.

5.8 Określenie aktywności enzymów cytochromu P450, detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych

Aktywność wybranych enzymów mikrosomalnych sprzężonych z układem cytochromu P450 oraz enzymów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych oznaczano we frakcjach mikrosomalnych oraz cytozolowych uzyskanych zgodnie z procedurą opisaną

w rozdziale 5.7. Pomiary fluorescencji wykonywano przy użyciu fluorymetru LS 45 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), natomiast oznaczenia spektrofotometryczne w spektrofotometrze dwuwiązkowym Lambda 365+ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) z wykorzystaniem kuwet kwarcowych lub plastikowych, w zależności od metody, o długości drogi optycznej 1 cm. Aktywność enzymatyczną wyrażano jako ilość produktu reakcji powstającą w jednostce czasu, przeliczoną na 1 mg białka całkowitego frakcji, oznaczonego metodą Lowry'ego.

Przed wykonaniem oznaczeń odpowiednie objętości frakcji mikrosomalnej lub cytozolowej rozmrażano pojedynczo na lodzie, unikając powtórnych cykli zamrażania i rozmrażania. W razie potrzeby próbki rozcieńczano schłodzonym buforem odpowiadającym warunkom reakcji, tak aby uzyskać liniowy zakres odpowiedzi enzymatycznej. Wszystkie inkubacje prowadzono w łaźni wodnej o stabilizowanej temperaturze 37°C, a odczynniki przygotowywano bezpośrednio przed użyciem.

5.8.1. Aktywność ECOD

Aktywność ECOD oznaczano z wykorzystaniem 7-etoksykumaryny jako substratu i pomiaru fluorescencji powstającej 7-hydroksykumaryny. Przygotowywano bufor Tris-HCl (pH 7,4), roztwór $MgCl_2$, roztwór 7-etoksykumaryny w etanolu, bufor glicynowo-NaOH (pH 10,3) oraz roztwory kofaktorów układu przenośników elektronów: $NADP^+$, glukozo-6-fosforanu (G6P) oraz dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G6PDH), tworzących regenerujący układ NADPH. Dla każdej próbki przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą bufor Tris-HCl, $MgCl_2$, 7-etoksykumarynę, frakcję mikrosomalną oraz roztwór kofaktorów ($NADP^+$, G6P) w objętości końcowej 1 ml. Dla każdej próbki wykonywano co najmniej trzy powtórzenia techniczne oraz dwie próby ślepe, bez aktywnego enzymu. Mieszaniny reakcyjne preinkubowano przez 5 minut w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Do prób ślepych dodawano kwas trójchlorooctowy (TCA) w celu natychmiastowego zatrzymania reakcji enzymatycznej, natomiast do prób badanych dodawano G6PDH, inicjując regenerację NADPH i właściwą reakcję enzymatyczną. Inkubację kontynuowano przez kolejne 10 minut w temperaturze 37°C. Po upływie czasu inkubacji reakcję zatrzymywano przez dodanie TCA do prób badanych, po czym do wszystkich probówek dodawano bufor glicynowo-NaOH, energicznie mieszano (vortex, ok. 15 s) i wirowano przez 5 minut przy ok. 3000 rpm. Fluorescencję produktu, 7-

hydroksykumaryny, mierzono w supernatancie fluorometrycznie przy długości fali wzbudzenia ok. 390 nm i emisji 440nm.

5.8.2. Aktywność EROD

Aktywność EROD oznaczano z wykorzystaniem 7-etoksyrezurfiny jako substratu i pomiaru fluorescencji powstającej rezurfiny. Przygotowywano bufor Tris-HCl (pH 7,4), roztwór $MgCl_2$, 7-etoksyrezurfiny rozpuszczonej w niewielkiej objętości etanolu, roztwory kofaktorów ($NADP^+$, G6P) oraz G6PDH. Dla każdej próbki przygotowywano mieszaninę zawierającą bufor Tris-HCl, $MgCl_2$, 7-etoksyrezurfiny, frakcję mikrosomalną i układ kofaktorów. Dla każdej próbki wykonywano trzy powtórzenia techniczne i dwie próby ślepe. Mieszaninę preinkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C. Do prób ślepych dodawano roztwór NaOH, natomiast do prób badanych dodawano G6PDH, inicjując reakcję. Po kolejnych 5 minutach inkubacji w temperaturze 37°C reakcję zatrzymywano przez dodanie NaOH, a następnie próbki wirowano (3000 rpm, 5 minut) w celu usunięcia ewentualnych strąców.

Fluorescencję rezurfiny mierzono fluorometrycznie przy długości fali wzbudzenia ok. 530 nm i emisji ok. 585 nm

5.8.3 Aktywność AnH

Aktywność AnH oznaczano z wykorzystaniem aniliny jako substratu, a powstający produkt reakcji oznaczano spektrofotometrycznie po reakcji barwnej z fenolem. Dla każdej próbki przygotowywano mieszaninę zawierającą bufor fosforanowy, $MgCl_2$, anilinę, frakcję mikrosomalną oraz układ kofaktorów ($NADP^+$, G6P). Dla każdej próbki wykonywano trzy powtórzenia techniczne oraz dwie próby ślepe. Po preinkubacji (5 minut, 37°C) do prób ślepych dodawano TCA, natomiast do prób badanych dodawano G6PDH, inicjując reakcję enzymatyczną. Inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji reakcję zatrzymywano przez dodanie TCA, a następnie próbki wirowano przez 10 minut w 4000 rpm. Supernatant mieszano z 2% roztworem fenolu (1:1, v/v) i inkubowano przez kolejne 30 minut w łaźni wodnej w 37°C, umożliwiając pełne rozwinięcie reakcji barwnej. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 630 nm

5.8.4. Aktywność BqD

Aktywność enzymatyczną BqD oznaczano z wykorzystaniem 7-benzylooksychinoliny jako substratu fluorogenicznego. Dla każdej próbki przygotowywano mieszaninę zawierającą bufor Tris-HCl, $MgCl_2$, 7-benzylooksychinolinę, frakcję mikrosomalną oraz kofaktory. Dla każdej próbki wykonywano trzy powtórzenia techniczne i dwie próby ślepe. Mieszaniny preinkubowano przez 5 minut w temperaturze $37^\circ C$. Do prób ślepych dodawano acetonitryl w objętości zatrzymującej reakcję, natomiast do prób badanych dodawano G6PDH. Inkubację prowadzono przez 15 minut w temperaturze $37^\circ C$, po czym reakcję zatrzymywano przez dodanie acetonitrylu. Następnie do wszystkich próbek dodawano bufor Tris-HCl, dokładnie mieszano i wirowano (4000 rpm, 6 minut) w celu usunięcia ewentualnych strąców.

Fluorescencję produktu debenzylacji mierzono przy długości fali wzbudzenia 410 nm i emisji 530 nm.

5.8.5. Aktywność katalazy

Aktywność katalazy oznaczano spektrofotometrycznie, śledząc spadek absorbancji nadtlenu wodoru (H_2O_2) przy długości fali 240 nm w spektrofotometrze dwuwiązkowym. Do oznaczenia przygotowywano bufor fosforanowy (50 mmol/L, pH 7,0) oraz świeży roztwór H_2O_2 . Próbkę badaną stanowiła odpowiednio rozcieńczona frakcja cytozolowa w buforze fosforanowym z dodatkiem H_2O_2 , natomiast próbkę odniesienia stanowiła taka sama objętość rozcieńczonej frakcji cytozolowej z dodatkiem buforu bez H_2O_2 . Pomiar prowadzono w kuwetach kwarcowych, w temperaturze $25^\circ C$, rejestrując spadek absorbancji przy 240 nm co 15 sekund przez 2 minuty.

Aktywność katalazy obliczano na podstawie nachylenia krzywej zaniku absorbancji H_2O_2 ($\epsilon \approx 39,4 M^{-1}cm^{-1}$), podając wynik jako $\mu mol H_2O_2$ rozłożonego/min/mg białka.

5.8.6. Aktywność DT-diaforazy

Aktywność DT-diaforazy oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem dichlorofenolindofenolu (DCPIP) jako akceptora elektronów. Przygotowywano bufor fosforanowy (50 mmol/L, pH 7,4), roztwór DCPIP oraz roztwór NADPH. Próbkę badaną stanowiła frakcja cytozolowa rozcieńczona w buforze fosforanowym z dodatkiem DCPIP, natomiast próbkę odniesienia stanowiła ta sama mieszanina bez NADPH. Po ustabilizowaniu temperatury w kuwecie do próbki badanej dodawano NADPH, inicjując reakcję redukcji DCPIP, a do próbki odniesienia dodawano równoważną objętość buforu. Zmianę absorbancji DCPIP monitorowano przy długości fali 630 nm przez 3 minuty, wykonując odczyty co 15 sekund. Spadek absorbancji w czasie odpowiadał szybkości redukcji DCPIP. Aktywność enzymu wyrażano w jednostkach na mg białka na podstawie współczynnika ekstynkcji DCPIP oraz nachylenia krzywej zmian absorbancji.

5.8.7. Aktywność dysmutazy nadtlenkowej (SOD)

Aktywność SOD oznaczano metodą opartą na hamowaniu autooksydacji pirogalolu w środowisku zasadowym, monitorując zmianę absorbancji przy długości fali 420 nm. Do kuwety dodawano bufor Tris-HCl, frakcję cytozolową oraz, po ustabilizowaniu w temperaturze 37°C, roztwór pirogalolu, rozpoczynając natychmiast rejestrację wzrostu absorbancji przez 2 minuty, z odczytami co 15 s. Aktywność SOD obliczano jako procent inhibicji szybkości autooksydacji pirogalolu w obecności badanej próbki względem kontroli bez enzymu.

5.8.8 Aktywność GST

Aktywność GST oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) jako substratu modelowego. Reakcję monitorowano, śledząc wzrost absorbancji kompleksu zredukowanego glutationu (GSH) i CDNB przy 340 nm. Przygotowywano roztwór GSH, roztwór CDNB oraz bufor PBS (pH 6,5) jako bufor reakcyjny. Dla każdej próby przygotowywano koktajl reakcyjny o objętości 1 ml, zawierający: 980 µl PBS pH 6,5, 10 µl roztworu CDNB oraz 10 µl roztworu GSH. Mieszaninę dokładnie mieszano aż do uzyskania klarownego roztworu. Do każdej kuwety dodawano 900 µl przygotowanego koktajlu reakcyjnego i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 30°C w komorze spektrofotometru. Następnie do próby badanej dodawano 100 µl frakcji cytozolowej, natomiast do próby ślepej 100 µl buforu PBS.

Zmianę absorbancji przy 340 nm rejestrowano w trybie kinetycznym przez 5 minut, z pomiarami co 15 sekund. Aktywność GST obliczano na podstawie nachylenia krzywej zmian absorbancji w czasie, wykorzystując współczynnik ekstynkcji kompleksu GSH–CDNB ($\epsilon \approx 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), i wyrażano jako μmol produktu/min/mg białka.

5.8.9. Oznaczenie stężenia malonodialdehydu (MDA)

Stężenie MDA jako wskaźnika peroksydacji lipidów, oznaczano z wykorzystaniem reakcji MDA z kwasem tiobarbiturowym (TBA). Homogenat tkanki inkubowano przez 10 minut z TCA w celu denaturacji białek i ich wytrącenia, a następnie dodawano roztwór TBA rozpuszczony w NaOH. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze wrzenia przez 15 minut, umożliwiając powstanie kompleksu MDA-TBA. Po ostudzeniu próbek dodawano n-butanol, energicznie wytrząsano przez około 10 minut, a następnie wirowano przez 10 minut przy 4000 rpm. Górną warstwę butanolową, zawierającą kompleks MDA-TBA, zbierano i mierzono jej absorbancję przy długości fali 532 nm. Stężenie MDA obliczano na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej z użyciem standardu MDA, wyrażając wynik w nmol MDA/mg białka.

5.8.10 Oznaczenie stężenia białek karbonylowanych

Poziom białek karbonylowanych, jako wskaźnik oksydacyjnych modyfikacji białek, oznaczano metodą z użyciem 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH). Około 1 g tkanki homogenizowano na lodzie w buforze zawierającym butylowany hydroksytoluen (BHT), KCl oraz EDTA, na lodzie, w celu ograniczenia wtórnej oksydacji. Dla każdej próbki wykonywano trzy powtórzenia techniczne i dwie próby ślepe. Do homogenatu w próbkach badanych dodawano roztwór DNPH, natomiast do prób ślepych zamiast DNPH dodawano równoważną objętość HCl jako kontrolę tła. Próbkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, utrzymując ciągle mieszanie w celu zapewnienia pełnej reakcji białek z DNPH. Po zakończeniu inkubacji do wszystkich próbek dodawano TCA, a próbki wytrząsano horyzontalnie przez 15 minut. Następnie wirowano przez 10 minut przy 3000 rpm, zlewano supernatant, a otrzymany osad płukano trzykrotnie w mieszaninie etanol/octan etylu (1:1, v/v), każdorazowo wytrząsając próbki i odwirowując osad. Po zakończeniu płukania osad zawieszano w roztworze guanidyny, intensywnie wytrząsano horyzontalnie przez 15 minut, a następnie wirowano przez 10 minut przy

3000 rpm w celu usunięcia nierozpuszczonych resztek. Absorbancję supernatantu mierzono w kuwecie kwarcowej przy długości fali 390 nm.

5.9 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programów STATISTICA 13.1 (StatSoft Polska, Kraków), GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) oraz środowiska R (R Core Team, Wiedeń, Austria). Dane zaprezentowano jako średnie wraz z odchyleniem standardowym. W badaniu zastosowano modele wieloczynnikowe uwzględniające wpływ diety, uszkodzenia wątroby bądź czasu, a także interakcje pomiędzy tymi czynnikami. W przypadku pomiarów powtarzanych u tych samych osobników, w celu uwzględnienia korelacji wewnątrzgrupowych, zastosowano błędy standardowe odporne na grupowanie według identyfikatora zwierzęcia. Istotność efektów głównych oraz interakcji weryfikowano za pomocą testów Walda opartych na statystyce χ^2 . Wartości p dla testów globalnych korygowano metodą Benjaminiego–Hochberga, aby kontrolować odsetek fałszywych odkryć (FDR). Szczegółowe porównania między grupami oparto na estymowanych średnich brzegowych (EMM) z zastosowaniem korekty Šidáka dla testów wielokrotnych.

W analizach uwzględniających uszkodzenie wątroby zestawiano diety w obrębie tej samej grupy oraz grupy w obrębie tej samej diety; w analizach czasowych porównywano natomiast diety w poszczególnych punktach pomiarowych oraz kolejne punkty czasowe w ramach tej samej diety. Siłę i kierunek zależności pomiędzy udziałem LG w diecie a analizowanymi parametrami oceniono za pomocą współczynnika korelacji Pearsona (r). Ponieważ przeprowadzono wiele jednoczesnych testów korelacji, uzyskane wartości p poddano korekcie Benjaminiego–Hochberga, a tak skorygowane wartości oznaczano jako q. Za istotne statystycznie uznawano zależności, dla których $q \leq 0,05$. Dla pozostałych testów za próg istotności przyjęto skorygowaną wartość $p \leq 0,05$.

Wyniki analizy RT-qPCR opracowano metodą $\Delta\text{Ct}/\Delta\Delta\text{Ct}$, przyjmując β -aktynę jako gen referencyjny, a grupę zdrowych zwierząt karmionych SD jako kalibrator. Względną ekspresję genów wyliczono metodą $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, przy czym właściwe obliczenia statystyczne przeprowadzono bezpośrednio na wartościach ΔCt w odniesieniu do każdego genu osobno.

6. Wyniki

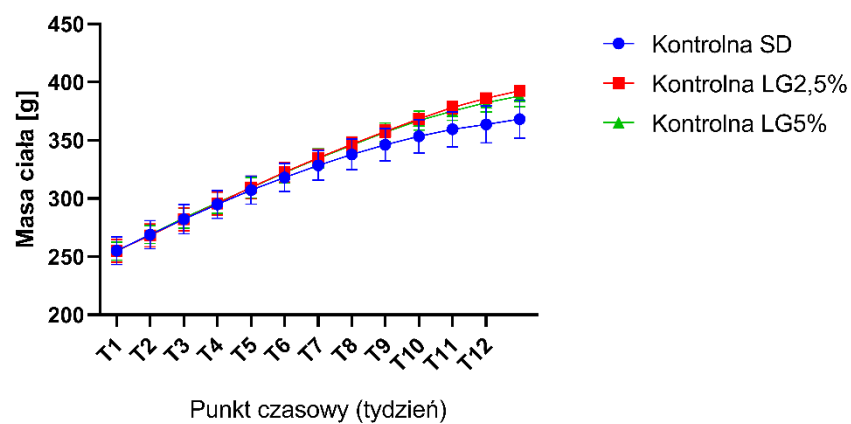
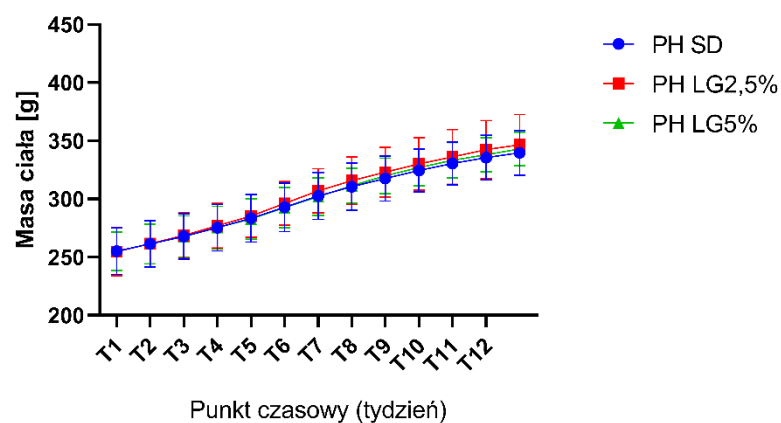
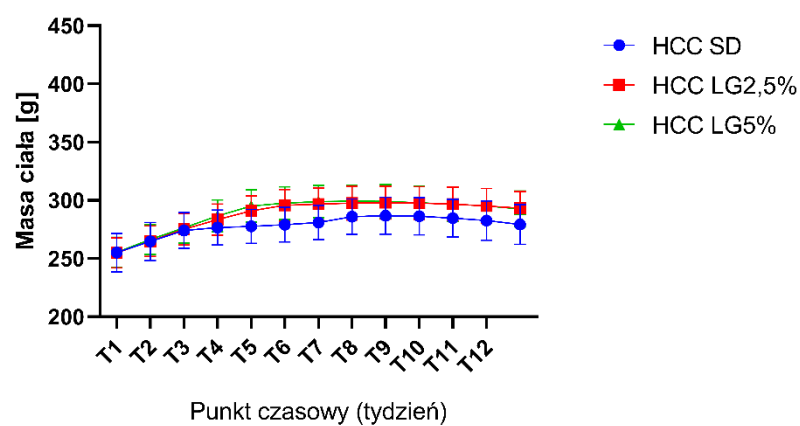
6.1 Masa ciała, spożycie paszy i wody

Cotygodniowe pomiary wykazały najszybsze przyrosty masy ciała u zwierząt kontrolnych, wolniejszy przyrost po PH oraz najwolniejszy w grupie HCC. Tendencja ta była wyraźna i nasilała się wraz z czasem trwania doświadczenia. (Ryc. 2)

Zastosowanie LG wiązało się ze zwiększeniem przyrostów masy ciała zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach z nowotworowym oraz nienowotworowym uszkodzeniem wątroby. W grupie kontrolnej początkowa masa ciała zwierząt wynosiła $255,0 \pm 11,95$ g i stopniowo rosła przez cały okres doświadczenia, osiągając w punkcie końcowym (T12) średnio $368,3 \pm 16,24$ g u zwierząt żywionych SD, $392,7 \pm 4,42$ g u zwierząt żywionych LG2,5% oraz $388,0 \pm 9,06$ g u zwierząt żywionych LG5%. W tym samym punkcie czasowym w grupie PH wartości te wynosiły odpowiednio $339,7 \pm 19,21$ g, $346,5 \pm 26,07$ g oraz $343,0 \pm 14,34$ g dla SD, LG2,5% i LG5%. U szczurów z HCC masa ciała w T12 była niższa niż w grupie kontrolnej i PH, wynosiła $279,3 \pm 17,1$ g przy SD, $293,3 \pm 24,51$ g przy LG2,5% oraz $292,5 \pm 15,47$ g przy LG5%. W grupie HCC żywionej SD masa ciała w ostatnim tygodniu doświadczenia, po wcześniejszym niewielkim wzroście, była zbliżona do wartości obserwowanej w czwartym tygodniu doświadczenia (odpowiednio $276,6 \pm 15$ g vs $279,3 \pm 17,1$ g). Dodatek LG w obu dawkach nie powodował istotnych zmian przyrostów masy ciała w grupie kontrolnej i PH, natomiast w grupie HCC wiązał się z istotnym statystycznie ($p < 0,05$) wzrostem masy ciała zwierząt. W tej grupie w T12 obserwowano $293 \pm 24,5$ g przy LG2,5% i $292,5 \pm 15,5$ g przy LG5%.

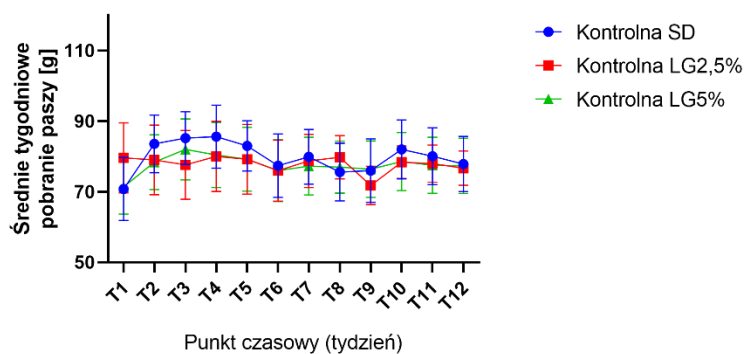
W trakcie doświadczenia spożycie paszy przez jednego osobnika pozostawało względnie stabilne we wszystkich grupach. Najwyższe średnie tygodniowe spożycie paszy wynoszące $92,8 \pm 8,76$ g obserwowano w T2 w grupie PH otrzymującej SD, natomiast najniższe w T1 w grupie HCC otrzymującej paszę LG2,5% ($67,4 \pm 9,28$ g). Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w spożyciu paszy między grupami eksperymentalnymi. Średnie tygodniowe pobranie paszy przez jednego szczura w poszczególnych grupach przedstawiono na rycinie 3

Podobnie dzienne spożycie wody przez szczury pozostawało stałe w całym okresie doświadczenia i nie różniło się istotnie pomiędzy grupami, wynosząc od 19,8 ml/dzień do 24,3 ml/dzień.

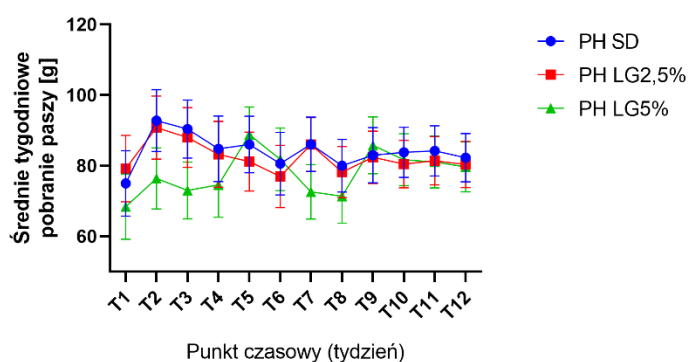
A**B****C**

Rycina 2. Masa ciała zwierząt w kolejnych punktach doświadczenia. Przedstawiono średnie wartości masy ciała (g) $\pm$ odchylenie standardowe w punktach czasowych T0–T12 dla zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG.

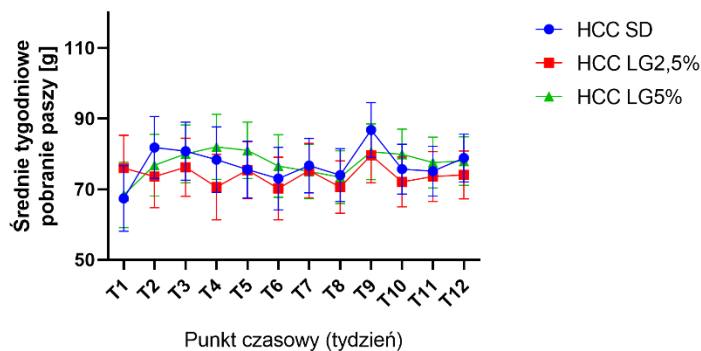
A



B



C



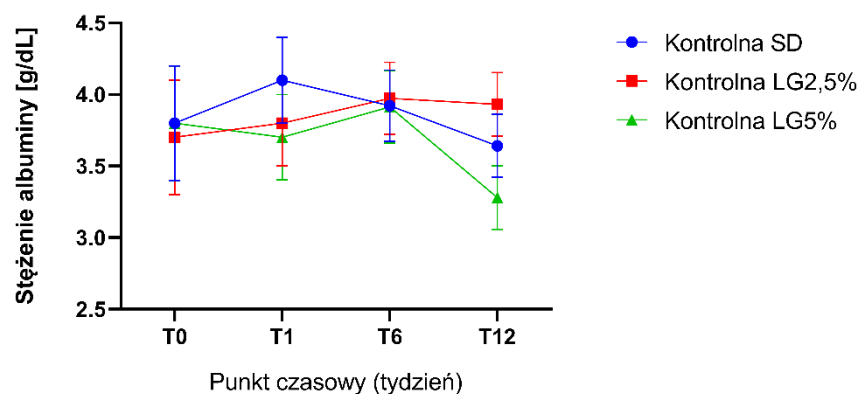
Rycina 3. Średnie pobranie paszy przez jednego szczura w kolejnych punktach doświadczenia. Przedstawiono średnie wartości pobrania paszy (g) $\pm$ odchylenie standardowe w punktach czasowych T0–T12 dla zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG.

6.2 Parametry biochemiczne surowicy krwi

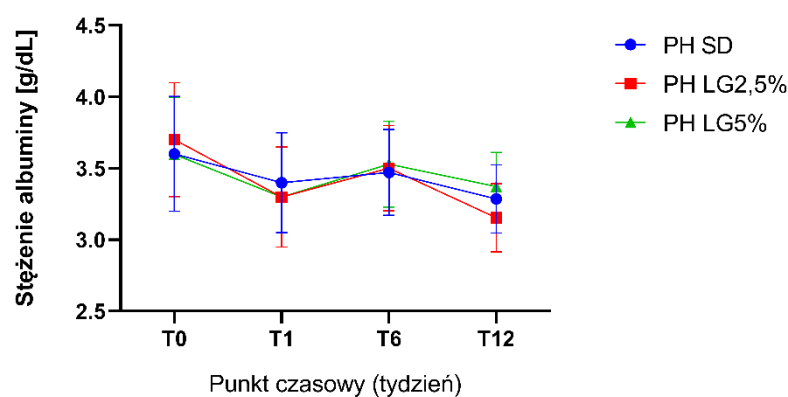
6.2.1 Albumina

W grupie kontrolnej w T0 surowicze stężenie albuminy było zbliżone niezależnie od stosowanej diety i mieściło się w zakresie 3,7 g/dL–3,8 g/dL. W kolejnych punktach doświadczenia w grupie SD obserwowano wzrost do $4,10 \pm 0,3$ g/dL w T1, a następnie obniżenie do $3,64 \pm 0,22$ g/dL w T12. W grupie LG2,5% stężenie albuminy nie obniżało się w końcowej fazie doświadczenia, w T6 i T12 pozostawało wysokie i wynosiło odpowiednio $3,97 \pm 0,25$ g/dL oraz $3,93 \pm 0,22$ g/dL. Odmienny przebieg obserwowano po zastosowaniu diety LG5%, gdzie w T12 stężenie albuminy obniżało się do $3,28 \pm 0,22$ g/dL. Wykazane różnice miały znaczenie statystyczne ($p < 0,05$). Zwierzęta po PH wykazywały łagodny spadek surowiczego stężenia albuminy od T0 do T6, a zastosowanie LG nie zmieniało istotnie statystycznie tej tendencji. W modelu HCC stężenie albuminy również obniżało się w czasie. W grupie SD wartości zmniejszały się z $3,80 \pm 0,40$ g/dL w T0 do $3,25 \pm 0,35$ g/dL– $3,27 \pm 0,26$ g/dL w T6–T12. Jedynie LG5% sprzyjał utrzymaniu w T12 wyższego surowiczego stężenia albuminy, wynoszącego $3,49 \pm 0,26$ g/dL, jednak różnice między dietami nie osiągały progu istotności statystycznej. (Ryc. 4)

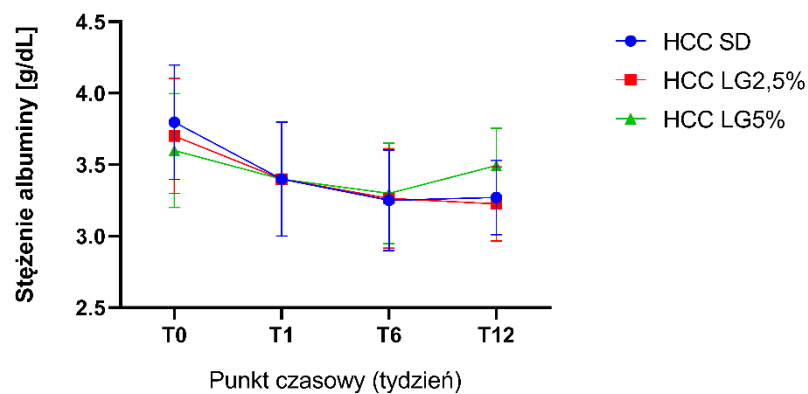
A



B



C



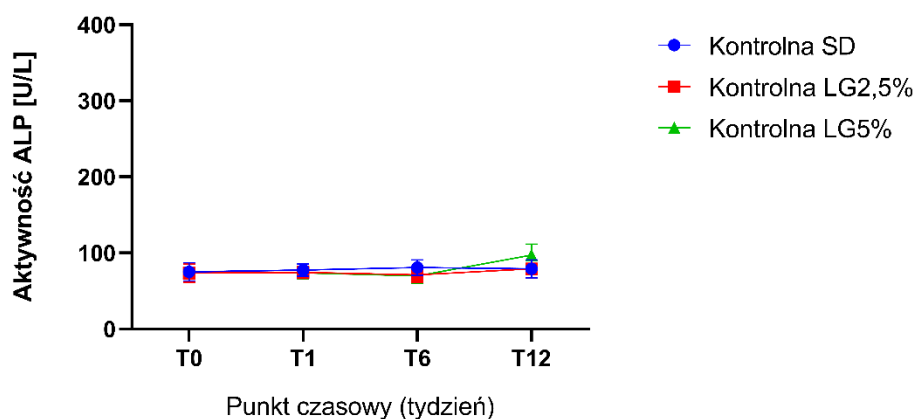
Rycina 4. Stężenie albuminy w surowicy krwi. Przedstawiono średnie stężenie albuminy (g/dL) $\pm$ odchylenie standardowe w punktach czasowych T0–T12 dla zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG.

6.2.2 Fosfataza alkaliczna

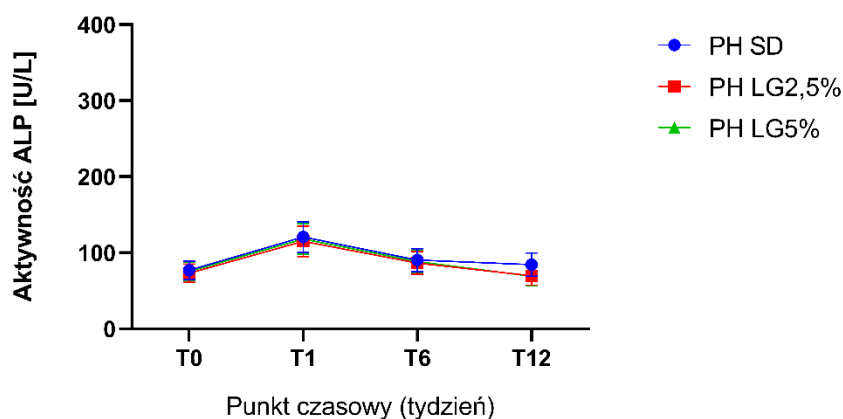
Aktywność ALP w grupie kontrolnej żywionej SD wahała się od $75,21 \pm 12,00$ U/L w T0 do $79,00 \pm 11,85$ U/L w T12. U zwierząt kontrolnych żywionych LG2,5% aktywność ALP utrzymywała się na zbliżonym poziomie i w T12 wynosiła $79,00 \pm 10,54$ U/L. Odmienny przebieg zmian obserwowano u zwierząt żywionych LG5%. W tej grupie LG początkowo, do T6, wiązał się z niższą aktywnością ALP ($69,82 \pm 10,01$ U/L vs $80,94 \pm 10,00$ U/L; $p = 0,046$), a następnie z jej wzrostem do $97,00 \pm 14,55$ U/L w T12.

Jak przedstawiono na rycinie 5B w grupie zwierząt z nienowotworowym uszkodzeniem wątroby, niezależnie od stosowanej diety, najwyższe wartości ALP obserwowano w T1. W tej grupie jedynie wyższy dodatek LG powodował istotny statystycznie ($p=0,045$) spadek aktywności ALP w ostatnim tygodniu doświadczenia ($69,00 \pm 12,42$ U/L w T12, LG5%). U zwierząt z nowotworowym uszkodzeniem wątroby aktywność ALP wyraźnie wzrastała wraz z czasem trwania doświadczenia. W porównaniu z T0 już w T1 obserwowano znaczny wzrost aktywności ALP, niezależnie od stosowanej diety. Maksymalne wartości aktywności enzymu notowano w ostatnim tygodniu doświadczenia. W T12 aktywność ALP wynosiła $274,98 \pm 44,00$ U/L u zwierząt żywionych SD, $240,70 \pm 45,00$ U/L u tych żywionych LG2,5% oraz $260,22 \pm 45,00$ U/L dla LG5%. Obie dawki LG wykazywały tendencję do obniżania aktywności ALP względem SD, jednak różnice te nie osiągały istotności statystycznej (Ryc. 5C).

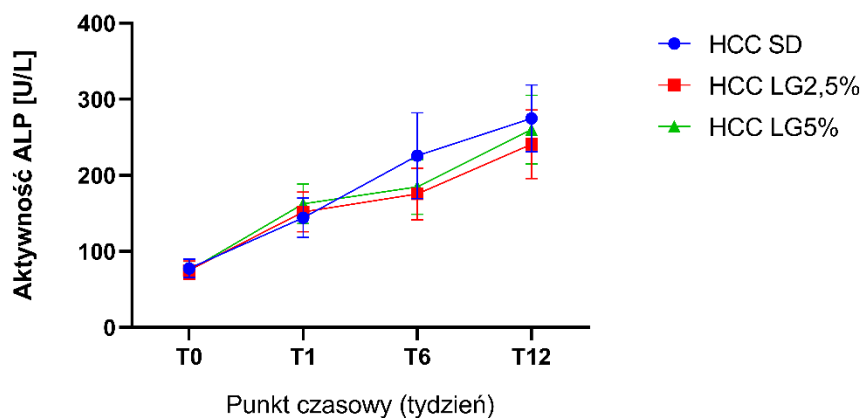
A



B



C



Rycina 5. Aktywność fosfatazy alkalicznej w surowicy krwi. Przedstawiono średnią aktywność ALP (U/L) w punktach czasowych T0-T12 dla zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG.

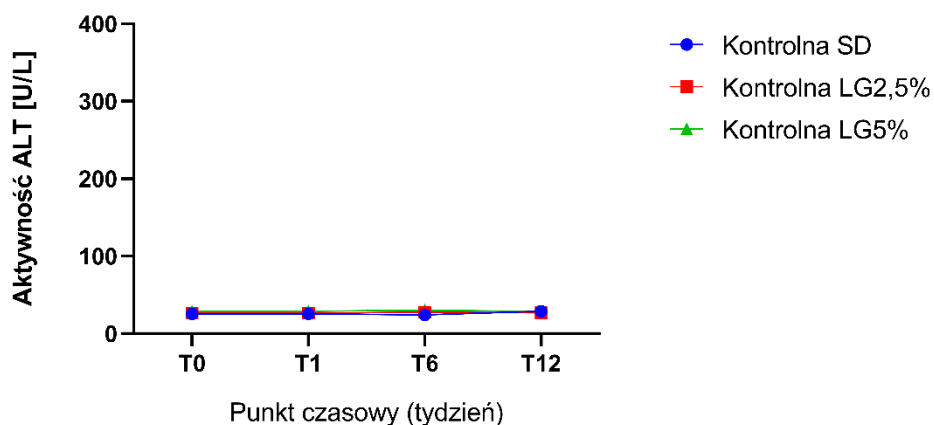
6.2.3 Aminotransferaza alaninowa

Aktywność ALT u zwierząt kontrolnych żywionych SD utrzymywała się na niskim poziomie, z maksymalną wartością $28,83 \pm 3,18$ U/L w T12. Zarówno 2,5%, jak i 5% dodatek LG skutkował podobną aktywnością w T12 ($26,73 \pm 3,48$ U/L dla 2,5% i $28,40 \pm 2,74$ U/L dla 5% dodatku LG).

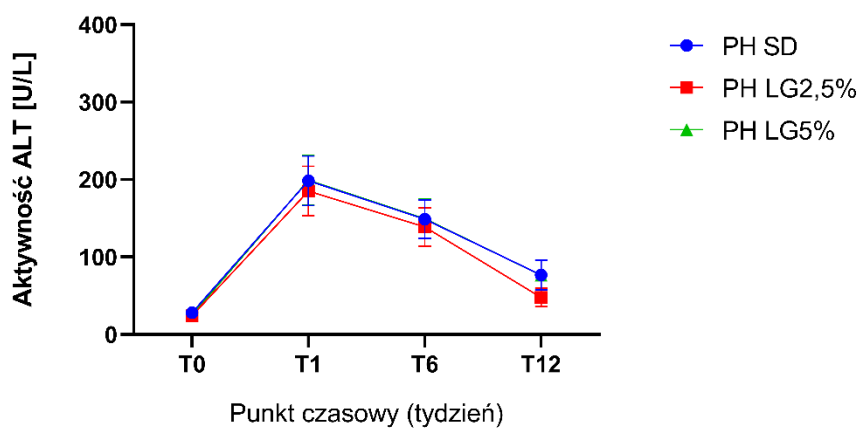
W grupie PH, niezależnie od stosowanej diety, obserwowano wzrost aktywności ALT w T1 (ryc. 6B). Następnie aktywność ALT stopniowo się obniżała, osiągając najniższe wartości w T12. Dieta z 2,5% dodatkiem LG wiązała się z najniższą aktywnością ALT spośród wszystkich wariantów żywienia w tej grupie ($47,75 \pm 11,93$ U/L w T12), a wartość ta była istotnie niższa względem SD, jak i LG5% (w obu przypadkach $p < 0,001$).

Najwyższą aktywność ALT obserwowano u szczurów z HCC, zwłaszcza żywionych SD. W tej grupie aktywność ALT wzrastała do $290,97 \pm 60,0$ U/L w T12. Jak przedstawiono na rycinie 6C, LG w obu dawkach przejściowo ograniczał wzrost aktywności tego enzymu. Najwyraźniejszy efekt obserwowano w T6, kiedy aktywność ALT u szczurów żywionych LG2,5% była niższa niż u zwierząt żywionych LG5% ($101,90 \pm 30,57$ vs. $149,65 \pm 44,89$ U/L, $p = 0,021$) i znacznie niższa niż u tych karmionych SD ($233,30 \pm 69,90$ U/L, $p < 0,001$). W kolejnych punktach czasowych aktywność ALT ponownie wzrastała, zbliżając się do wartości obserwowanych w SD. (Ryc. 6)

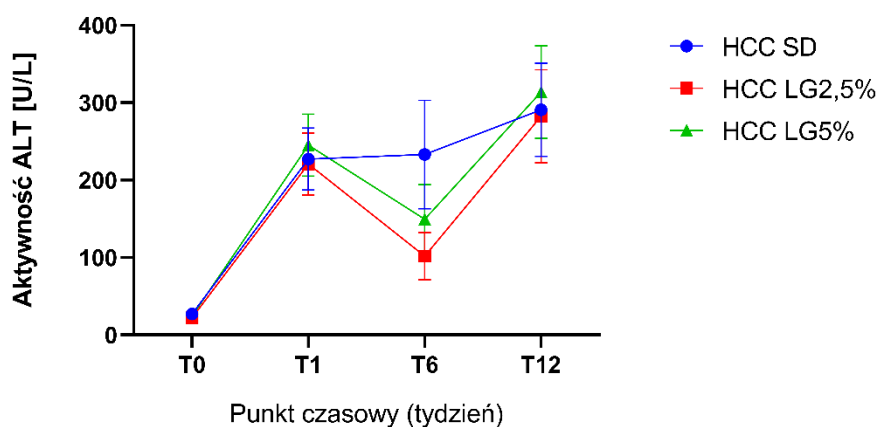
A



B



C



Rycina 6. Aktywność aminotransferazy alaninowej w surowicy krwi. Przedstawiono średnią aktywność ALT (U/L) $\pm$ odchylenie standardowe w punktach czasowych T0-T12 dla zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG.

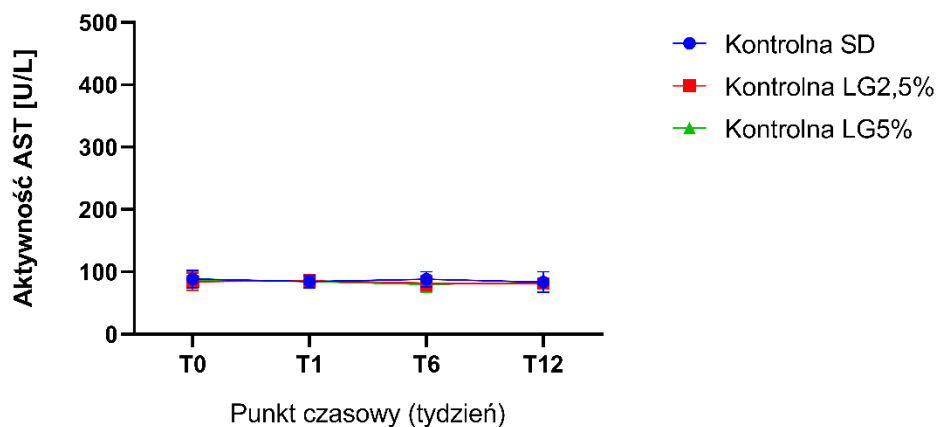
6.2.4 Aminotransferaza asparaginianowa

W grupie kontrolnej żywionej SD aktywność AST pozostawała stabilna w przebiegu doświadczenia i wynosiła $84,21 \pm 10,00$ U/L w T1, $88,05 \pm 12,00$ U/L w T6 oraz $83,34 \pm 16,67$ U/L w T12. Podobny przebieg obserwowano u szczurów żywionych dietami z dodatkiem LG. W grupie kontrolnej żywionej LG2,5% aktywność AST w punkcie końcowym wynosiła $81,67 \pm 4,33$ U/L, natomiast w grupie LG5% $83,00 \pm 2,80$ U/L.

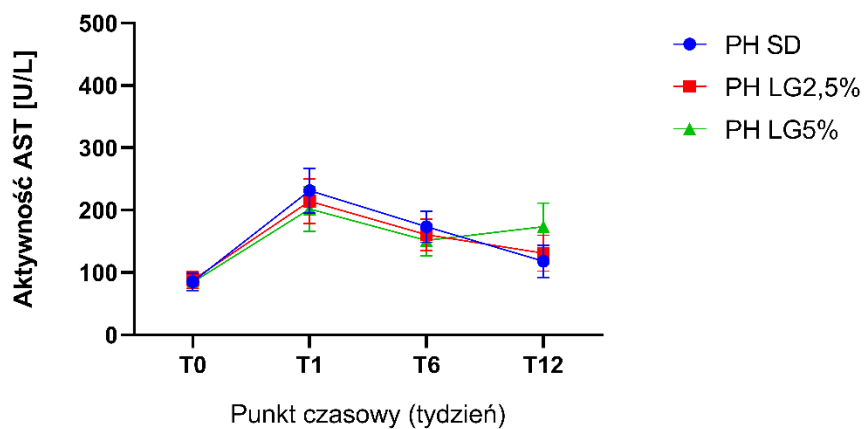
Po PH maksymalną aktywność AST obserwowano już w T1 i wynosiła ona $231,60 \pm 36,00$ U/L (SD), $214,21 \pm 34,87$ U/L (LG2,5%), $201,69 \pm 33,82$ U/L (LG5%). Najwyraźniejsze różnice między dietami obserwowano w punkcie końcowym doświadczenia. W T12 aktywność AST była wyższa w grupie LG5% niż w SD ($173,67 \pm 38,20$ U/L vs $118,00 \pm 25,96$ U/L; $p < 0,001$) oraz wyższa niż w grupie LG2,5% ($173,67 \pm 38,20$ U/L vs $131,00 \pm 28,82$ U/L; $p = 0,019$). W grupie LG2,5% końcowa aktywność AST była niższa niż w LG5%, natomiast w porównaniu z SD różnica ta nie osiągała istotności statystycznej.

U zwierząt z HCC aktywność AST utrzymywała się na wysokim poziomie przez cały okres doświadczenia. U zwierząt żywionych SD wartości wzrastały do maksimum $356,66 \pm 99,86$ U/L w T6, a następnie nieznacznie obniżały się do $352,18 \pm 70,12$ U/L w T12. Po zastosowaniu LG2,5% aktywność AST w T6 i T12 była niższa niż w SD i wynosiła odpowiednio $171,50 \pm 48,02$ U/L ($p < 0,001$) oraz $310,52 \pm 65,24$ U/L. W grupie LG5% wartości tego parametru wynosiły $233,00 \pm 65,24$ U/L w T6 ($p = 0,005$) oraz $327,16 \pm 59,36$ U/L w T12. (Ryc. 7)

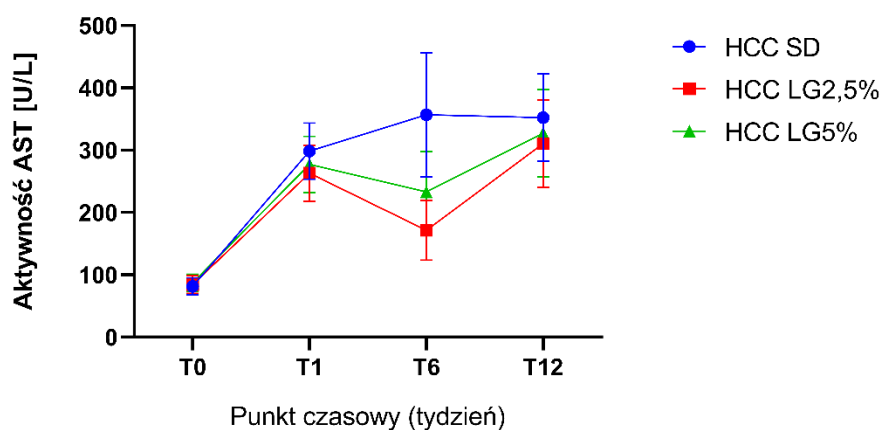
A



B



C



Rycina 7. Aktywność aminotransferazy asparaginianowej w surowicy krwi. Przedstawiono średnią aktywność AST (U/L) $\pm$ odchylenie standardowe w punktach czasowych T0-T12 dla zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG.

6.2.5 γ -glutamylotransferaza

U szczurów kontrolnych, niezależnie od stosowanej diety, aktywność GGT w surowicy wykazywała jedynie niewielkie odchylenia i oscylowała wokół 0,5 U/L.

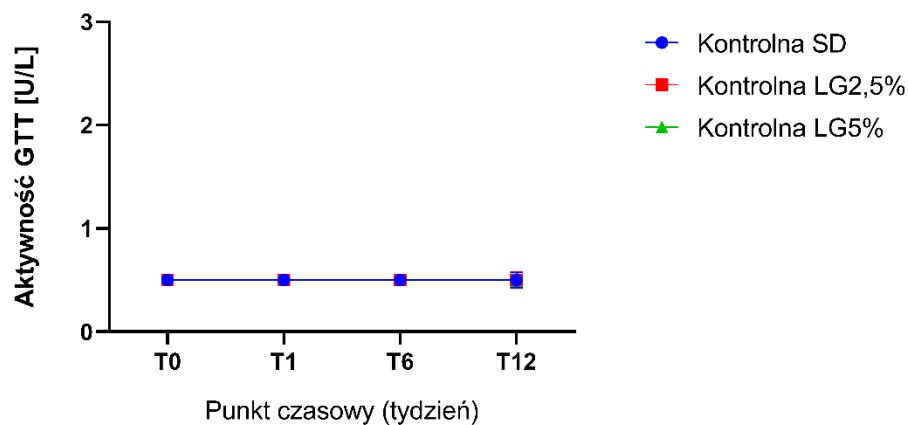
Po PH aktywność GGT wzrastała we wszystkich grupach w T1, a następnie obniżała się w T6 i T12 względem tego punktu czasowego, przy czym przebieg zmian zależał od rodzaju diety.

W grupie SD aktywność GGT wynosząca $2,50 \pm 0,25$ U/L w T1 obniżała się do $1,20 \pm 0,24$ U/L w T6 i $1,25 \pm 0,17$ U/L w T12. W grupie LG2,5% aktywność GGT osiągała maksimum $2,34 \pm 0,22$ U/L w T1, następnie obniżała się do $0,80 \pm 0,25$ U/L w T6, po czym wzrastała do $1,49 \pm 0,22$ U/L w T12. Zwierzęta z grupy PH żywione LG5% cechowała maksymalna aktywność wynosząca $2,11 \pm 0,21$ U/L w T1, która w kolejnych punktach czasowych sukcesywnie obniżała się do $0,89 \pm 0,23$ U/L w T6 i $0,66 \pm 0,10$ U/L w T12. Już w T1 najniższą aktywność GGT obserwowano w grupie LG5%, a różnica względem SD była istotna statystycznie ($p < 0,05$). W T6 szczury z obu grup żywionych LG wykazywały niższe wartości GGT niż SD; różnice te były istotne zarówno dla LG2,5% ($0,80 \pm 0,25$ U/L vs $1,20 \pm 0,24$ U/L; $p < 0,05$), jak i dla LG5% ($0,89 \pm 0,23$ U/L vs $1,20 \pm 0,24$ U/L; $p < 0,05$). W punkcie końcowym doświadczenia najniższą aktywność GGT utrzymywała grupa LG5%, a wartość ta była niższa niż w SD ($0,66 \pm 0,10$ U/L vs $1,25 \pm 0,17$ U/L; $p < 0,001$). W grupie LG2,5% aktywność GGT w T12 była wyższa niż w SD ($1,49 \pm 0,22$ U/L vs $1,25 \pm 0,17$ U/L; $p < 0,05$).

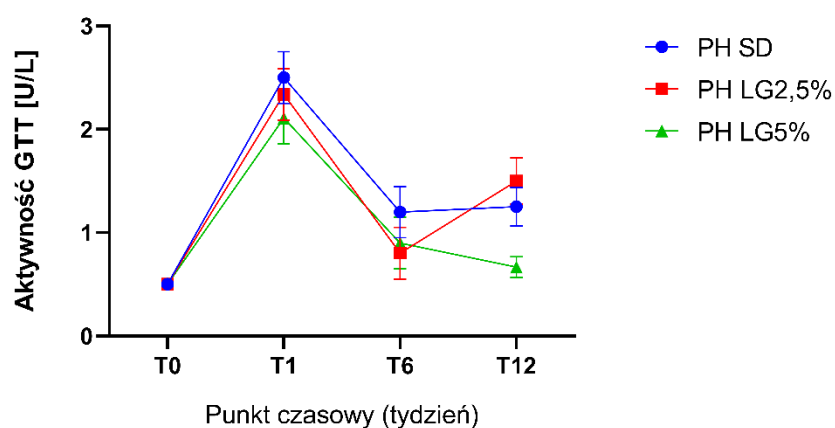
Szczury z HCC charakteryzowały się wyraźnym wzrostem aktywności GGT w czasie we wszystkich grupach. W grupie SD parametr ten wzrastał z 0,5 U/L w T0 do $2,33 \pm 0,30$ U/L w T1, następnie do $12,32 \pm 2,99$ U/L w T6, osiągając w T12 wartość $138,66 \pm 41,59$ U/L. Po zastosowaniu LG2,5% aktywność GGT wynosiła $2,01 \pm 0,21$ U/L w T1, $11,85 \pm 2,99$ U/L w T6 oraz $58,00 \pm 17,40$ U/L w T12. W grupie LG5% wartości tego parametru wynosiły odpowiednio $2,22 \pm 0,28$ U/L, $16,35 \pm 3,12$ U/L oraz $57,75 \pm 17,32$ U/L. Między T1 i T6 aktywność GGT pozostawała zbliżona między dietami, natomiast najwyraźniejsze różnice obserwowano w punkcie końcowym doświadczenia. W T12 zarówno w grupie LG2,5%, jak i LG5% wartości GGT były niższe niż w SD (odpowiednio $58,00 \pm 17,40$ U/L oraz $57,75 \pm 17,32$ U/L vs $138,66 \pm 41,59$ U/L; oba $p <$

0,001). Pomiędzy obiema dawkami LG w T12 nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy. (Ryc. 8)

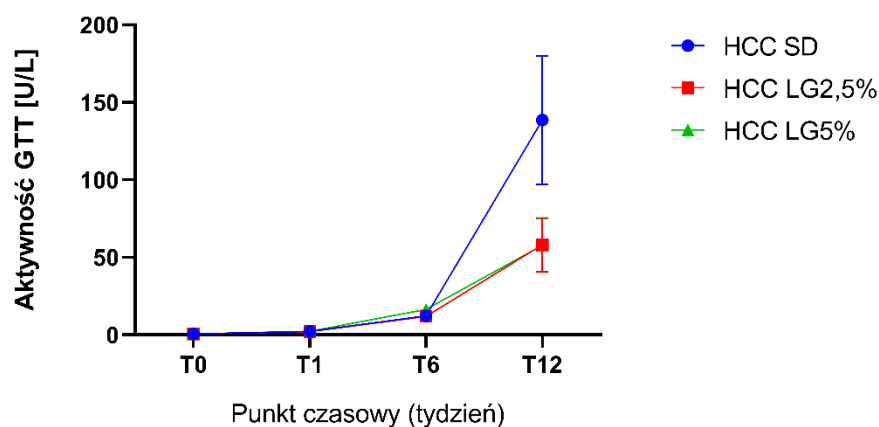
A



B



C



Rycina 8. Aktywność γ -glutamylotransferazy w surowicy krwi. Przedstawiono średnią aktywność GGT (U/L) $\pm$ odchylenie standardowe w punktach czasowych T0-T12 dla zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG.

6.3 Enzymy biotransformacji i markery stresu oksydacyjnego

6.3.1 Enzymy biotransformacji fazy I

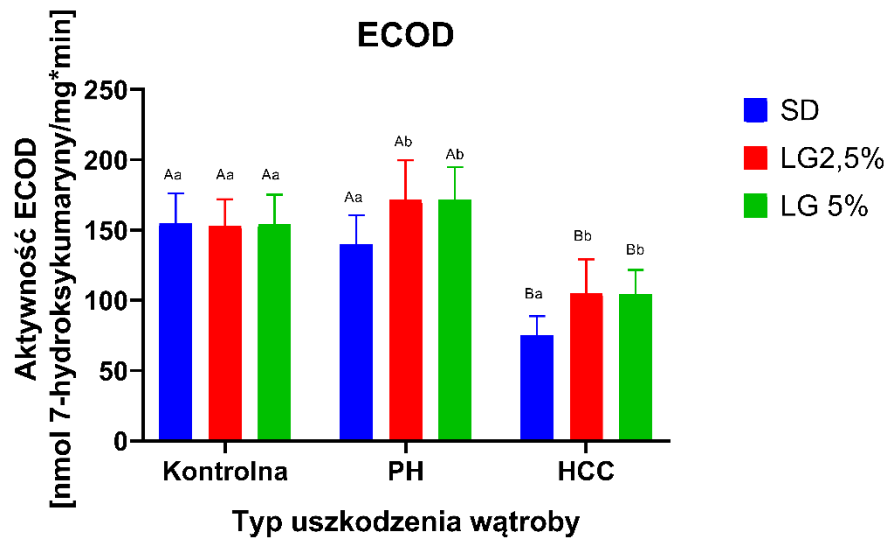
6.3.1.1 ECOD

W grupie kontrolnej aktywność ECOD pozostawała na zbliżonym poziomie niezależnie od rodzaju stosowanej diety. Średnia wartość tego parametru wynosiła $155,0 \pm 21,20$ nmol 7-hydroksykumaryny/mg⁻¹·min⁻¹ u zwierząt żywionych SD, $153,0 \pm 18,86$ u zwierząt żywionych LG2,5% oraz $154,0 \pm 21,12$ u zwierząt żywionych LG5%. Po PH aktywność ECOD była wyraźnie wyższa po zastosowaniu LG niż przy SD. W tej grupie LG istotnie ($p < 0,05$ oraz $p < 0,001$) zwiększał aktywność ECOD do $171,4 \pm 28,29$ dla LG2,5% oraz $171,6 \pm 23,18$ dla LG5%. W modelu HCC aktywność ECOD osiągała najniższe wartości i wynosiła $75,0 \pm 13,80$ przy SD. Po zastosowaniu paszy LG obserwowano wzrost tego parametru do $104,8 \pm 24,39$ dla LG2,5% oraz $104,3 \pm 17,29$ dla LG5%. W obu przypadkach wzrost względem SD był istotny statystycznie (odpowiednio $p < 0,05$ oraz $p < 0,001$). (Ryc. 9)

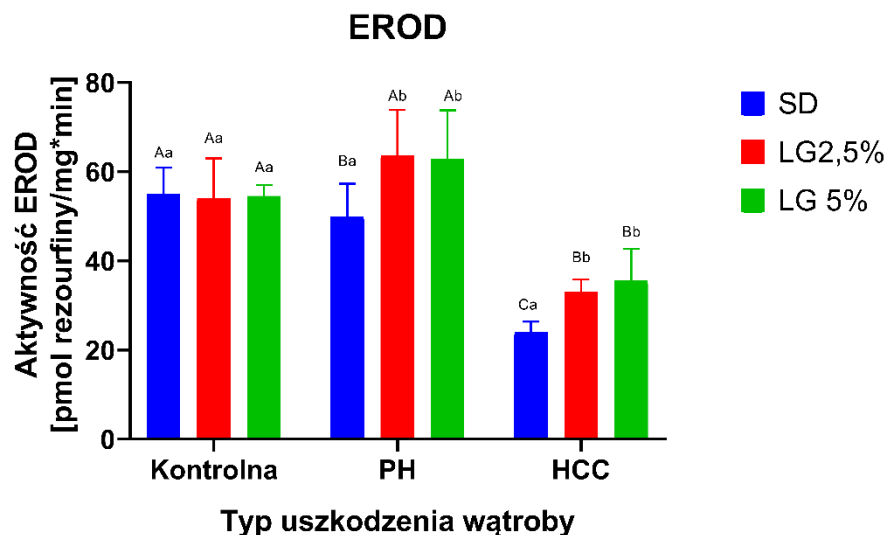
6.3.1.2 EROD

W grupie kontrolnej aktywność EROD pozostawała stabilna i nie wykazywała istotnych zmian po zastosowaniu LG. Średnie wartości wynosiły $55,0 \pm 5,89$ pmol rezorfiny/mg⁻¹·min⁻¹ dla SD, $54,0 \pm 8,95$ dla LG2,5% oraz $54,5 \pm 2,48$ dla LG5%. W grupie PH aktywność EROD, podobnie jak aktywność ECOD, wzrastała po zastosowaniu obu dawek LG. Wątroby szczurów żywionych SD cechowały się średnią aktywnością EROD wynoszącą $50,0 \pm 7,31$, natomiast dodatek LG zwiększał aktywność tego enzymu do $63,68 \pm 10,20$ dla LG2,5% ($p < 0,005$) oraz $62,91 \pm 10,86$ dla LG5% ($p < 0,05$). W modelu HCC aktywność EROD była najniższa dla SD i wynosiła $24,0 \pm 2,38$. Wątroby szczurów z HCC żywionych dietami z dodatkiem LG cechowały się aktywnością wynoszącą $32,95 \pm 2,84$ dla LG2,5% ($p < 0,001$) oraz $35,49 \pm 7,24$ dla LG5% ($p < 0,001$). (Ryc. 10). W grupie HCC stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy obecnością LG w

diecie a wzrostem aktywności ECOD ($r = 0,611$; $p = 0,00266$; $q = 0,0100$) i EROD ($r = 0,725$; $p = 0,00033$; $q = 0,0033$).



Rycina 9. Aktywność ECOD. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność ECOD wyrażono jako ilość 7-hydroksykumaryny (nmol) powstałej w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka (nmol 7-hydroksykumaryny/mg $^{-1}$ ·min $^{-1}$). Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.



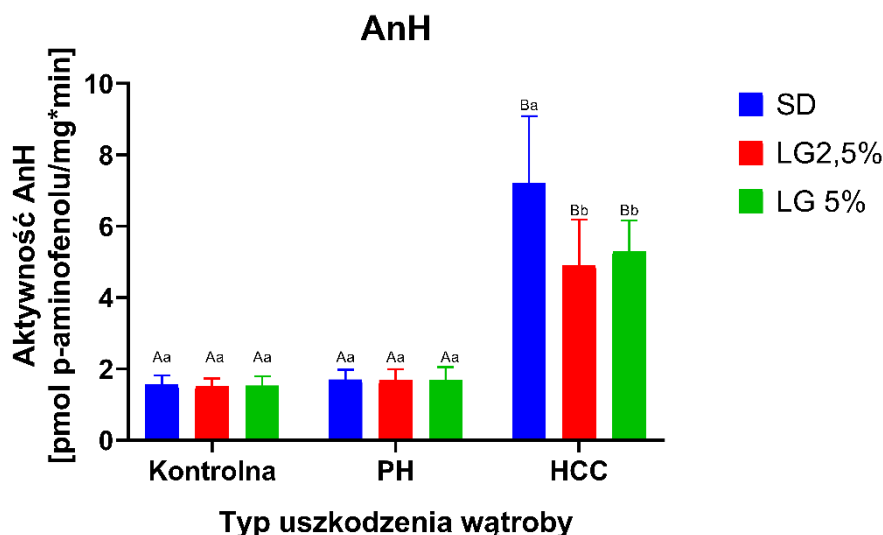
Rycina 10. Aktywność EROD. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność EROD wyrażono jako ilość rezorfiny (pmol) powstałej w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka (pmol rezorfiny/mg $^{-1}$ ·min $^{-1}$). Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

6.3.1.3 AnH

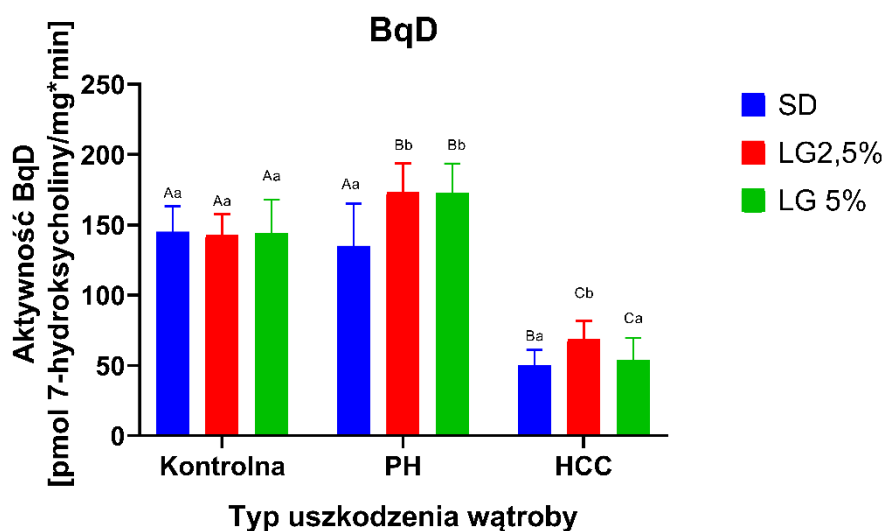
W grupie kontrolnej aktywność AnH pozostawała niska i nie wykazywała istotnych różnic między dietami. Średnie wartości wynosiły $1,55 \pm 0,26$ pmol p-aminofenolu / $\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ dla SD, $1,52 \pm 0,21$ dla LG2,5% oraz $1,53 \pm 0,26$ dla LG5%. Podobnie niskie i zbliżone wartości AnH obserwowano w grupie PH, gdzie aktywność wynosiła $1,70 \pm 0,28$ dla SD, $1,68 \pm 0,31$ dla LG2,5% i $1,69 \pm 0,36$ dla LG5%. Istotnie wyższą aktywność tego enzymu notowano u zwierząt z HCC ($p < 0,001$), a maksimum aktywności tego enzymu wykazano u szczurów z HCC żywionych SD ($7,20 \pm 1,88$). Obie dawki LG obniżały aktywność AnH do $4,90 \pm 1,28$ (LG2,5%) i $5,30 \pm 0,86$ (LG5%), jednak wartości te nadal pozostawały istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i PH ($p < 0,001$ oraz $p = 0,002$) (Ryc. 11)

6.3.1.4 BqD

W grupie kontrolnej aktywność BqD była stabilna i utrzymywała się na zbliżonym poziomie niezależnie od rodzaju diety. Średnie wartości, bez istotnych różnic statystycznych, wynosiły $145,0 \pm 18,15$ pmol 7-hydroksychinoliny / $\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ dla SD, $143,0 \pm 14,52$ dla LG2,5% oraz $144,0 \pm 23,90$ dla LG5%. W wątrobach po PH aktywność BqD wzrastała po zastosowaniu LG do $173,30 \pm 20,51$ (LG 2,5%) i $172,97 \pm 20,60$ (LG 5%), przy istotności statystycznej względem SD ($p < 0,001$). Wyrażne zahamowanie ($p < 0,05$) aktywności BqD obserwowano w grupie HCC. O ile dodatek LG wynoszący 5% skutkował aktywnością BqD zbliżoną do obserwowanej przy żywieniu SD, o tyle 2,5% LG utrzymywał aktywność na poziomie $68,69 \pm 12,99$ (Ryc. 12)



Rycina 11. Aktywność AnH. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność AnH wyrażono jako ilość p-aminofenolu (pmol) powstałej w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka (pmol p-aminofenolu /mg⁻¹·min⁻¹.) Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.



Rycina 12. Aktywność BqD. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność BqD wyrażono jako ilość 7-hydroksychinoliny (pmol) powstałej w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka (pmol 7-hydroksychinoliny /mg⁻¹·min⁻¹.) Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

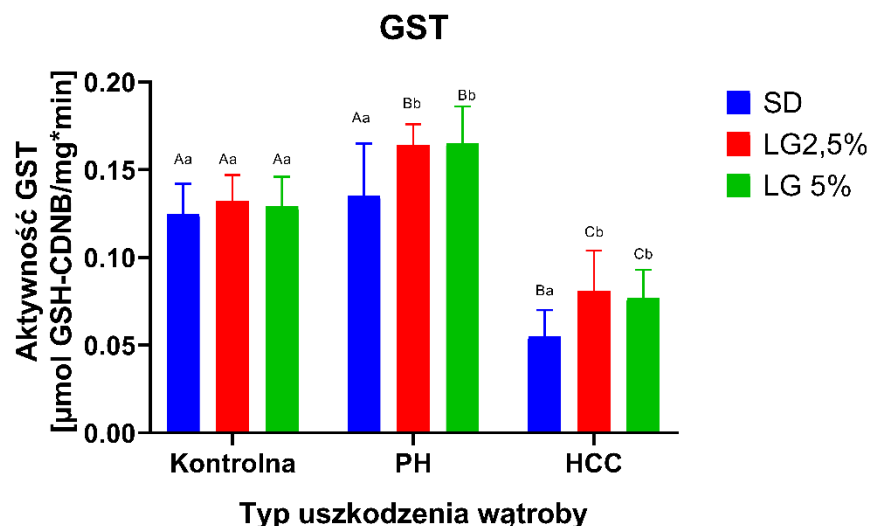
6.3.2 Enzymy fazy II i układ antyoksydacyjny

6.3.2.1 GST

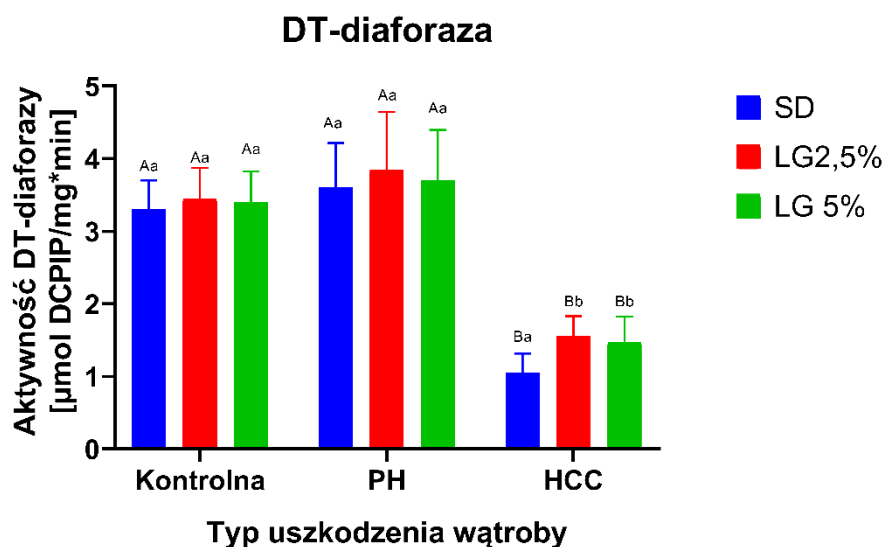
W grupie kontrolnej aktywność GST utrzymywała się na zbliżonym poziomie między dietami i wynosiła odpowiednio $0,1249 \pm 0,0172$ $\mu\text{mol GSH-CDNB/ mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $0,1318 \pm 0,0146$, $0,1290 \pm 0,0174$ dla SD, LG2,5%, LG5%. Jak przedstawiono na rycinie 13, w grupie PH aktywność GST istotnie wzrastała u zwierząt żywionych LG ($p < 0,001$). W porównaniu z SD ($0,1349 \pm 0,0303$), aktywność tego enzymu wynosiła $0,1639 \pm 0,0119$ dla LG2,5% oraz $0,1646 \pm 0,0212$ dla LG5%. Najniższą aktywność GST obserwowano w grupie zwierząt z nowotworowym uszkodzeniem wątroby żywionych SD ($0,0549 \pm 0,0150$). LG w obu dawkach zwiększał aktywność enzymu do $0,0809 \pm 0,0228$ dla LG2,5% oraz $0,0770 \pm 0,0156$ dla LG5%. Względem SD zmiany te były istotne odpowiednio przy $p = 0,002$ oraz $p = 0,011$. (Ryc. 13)

6.3.2.2 DT-diaforaza

Jak przedstawiono na rycinie 14, aktywność DT-diaforazy $\mu\text{mol DCPIP/mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ w grupie kontrolnej oraz u zwierząt po PH, pozostawała na zbliżonym poziomie. Niewielki wzrost aktywności tego enzymu w grupie PH nie osiągał istotności statystycznej. Odmienne w grupie HCC obserwowano istotne ($p < 0,05$) obniżenie aktywności DT-diaforazy w porównaniu z grupą kontrolną i PH. W tej grupie LG zwiększał aktywność enzymu względem SD do $1,55 \pm 0,28$ (LG2,5%) i $1,47 \pm 0,35$ (LG 5%), jednak zmiana ta osiągała niewielką istotność statystyczną.



Rycina 13. Aktywność GST. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność GST wyrażano jako ilość kompleksu GSH-CDNB (μmol) w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka ($\mu\text{mol GSH-CDNB}/\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.



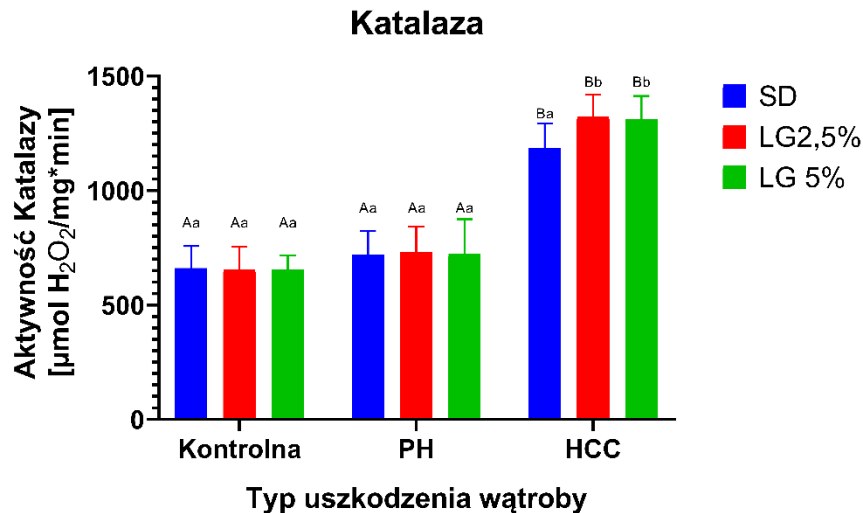
Rycina 14. Aktywność DT-diaforazy. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność DT-diaforazy wyrażano jako ilość zredukowanego DCPIP w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka ($\mu\text{mol DCPIP}/\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

6.3.2.3 Katalaza

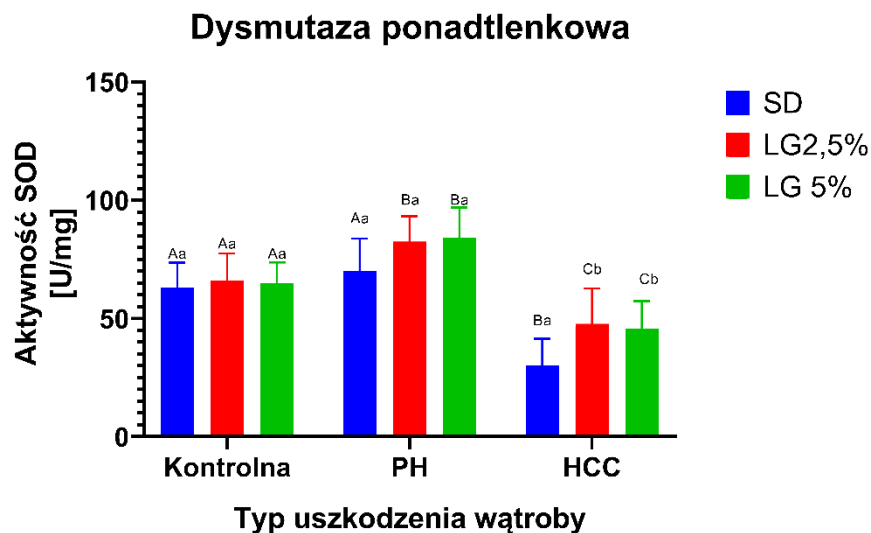
Nie wykazano istotnych zmian aktywności katalazy między dietami w grupie kontrolnej. Nieco wyższą aktywność obserwowano w grupie PH, jednak również w tej grupie, różnice między dietami pozostawały niewielkie. Widoczna była tendencja do wyższych wartości po zastosowaniu LG, ale nie osiągała ona istotności statystycznej. Najwyższą aktywność katalazy notowano w grupie HCC, zarówno u zwierząt żywionych SD, jak i u żywionych LG. Maksymalną wartość obserwowano dla LG2,5% ($1322,59 \pm 96,33 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), niższą dla LG5% ($1312,91 \pm 99,31$), natomiast najniższą aktywność w grupie HCC stwierdzono przy SD ($1184,66 \pm 107,91$). Względem SD obie zastosowane dawki LG zwiększały aktywność katalazy w sposób istotny (odpowiednio $p < 0,001$ oraz $p = 0,002$). (Ryc. 15)

6.3.2.4 Dysmutaza ponadtlenkowa

W grupie kontrolnej aktywność SOD wynosiła $63,0 \pm 10,53 \text{ U/mg}$ dla SD, $66,0 \pm 11,45$ dla LG2,5%, $65,0 \pm 8,75$ dla LG5%. Wyższą aktywność SOD obserwowano w grupie PH, zwłaszcza u zwierząt otrzymujących diety z LG, wartości wynosiły odpowiednio $70,0 \pm 13,76$; $82,47 \pm 10,66$; $84,09 \pm 12,92$ dla SD, LG2,5% i LG5%. Jak przedstawiono na rycinie 16 u szczurów z HCC aktywność tego enzymu antyoksydacyjnego była najniższa przy SD i wynosiła $30,0 \pm 11,41$. Zastosowanie LG w dawce 2,5% powodowało wzrost aktywności do $47,65 \pm 15,05$, a LG5% do $45,78 \pm 11,49$. Wzrost ten był istotny statystycznie w porównaniu z SD (odpowiednio $p = 0,038$ oraz $p = 0,006$).



Rycina 15. Aktywność katalazy. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność wyrażano jako ilość rozłożonego H_2O_2 w czasie 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka ($\mu\text{mol } H_2O_2 / \text{mg białka/min}$). Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.



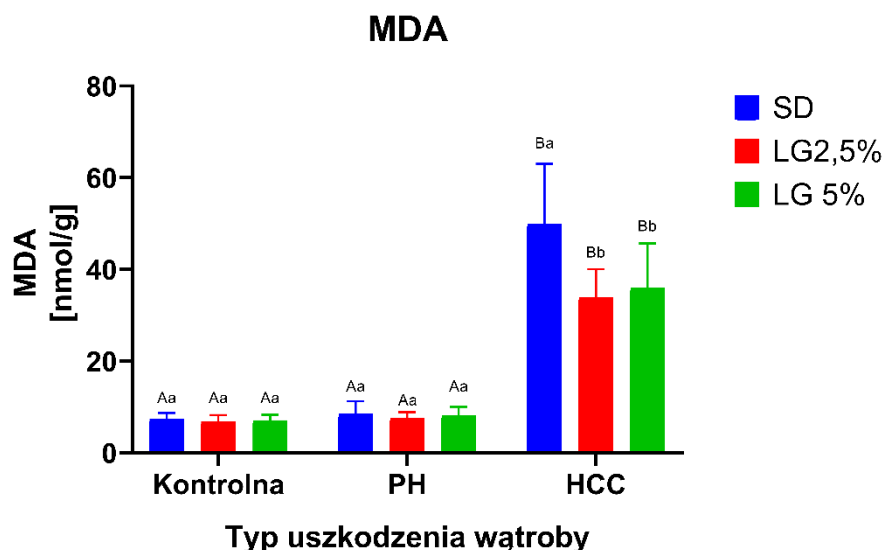
Rycina 16. Aktywność SOD. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Aktywność wyrażano w jednostkach aktywności enzymatycznej (U) na 1 mg białka (U/mg). Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

6.3.2.5 MDA

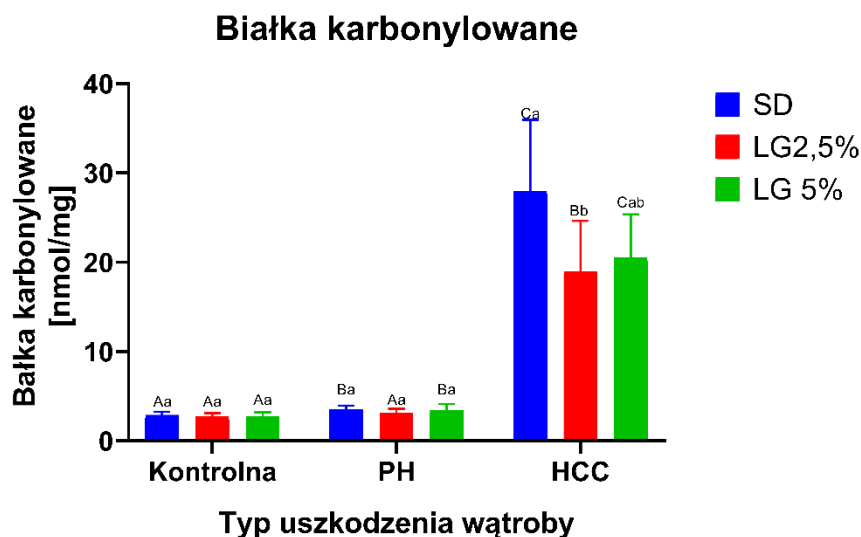
Jak przedstawiono na rycinie 17, zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie PH stężenie MDA w wątrobie pozostawało niskie, a jego wartości były do siebie zbliżone. W porównaniu z obiema tymi grupami stężenie MDA w wątrobie zwierząt z HCC istotnie wzrastało niezależnie od stosowanej diety, osiągając wartość maksymalną u szczurów żywionych SD ($50,0 \pm 13,06$ nmol/mg). Zastosowanie LG2,5% i LG5% w grupie szczurów z nowotworem istotnie obniżało stężenie MDA odpowiednio do $34,0 \pm 6,07$ nmol/mg ($p = 0,002$) i $36,0 \pm 9,66$ nmol/mg ($p=0,011$).

6.3.2.6 Białka karbonylowane

Podobnie jak w przypadku MDA, zarówno grupa kontrolna (od $2,70 \pm 0,43$ nmol/mg do $2,90 \pm 0,36$ nmol/mg) jak i grupa PH (od $3,10 \pm 0,50$ nmol/mg, do $3,50 \pm 0,44$ nmol/mg) wykazywały niskie stężenie białek karbonylowanych w wątrobie. Jedynie grupa HCC charakteryzowała się wielokrotnie wyższym stężeniem tych białek ($p < 0,05$). Jak przedstawiono na rycinie 18, dodatek LG obniżał stężenie białek karbonylowanych względem maksymalnej wartości obserwowanej przy żywieniu SD ($28,0 \pm 7,96$ nmol/mg) do $19,0 \pm 5,63$ nmol/mg dla LG2,5% oraz $20,5 \pm 4,87$ nmol/mg dla LG5%. Istotność statystyczną uzyskano dla dawki LG2,5% ($p = 0,023$). Pomimo obniżenia po zastosowaniu LG, wartości białek karbonylowanych w grupie HCC nadal pozostawały znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej i PH.



Rycina 17. Stężenie MDA. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$



Rycina 18. Stężenie białek karbonylowanych. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$

6.4 Markery białkowe oznaczane metodą ELISA

6.4.1 BAX

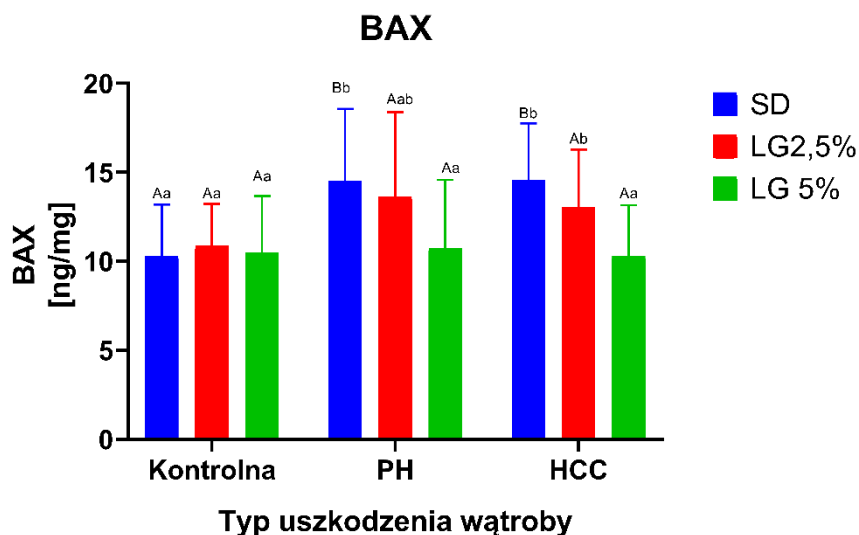
W grupie kontrolnej stężenie białka BAX pozostawało zbliżone między dietami i mieściło się w zakresie od $10,30 \pm 2,89$ ng/mg do $10,87 \pm 2,35$ ng/mg. W grupie szczurów z nienowotworowym uszkodzeniem wątroby najwyższe stężenie BAX w homogenacie wątroby oznaczono u zwierząt żywionych SD ($14,54 \pm 4,02$ ng/mg). Jedynie 5% dodatek LG istotnie ($p = 0,046$) obniżał stężenie tego białka ($10,75 \pm 3,83$ ng/mg)

Jak przedstawiono na rycinie 19, podobny kierunek zmian wykazano w grupie HCC. W tej grupie LG5% najsilniej obniżał stężenie tego białka ($10,32 \pm 2,84$ ng/mg, $p = 0,005$).

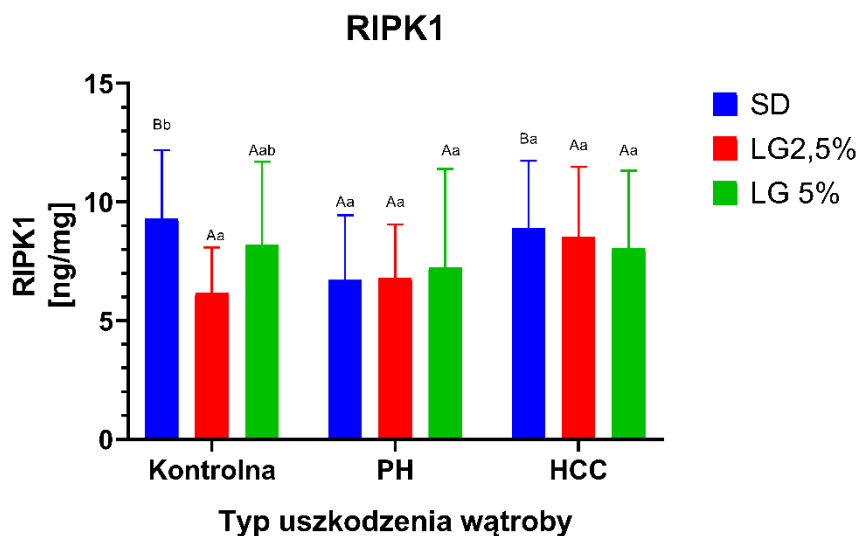
6.4.2 RIPK1

Dane przedstawione na rycinie 20 wskazują, że w grupie kontrolnej jedynie LG2,5% istotnie zmniejszał stężenie RIPK1. Wartość tego parametru wynosiła $6,19 \pm 1,90$ ng/mg i była istotnie niższa niż przy żywieniu SD ($p = 0,002$).

Zarówno w grupie PH, jak i w grupie HCC żywienie LG nie wpływało znacząco na stężenie RIPK1. W grupie HCC wartości wynosiły $8,90 \pm 2,83$ ng/mg dla SD, $8,53 \pm 2,95$ ng/mg dla LG2,5% oraz $8,04 \pm 3,27$ ng/mg dla LG5%.



Rycina 19. Stężenie białka BAX. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$



Rycina 20. Stężenie białka RIPK1. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$

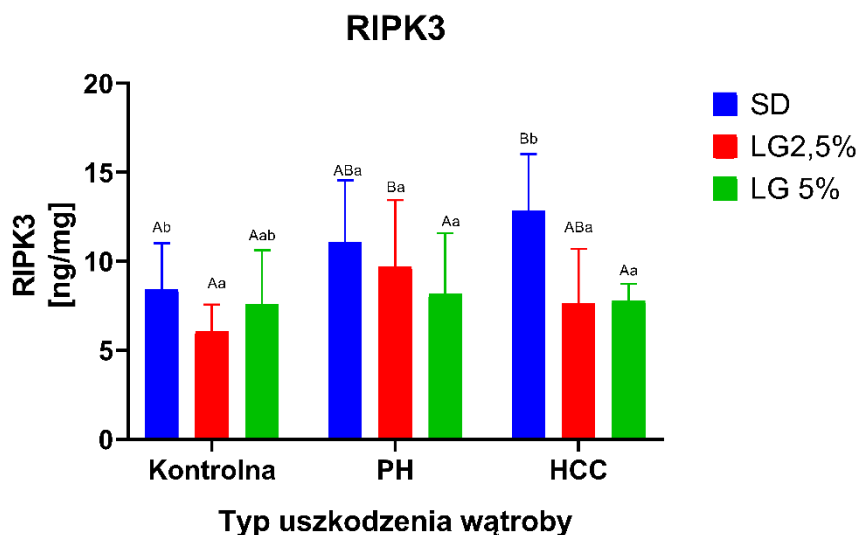
6.4.3 RIPK3

W grupie kontrolnej najwyższe stężenie RIPK3 obserwowano przy SD ($8,41 \pm 2,61$ ng/mg). Stężenie tej kinazy ulegało istotnemu obniżeniu u szczurów żywionych LG2,5% ($6,08 \pm 1,49$ ng/mg, $p < 0,001$). Po PH najwyższe stężenie RIPK3 również notowano przy SD ($11,09 \pm 3,47$ ng/mg). W tej grupie obie dawki LG obniżały stężenie tego białka, odpowiednio do $9,70 \pm 3,74$ ng/mg dla LG2,5% i $8,17 \pm 3,41$ ng/mg dla LG5%). Najwyższe stężenie RIPK3 obserwowano w grupie HCC otrzymującej SD ($12,85 \pm 3,18$ ng/mg). Dodatek LG istotnie obniżał stężenie RIPK3 do wartości $7,66 \pm 3,03$ ng/mg dla LG2,5% i $7,80 \pm 0,93$ ng/mg dla LG5% ($p < 0,001$). (Ryc. 21)

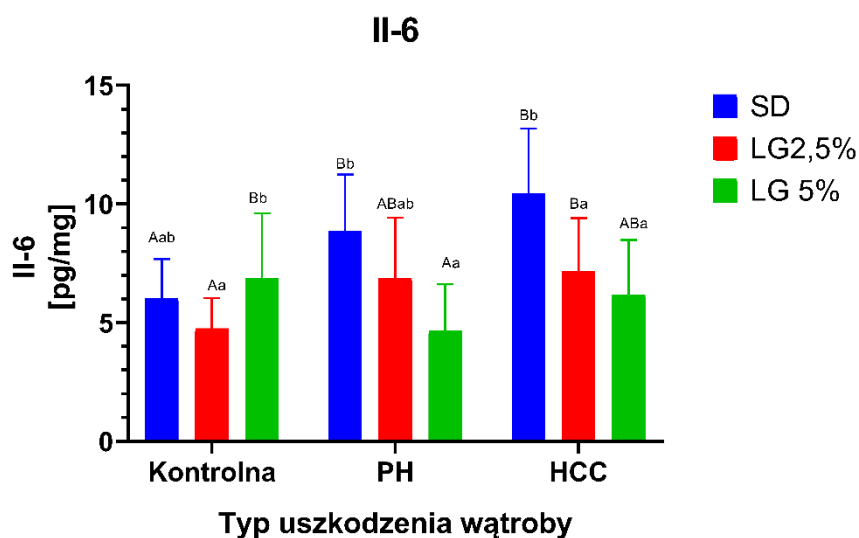
6.4.4 IL-6

W grupie kontrolnej LG wywierał zależny od dawki wpływ na stężenie IL-6 w wątrobie. O ile niższa dawka LG obniżała stężenie tej cytokiny do wartości $4,76 \pm 1,27$ pg/mg, o tyle LG5% zwiększał jej stężenie do $6,88 \pm 2,72$ pg/mg. W grupach PH i HCC diety zawierające LG obniżały stężenie IL-6 w wątrobie. Najniższe, wynoszące $4,65 \pm 1,96$ pg/mg stężenie IL-6 obserwowano w grupie PH żywionej LG5% .

W grupie HCC LG w obu dawkach istotnie obniżał stężenie tej interleukiny do $7,17 \pm 2,24$ pg/mg dla LG2,5% oraz $6,18 \pm 2,29$ pg/mg dla LG5% (odpowiednio $p = 0,001$ i $p < 0,001$) (Ryc. 22). W grupie HCC obecność LG w diecie korelowała ujemnie z poziomem IL-6 ($r = -0,603$; $p = 0,00067$; $q = 0,00533$) oraz RIPK3 ($r = -0,700$; $p = 0,00067$; $q = 0,00533$). Średnie poziomy tych markerów w grupach otrzymujących LG były odpowiednio o 36,0% i 39,8% niższe niż w SD.



Rycina 21. Stężenie białka RIPK3. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$



Rycina 22. Stężenie białka IL-6. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$

6.4.5 TNF- α

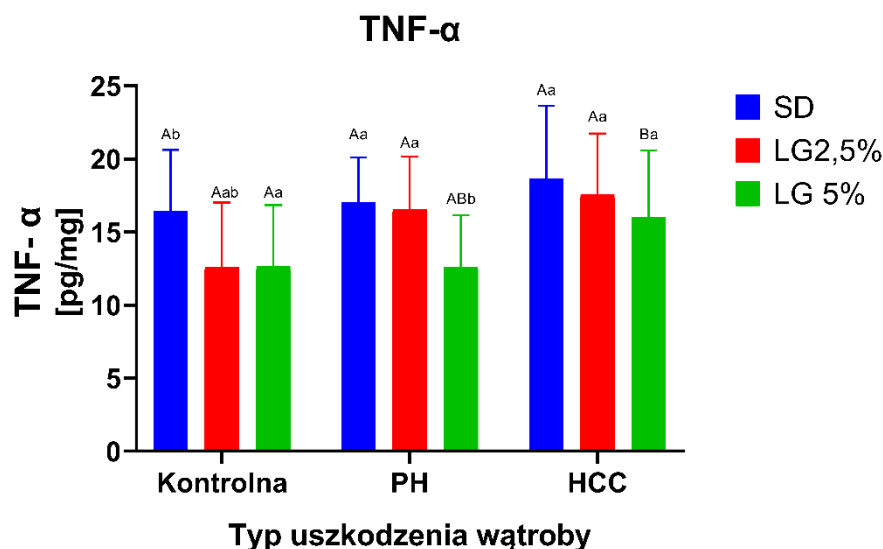
W grupie kontrolnej żywienie SD wiązało się z najwyższym wątrobowym stężeniem TNF- α , wynoszącym $16,41 \pm 4,20$ pg/mg. Zastosowanie LG2,5% obniżało ten poziom do $12,63 \pm 4,40$ pg/mg, a LG5% do $12,63 \pm 4,22$ pg/mg, różnica osiągała istotność statystyczną na poziomie $p = 0,039$. W grupie PH istotny statystycznie spadek stężenia TNF- α obserwowano wyłącznie po zastosowaniu LG5%, do wartości $12,62 \pm 3,53$ pg/mg ($p \leq 0,05$). Najwyższe stężenia tej cytokiny prozapalnej obserwowano w grupie HCC i wynosiły one odpowiednio $18,62 \pm 5,01$ pg/mg dla SD, $17,56 \pm 4,16$ pg/mg dla LG2,5% oraz $15,99 \pm 4,59$ pg/mg dla LG5%. (Ryc. 23)

6.4.6 AFP

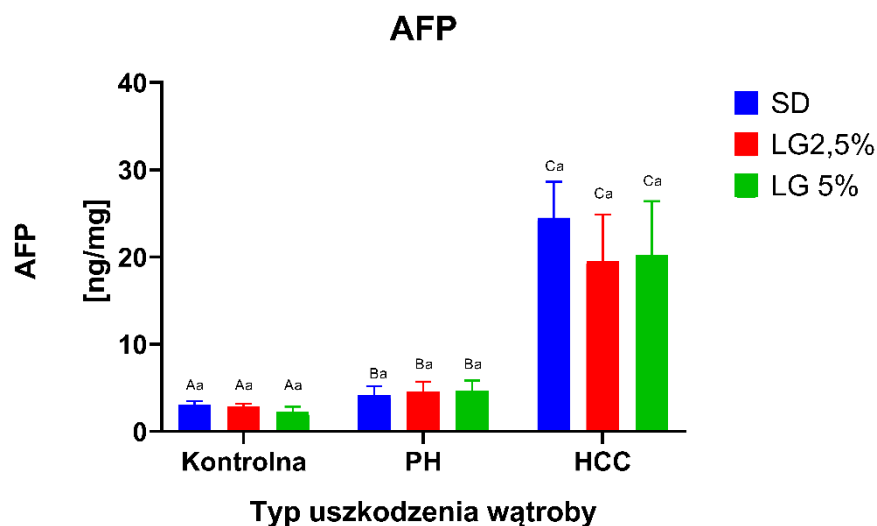
Zarówno w warunkach kontrolnych, jak i u zwierząt po PH stężenie AFP w homogenacie wątroby nie przekraczało 5 ng/mg. W obu tych grupach nie odnotowano również istotnych zmian tego markera po zastosowaniu LG. Jak przedstawiono na rycinie 24, w grupie HCC stężenie AFP wzrastało prawie sześciokrotnie, osiągając u szczurów żywionych SD $24,50 \pm 4,35$ ng/mg ($p < 0,05$). Zastosowanie obu dawek LG wiązało się z niższym stężeniem AFP, wynoszącym $19,50 \pm 5,65$ ng/mg dla LG2,5% oraz $20,20 \pm 6,54$ ng/mg dla LG5%, jednak wartości te nadal pozostawały wielokrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i PH. (Ryc. 24)

6.4.7 PKM2

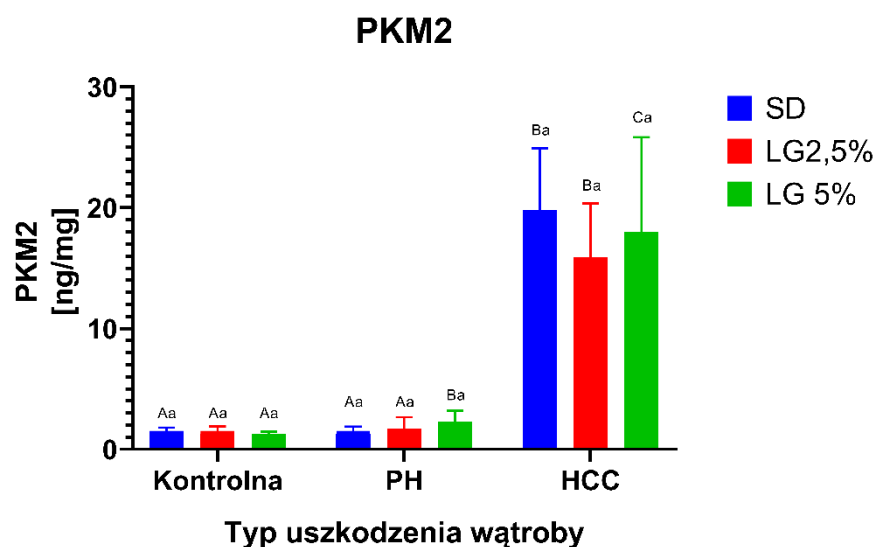
W warunkach kontrolnych suplementacja LG, szczególnie w dawce 5%, wiązała się ze spadkiem stężenia PKM2 do najniższej wartości, wynoszącej średnio $1,23 \pm 0,25$ ng/mg, co przedstawia rycina 25. W grupie PH LG nieznacznie zwiększał stężenie tej kinazy, do wartości nieprzekraczającej $2,26 \pm 0,97$ ng/mg po zastosowaniu LG5%. U zwierząt z indukowanym HCC, niezależnie od stosowanej diety, stężenie PKM2 osiągało wielokrotnie wyższe wartości niż w grupach kontrolnej i PH ($p < 0,05$). Wartości te wynosiły $19,80 \pm 5,41$ ng/mg dla SD, $15,90 \pm 4,70$ ng/mg dla LG2,5% oraz $18,00 \pm 8,26$ ng/mg dla LG5%.



Rycina 23. Stężenie białka TNF- α . Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$



Rycina 24. Stężenie białka AFP. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$



Rycina 25. Stężenie białka PKM2. Przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po PH oraz z HCC, żywionych SD lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem LG. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$

6.5 Ekspresja genów markerów różnicowania i programowanej śmierci

6.5.1 *Bax*

W grupie kontrolnej wartości względnej ekspresji genu *Bax* pozostawały zbliżone przy żywieniu SD i po zastosowaniu LG2,5%, osiągając odpowiednio $R = 1,00 \pm 0,48$ oraz $R = 1,05 \pm 0,82$. Zastosowanie LG5% powodowało obniżenie ekspresji tego genu do $R = 0,62 \pm 0,51$. W grupie PH najniższą ekspresję *Bax* obserwowano przy żywieniu SD ($R = 0,27 \pm 0,22$). Żywienie LG zwiększało ekspresję tego genu, przy czym silniejszy efekt obserwowano po zastosowaniu LG5% ($R = 0,81 \pm 0,52$) niż LG2,5% ($R = 0,65 \pm 0,46$). Szczury z HCC charakteryzowały się najwyższą ekspresją *Bax* przy SD, gdzie osiągała ona wartość $R = 2,07 \pm 0,22$. Dodatek LG obniżał ekspresję tego genu istotnie statystycznie przy LG2,5% ($R = 0,74 \pm 0,36$; $p < 0,05$). Dawka LG5% również obniżała ekspresję *Bax*, jednak słabiej ($R = 1,66 \pm 0,61$), co widoczne jest na rycinie 26 A.

6.5.2 *Bcl2*

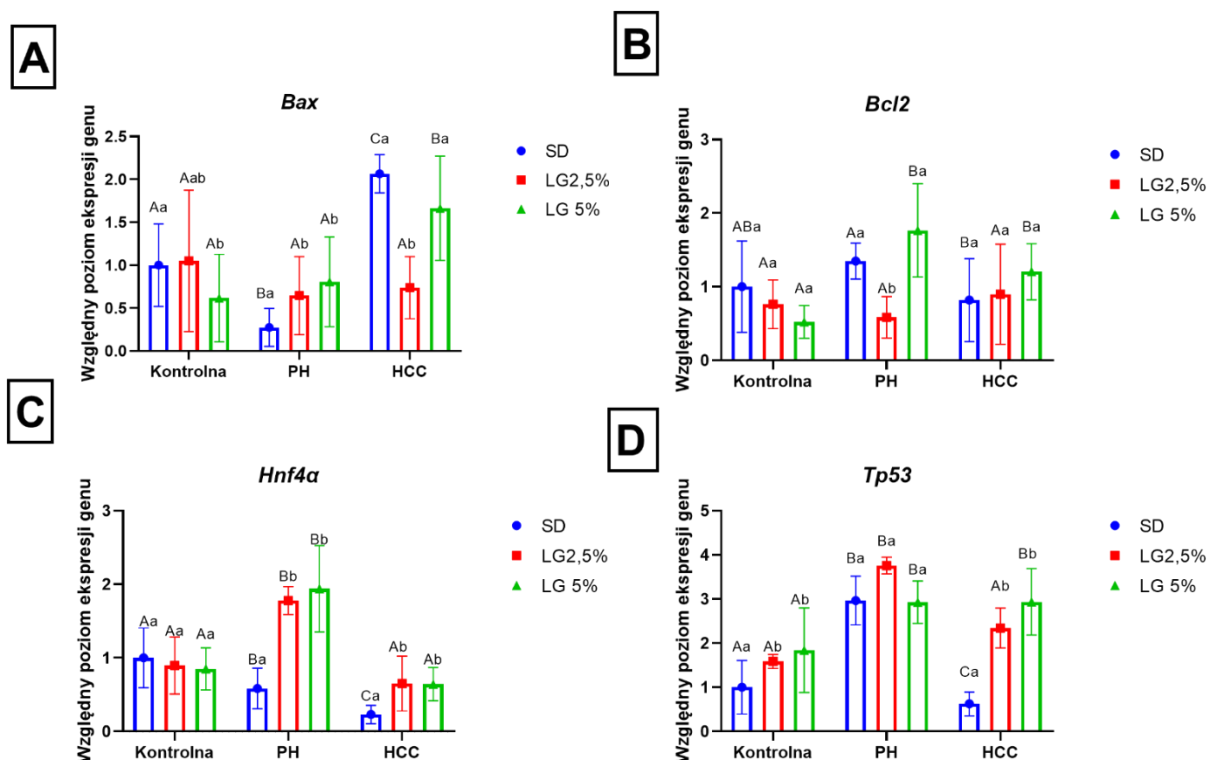
W grupie kontrolnej najwyższą względną ekspresję genu *Bcl2* obserwowano u szczurów żywionych SD ($R = 1,00 \pm 0,62$). Dodatek LG2,5% obniżał ten poziom do $R = 0,76 \pm 0,33$, a zastosowanie LG5% prowadziło do jeszcze wyraźniejszego spadku, do $R = 0,52 \pm 0,22$ ($p < 0,05$). Najwyższą ekspresję *Bcl2* u zwierząt po PH oznaczono w grupie żywionej LG5% ($R = 1,77 \pm 0,64$), natomiast najniższą, istotnie różniącą się od wartości obserwowanej przy wyższej dawce nutraceutyku, w grupie otrzymującej LG2,5% ($R = 0,59 \pm 0,28$; $p < 0,05$). W grupie HCC wartości ekspresji *Bcl2* dla SD i LG2,5% były zbliżone i wynosiły odpowiednio $R = 0,82 \pm 0,56$ oraz $R = 0,90 \pm 0,68$. W tej grupie LG5% zwiększał ekspresję *Bcl2* do $R = 1,21 \pm 0,38$. (Ryc. 26 B)

6.5.3 *Hnf4a*

W grupie kontrolnej wartości względnej ekspresji genu *Hnf4a* pozostawały stosunkowo stabilne między stosowanymi dietami i nie wykazywały istotnych różnic. Po PH ekspresja *Hnf4a* była wyraźnie obniżona ($p < 0,05$) przy SD i wynosiła $R = 0,59 \pm 0,28$. Dodatek LG zwiększał ekspresję tego genu; wartości wynosiły odpowiednio $R = 1,78 \pm 0,19$ dla LG2,5% oraz $R = 1,94 \pm 0,59$ dla LG5%. Najniższe wartości ekspresji *Hnf4a* notowano w grupie HCC, z minimum przy diecie SD ($R = 0,23 \pm 0,12$). Obie dawki LG zwiększały ekspresję *Hnf4a* niemal trzykrotnie, do $R = 0,65 \pm 0,37$ dla LG2,5% i $R = 0,64 \pm 0,23$ dla LG5%. (Ryc. 26 C)

6.5.4 *Tp53*

W grupie kontrolnej suplementacja LG prowadziła do wzrostu ekspresji *Tp53*, przy czym silniejszy efekt obserwowano po zastosowaniu LG5% ($R = 1,84 \pm 0,96$) niż LG2,5% ($R = 1,59 \pm 0,16$). W grupie PH ekspresja *Tp53* była istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej niezależnie od wariantu żywienia ($p < 0,05$). Najwyższą wartość obserwowano po zastosowaniu LG2,5%, gdzie osiągała ona $R = 3,76 \pm 0,19$. W grupie HCC najniższą ekspresję *Tp53* stwierdzono przy żywieniu SD ($R = 0,63 \pm 0,27$). Zastosowanie LG zwiększało ekspresję tego genu, szczególnie w wyższej dawce, dla której uzyskano wartość $R = 2,94 \pm 0,75$. (Ryc. 26 D)



Rycina 26. Względna ekspresja genów związanych z regulacją apoptozy i różnicowaniem hepatocytów: (A) Bax, (B) Bcl2, (C) Hnf4a oraz (D) Tp53. Przedstawiono średnie wartości względnej ekspresji genów (R) $\pm$ odchylenie standardowe dla zwierząt kontrolnych, po częściowej hepatektomii (PH) oraz z rakiem wątrobowokomórkowym (HCC), żywionych dietą standardową (SD) lub dietami z 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%) dodatkiem Lisosanu G (LG). Względną ekspresję genów wyznaczono metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$, z wykorzystaniem β -aktyny jako genu referencyjnego. Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety oznaczono wielkimi literami, natomiast różnice pomiędzy dietami w obrębie tej samej grupy oznaczono małymi literami. Analizę statystyczną przeprowadzono na wartościach ΔC_t z zastosowaniem modelu wieloczynnikowego, a porównania szczegółowe wykonano testami post hoc z korektą wielokrotnych porównań metodą Šidáka. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

6.6 Aktywność izolowanych pierwotnych hepatocytów

6.6.1 Aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów

W grupie kontrolnej aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów utrzymywała się na zbliżonym poziomie. Wartości po LG2,5% były jedynie nieznacznie wyższe niż przy SD, natomiast po LG5% osiągały najwyższy poziom we wszystkich punktach czasowych (24 h, 48 h, 7 dni i 14 dni) i były istotnie wyższe zarówno względem SD (we wszystkich przypadkach $p < 0,001$), jak i względem LG2,5% ($p < 0,05$). W czasie hodowli

hepatocytów w grupie kontrolnej wartości pozostawały stabilne przy SD i LG2,5%, natomiast po LG5% obserwowano dalszy wzrost aktywności w 7. i 14. dobie. W komórkach izolowanych od szczurów z grupy PH aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów była niższa niż w grupie kontrolnej. Suplementacja LG wiązała się z wyższymi wartościami niż SD, zwłaszcza w 7. i 14. dobie, jednak różnice te na ogół nie osiągały istotności statystycznej. Jedynie po 14 dniach w grupie LG2,5% odnotowano istotnie wyższą aktywność niż przy SD ($p = 0,040$). Największe różnice między punktami czasowymi i dietami obserwowano w modelu HCC, w którym aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów była najniższa przy SD. Dodatek LG w obu dawkach częściowo ograniczał ten spadek, zapewniając istotnie wyższe wartości we wszystkich analizowanych punktach czasowych ($p < 0,05$). (Ryc. 27)

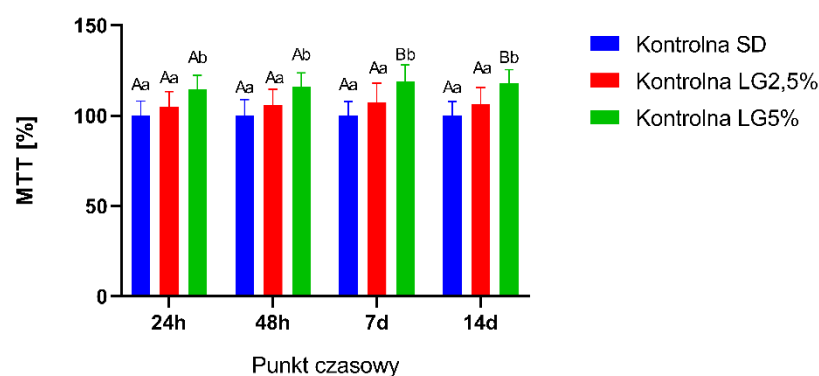
6.6.2 Stężenie NO

W grupie kontrolnej stężenie NO zwiększało się stopniowo wraz z czasem trwania hodowli we wszystkich wariantach żywienia. Najwyższe wartości obserwowano przy SD, natomiast po LG5% były one istotnie niższe we wszystkich punktach czasowych ($p < 0,05$). W grupie PH stężenie NO było wyższe niż w grupie kontrolnej. Suplementacja LG wiązała się z obniżeniem stężenia NO, szczególnie po zastosowaniu dawki 5%. Najwyższe wartości NO oraz największe różnice pomiędzy dietami obserwowano w modelu HCC, w którym LG5% wiązał się z istotnie niższym stężeniem NO w medium hodowlanym ($p < 0,05$). (Ryc. 28)

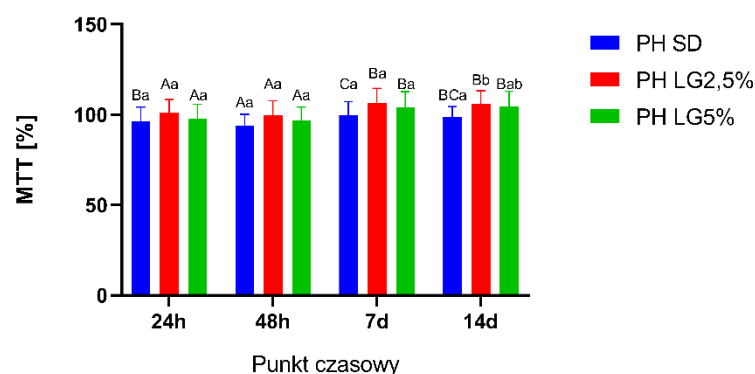
6.6.3 Anionorodnik ponadtlenny

Najwyższe stężenie anionorodnika ponadtlennego w medium hodowlanym w grupie kontrolnej obserwowano przy SD. Wartości po zastosowaniu LG5% były istotnie niższe niż przy SD we wszystkich punktach czasowych (24 h, 48 h, 7 dni i 14 dni; $p < 0,05$). W grupie PH stężenie anionorodnika ponadtlennego było wyższe niż w grupie kontrolnej. Suplementacja LG wiązała się z obniżeniem wartości tego parametru, szczególnie po zastosowaniu LG5%, dla którego we wszystkich punktach czasowych obserwowano najniższe wartości ($p < 0,01$). Najwyższe stężenie anionorodnika ponadtlennego oraz największe różnice pomiędzy dietami obserwowano w modelu HCC. Dodatek-LG w obu dawkach wiązał się z obniżeniem jego stężenia we wszystkich analizowanych punktach czasowych ($p < 0,05$). (Ryc. 29)

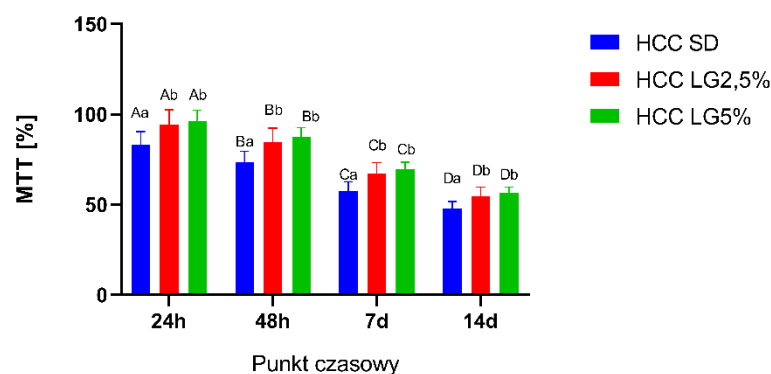
A



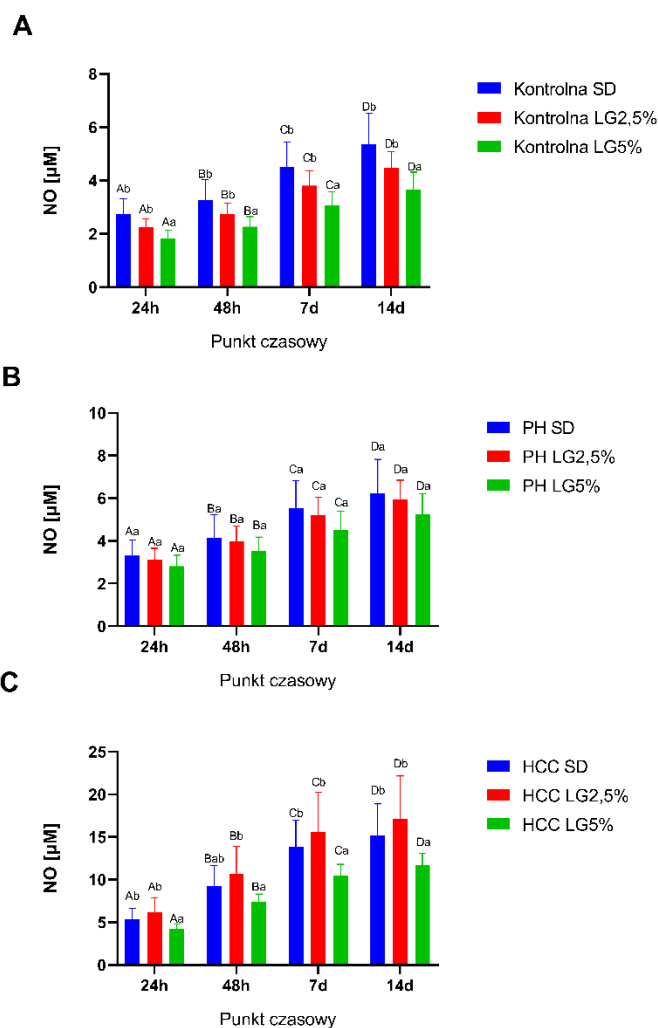
B



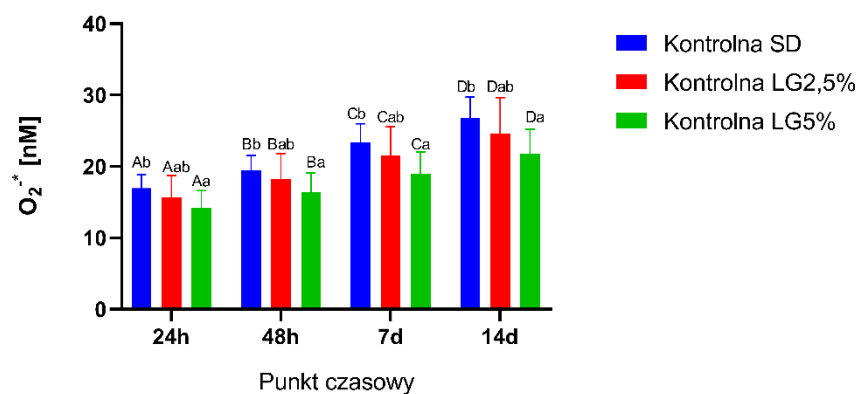
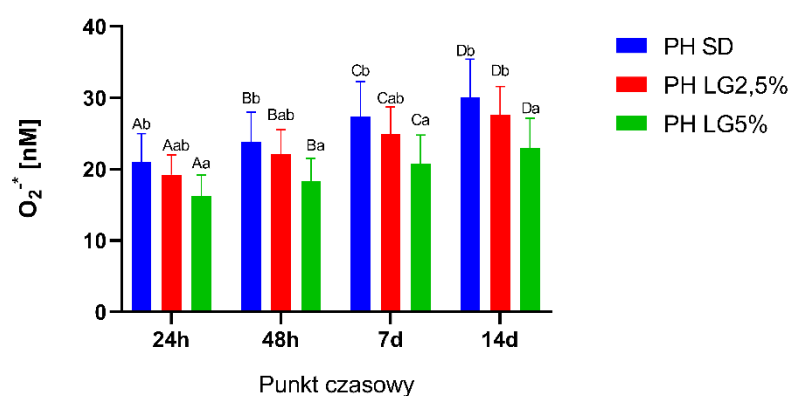
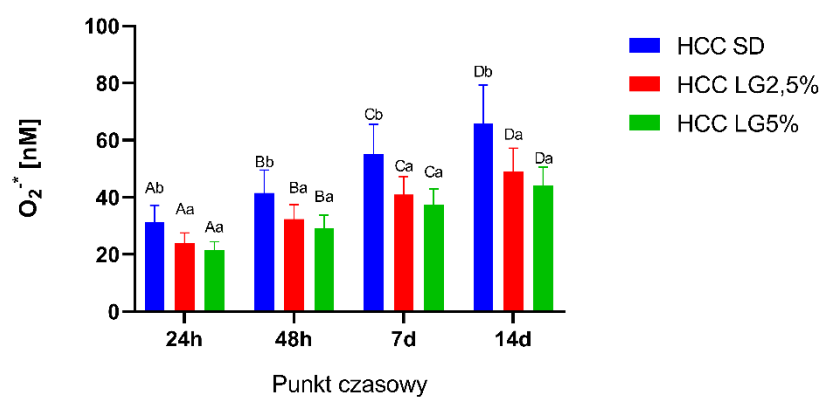
C



Rycina 27. Aktywność oksydoredukcyjna hepatocytów izolowanych od zwierząt kontrolnych i eksperymentalnych. Przedstawiono średnie wartości procentowe $\pm$ odchylenie standardowe dla hepatocytów izolowanych od zwierząt kontrolnych (A), PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z dodatkiem LG w dawce 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%). Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Wielkie litery oznaczają różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety, natomiast małe litery wskazują różnice pomiędzy dietami w obrębie tego samego stanu funkcjonalnego wątroby. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.



Rycina 28. Stężenie NO w medium hodowlanym. Przedstawiono średnie wartości (μM) $\pm$ odchylenie standardowe w analizowanych punktach czasowych dla hepatocytów izolowanych od zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z dodatkiem LG w dawce 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%). Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Wielkie litery oznaczają różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety, natomiast małe litery wskazują różnice pomiędzy dietami w obrębie tego samego stanu funkcjonalnego wątroby. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

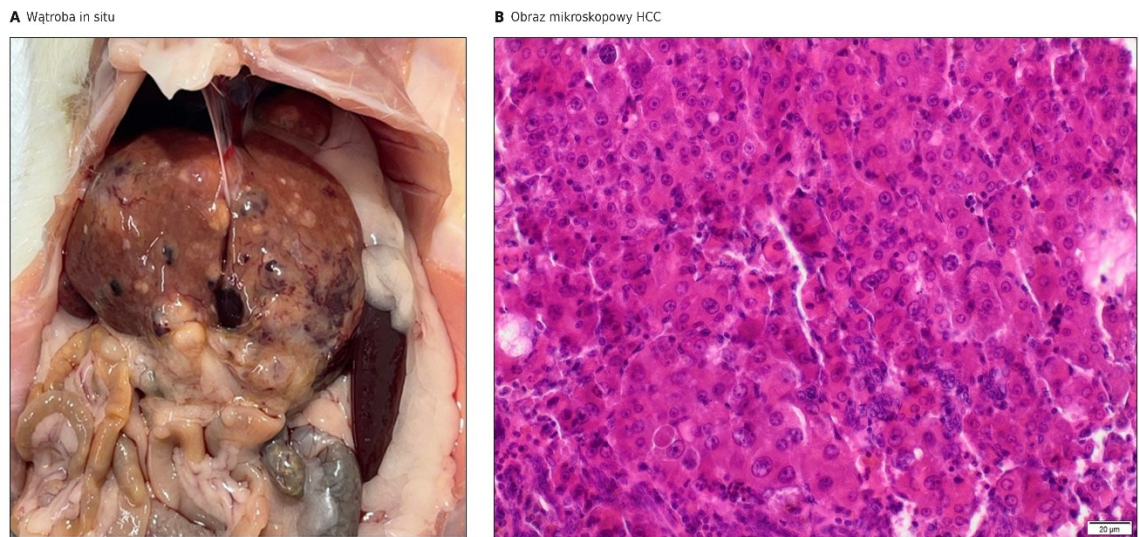
A**B****C**

Rycina 29. Stężenie anionorodnika ponadtlenkowego w medium hodowlanym. Przedstawiono średnie wartości (nM) $\pm$ odchylenie standardowe w analizowanych punktach czasowych dla hepatocytów izolowanych od zwierząt kontrolnych (A), po PH (B) oraz z HCC (C), żywionych SD lub dietami z dodatkiem LG w dawce 2,5% (LG2,5%) i 5% (LG5%). Słupki oznaczone tą samą literą wskazują brak istotnych statystycznie różnic. Wielkie litery oznaczają różnice pomiędzy typami uszkodzenia wątroby w obrębie tej samej diety, natomiast małe litery wskazują różnice pomiędzy dietami w obrębie tego samego stanu funkcjonalnego wątroby. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

6.7 Ocena histopatologiczna wątroby

W badaniu makroskopowym powierzchnia wątroby wykazywała niejednorodne zabarwienie, z licznymi rozsianymi ogniskami o różnej wielkości i barwie. Widoczne były również pojedyncze wypukłe zmiany guzkowe, miejscowo zmieniające zarys narządu, co widoczne jest na rycinie 30 A.

W preparatach mikroskopowych stwierdzono rozwój zmian nowotworowych odpowiadających HCC. W mięszu wątroby obecne były ogniska proliferacji atypowych hepatocytów, prowadzące do zaburzenia prawidłowej architektury zrazikowej. Komórki nowotworowe tworzyły nieregularne, pogrubiałe beleczki i skupiska komórkowe, miejscami o układzie pseudogruczołowym. Komórki budujące zmiany wykazywały wyraźną atypię, obejmującą zróżnicowanie wielkości komórek i jąder, powiększenie jąder komórkowych, zwiększenie stosunku jądro-cytoplazmatycznego oraz nieregularny zarys jąder. W obrębie zmian obserwowano również komórki o zmienionej morfologii, odróżniające się od otaczających hepatocytów. Towarzyszącym elementem obrazu były nacieki limfocytarne oraz cechy przewlekłego uszkodzenia mięszu wątroby. (Ryc. 30 B)



Rycina 30. Makroskopowy obraz wątroby szczurów z grupy HCC. (A) Widok narządu *in situ*; Widoczne ogniska o zróżnicowanej barwie oraz wypukłe zmiany na powierzchni wątroby (B) Obraz mikroskopowy HCC. Widoczne atypowe wielokątne hepatocyty o ziarnistej cytoplazmie. Barwienie H+E. Powiększenie x 200.

7. Dyskusja

Rak wątrobowokomórkowy rozwija się zwykle w wątrobie przewlekle uszkodzonej, w której włóknienie, proces zapalny, stres oksydacyjny i przebudowa mikrośrodowiska wątroby wzajemnie wzmacniają proces nowotworzenia. Hepatokancerogeneza to proces wieloetapowy, w którym istotne są nie tylko czynniki prokancerogenne, będące bezpośrednią przyczyną uszkodzenia DNA i powstania mutacji aktywującej protoonkogeny lub wyciszającej geny supresorowe, lecz także interakcje z mikrośrodowiskiem otaczającym transformowane komórki. Wyrazem takiego wzajemnego oddziaływania są obserwacje Baglieri i wsp.¹²⁵ wskazujące, że włóknienie oraz wzmożona aktywność komórek zrębu współtworzą warunki do progresji HCC. Przewlekle uszkodzenie struktury wątroby i towarzyszący mu proces zapalny stanowią kluczową składową tych interakcji, co potwierdzają badania Xu i wsp.⁵⁰. Wskazali oni na rolę interleukiny 6, jako cytokiny prozapalnej która nie tylko wzmacnia towarzyszące wzrostowi guza nowotworowego zapalenie, ale przez oś IL-6/STAT3 promuje proliferację komórek. Mając na względzie tak złożony obraz zmian w funkcji zarówno komórek nowotworowych jak i nienowotworowych intensywnie poszukuje się nowych związków o potencjale terapeutycznym, które nie będą działały jako typowe leki przeciwnowotworowe, lecz będą wpływały na modyfikację mikrośrodowiska guza, w którym procesy neoplastyczne będą utrudnione lub zahamowane.

Jednym z takich związków jest nutraceutyk otrzymywany z fermentowanej pszenicy Lisosan G. Dotychczas poczynione obserwacje wskazują, że produkty fermentacji zbóż, są od dawna wykorzystywane w profilaktyce i terapii chorób wątroby oraz wymiennie wpływają na przyspieszenie procesów regeneracyjnych w tym narządzie¹²⁶. Nadal brakuje jednak badań oceniających wpływ nutraceutyków bazujących na fermentowanych zbożach na funkcję komórek i zmiany mikrośrodowiska w warunkach hepatokancerogenezy.

Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują na potencjał LG do modyfikacji przebiegu hepatokancerogenezy. Należy jednak podkreślić, że te same procesy antyoksydacyjne i detoksykacyjne, na których przebieg wpływa LG, mają odmienne znaczenie w HCC w zależności od etapu choroby. We wczesnych etapach nasilenie mechanizmów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych ogranicza stężenie reaktywnych metabolitów, a tym samym może zmniejszać mutagenne uszkodzenia DNA.

W zaawansowanych fazach procesu nowotworowego może jednak sprzyjać adaptacji komórek nowotworowych do przewlekłego stresu. Badanie, choć wykonane na zwierzęcym modelu eksperymentalnej indukcji HCC, stanowi istotny wstęp do dalszych analiz nad zastosowaniem tego nutraceutyku w terapii wspomagającej pacjentów z HCC.

7.1. Lisosan G a wczesne etapy hepatokarcynogenezy: inicjacja i podatność na uszkodzenie

Wykorzystane w niniejszym doświadczeniu analizy biochemiczne koncentrowały się na określeniu aktywności enzymatycznej poszczególnych rodzin lub izoform CYP, będącej wyrazem ich funkcjonalnej sprawności. Wskaźnikiem ogólnej aktywności monooksygenaz mikrosomalnych jest ECOD, na którego zmianę wpływa kilka izoenzymów cytochromu P450. Aktywność enzymatyczna EROD natomiast jest uznawana za wskaźnik izoform CYP1A1/CYP1A2, podobnie aktywność AnH jest w dużej mierze wiązana ze sprawnością CYP2E1 a BqD z CYP3A. Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki świadczą o tym, że LG zmieniał funkcjonalny profil reakcji mikrosomalnych, choć zmiany te nie są jednoznaczne. Stwierdzonemu wzrostowi aktywności ECOD i EROD i nieznacznego stopnia wzrostowi aktywności BqD towarzyszyło obniżenie aktywności enzymu odpowiedzialnego za metabolizm nitrozoamin. Wynik ten z jednej strony może wskazywać na bardziej zróżnicowany fenotyp metaboliczny hepatocytów, co ma znaczenie kliniczne, ponieważ w ludzkim HCC często stwierdza się obniżenie ekspresji CYP1A2, a niski poziom tego enzymu w tkance guza koreluje z większą częstością inwazji do naczyń i krótszym przeżyciem pacjentów po resekcji, wolnym od nawrotu ¹²⁷. Z drugiej strony enzymy CYP1 uczestniczą również w bioaktywacji części prokancerogenów pochodzących ze środowiska.

W modelach opartych na indukcji HCC przez DEN o nasileniu procesu hepatokarcynogenezy decyduje nie tylko obecność samego prokancerogenu, lecz przede wszystkim wydajność jego metabolicznej aktywacji w hepatocytach. Enzym CYP2E1 uczestniczy w przemianie DEN do reaktywnych metabolitów etylujących, zdolnych do tworzenia adduktów DNA, w tym O-6-etyloguaniny, oraz do nasilania stresu oksydacyjnego. Powstałe uszkodzenia materiału genetycznego, utrwalane następnie

podczas proliferacji hepatocytów, sprzyjają przetrwaniu i ekspansji komórek wykazujących cechy komórek przednowotworowych. Właśnie dlatego model DEN pozwala analizować nie tylko końcowy efekt kancerogeny, ale również zależność pomiędzy biotransformacją ksenobiotyku, uszkodzeniem DNA i dalszą progresją zmian nowotworowych¹²⁸. Znaczenie tego mechanizmu potwierdzają obserwacje Kang i wsp.⁶⁷, według których brak CYP2E1 istotnie ograniczał hepatokarcynogenezę indukowaną DEN *in vivo*. Niemniej jednak, pomimo istotnej roli tej izoformy w generowaniu genotoksycznych pochodnych nitrozoamin, praca Ho i wsp.⁶⁹ ujawniła, że niska ekspresja CYP2E1 w rozwiniętym HCC wiąże się z większym rozmiarem guza, intensywnym naciekaniem na naczynia krwionośne, niższym stopniem zróżnicowania komórek i krótszym przeżyciem chorych. Pozorna sprzeczność w interpretacji zmian aktywności tego enzymu wynika z odmiennej roli CYP2E1 na różnych etapach hepatokarcynogenezy. W fazie inicjacji hepatokarcynogenezy wysoka aktywność CYP2E1 ma zatem znaczenie niekorzystne, ponieważ zwiększa pulę reaktywnych metabolitów N-nitrozowych pochodnych amin, a opisywane obniżenie ekspresji CYP2E1 w obrębie rozwiniętego już guza wskazuje na silne metaboliczne uproszczenie funkcji hepatocytów, a tym samym jest cechą biologicznie bardziej agresywnego nowotworu.

Wyniki uzyskane dla enzymów fazy II biotransformacji wskazują, że LG przesunął kierunek reakcji w stronę neutralizacji reaktywnych metabolitów generowanych przez reakcje I fazy. Odzwierciedleniem nasilenia obrony antyoksydacyjno-detoksyfikacyjnej jest wzrost aktywności GST i DT-diaforazy połączony z jednoczesnym obniżeniem poziomu markerów uszkodzeń oksydacyjnych. Oba enzymy należą do podstawowych komponentów układu ochronnego komórki kontrolowanego przez czynnik Nrf2⁸⁰. Uzyskane wyniki pozostają zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi tego nutraceutyku, świadczących o indukowaniu przez LG odpowiedzi przeciwrodnikowej zależnej od Nrf2¹¹³. W szerszym ujęciu można stwierdzić że, obniżonej aktywności związanej z bioaktywacją prokancerogenu towarzyszyła większa sprawność mechanizmów jego detoksykacji. Wydaje się zatem że LG również w warunkach *in vivo* aktywuje szlaki zależne Nrf2.

W warunkach homeostazy czynnik ten jest wiązany przez białko Keap1 i kierowany do degradacji proteasomalnej. Wzrost stężenia reaktywnych form tlenu lub związków elektrofilowych, który obserwowany jest w przebiegu kancerogenezy, degraduje białko

Keap1, stabilizuje czynnik Nrf2 i umożliwia jego translokację do jądra komórkowego, gdzie pobudza endogenne szlaki odpowiedzi antyoksydacyjnej ARE (antioxidant response element) aktywując jednocześnie geny kodujące m.in. DT-diaforazy, GST, HO-1 oraz enzymy syntezy glutationu. W przewlekle uszkodzonej wątrobie aktywowanie tego szlaku w hepatocytach pełni funkcję ochronną. Efekt taki nie jest jednak zawsze korzystny, przeciwnowotworowy, ponieważ rozpatrywać go należy przez pryzmat etapu kancerogenezy na którym został stwierdzony. Te same mechanizmy antyoksydacyjne w rozwiniętym i ukształtowanym guzie nowotworowym wzmacniają zdolność komórek nowotworowych do przetrwania w warunkach stresu oksydacyjnego, a nawet w warunkach działania chemioterapeutyków. Utrwalona aktywacja Nrf2 sprzyja powstawaniu populacji komórek o zmniejszonej wrażliwości na sorafenib, a eksperymentalne zahamowanie osi Nrf2-ARE zwiększyło wrażliwość komórek na 5-fluorouracyl i doksorubicynę oraz potwierdziło udział tego szlaku w mechanizmach lekooporności komórek nowotworowych¹²⁹. Oś Nrf2 należy rozpatrywać przez pryzmat jej wpływu na los komórki. Jej osłabienie obniża zdolności obronne i zwiększa podatność na uszkodzenia, co w przypadku nowotworów ułatwia ich eliminację, natomiast jej aktywacja zapewnia komórkom przewagę adaptacyjną w zmienionym mikrośrodowisku.

Podobnie do osi Nrf2-ARE osobnego omówienia wymaga każdy z indukowanych przez nią enzymów, ponieważ wzrost ich aktywności przekłada się w odmienny sposób na biologiczną agresywność komórek guza. Pronowotworowe znaczenie DT-diaforazy wykazano w pracy Xue i wsp.¹³⁰ gdzie była ona włączona w ograniczenie indukowanej przez lenwatynib akumulacji ROS aktywującej szlaki apoptozy, sprzyjając oporności na ten lek. Ponadto Chen i wsp.¹³¹ wykazali, że zależny od UBA2 proces SUMOylacji DT-diaforazy w reszcie lizyny 240 zmienia aktywność osi PP2A/MAPK i sprzyja proliferacji, migracji oraz inwazji komórek HCC. Niekorzystnie postrzegać należy również wyniki uzyskane przez Tang i wsp.,¹³² którzy wykorzystując analizy wieloomiczne i przestrzenną ocenę TME, powiązali wysoką ekspresję DT-diaforazy w komórkach HCC z przewagą TAM o fenotypie M2 oraz gorszym rokowaniem pacjentów. W kontrze do powyższych obserwacji wielu autorów wskazuje antynowotworowy potencjał enzymów II fazy biotransformacji, w tym np. GST. Liu i wsp.¹³³ wykazali, że wysoka ekspresja GSTP1 może hamować proliferację komórek HCC, co wiążali ze zmniejszoną fosforylacją Akt oraz zwiększoną ekspresją inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (p21 i p27). Dostępne są również dane świadczące o tym że wysoka ekspresja DT-diaforazy

obniżać ekspresję BCL-2 oraz zwiększać poziom BAX i kaspazy 3, prowadząc do nasilenia apoptozy¹³⁴.

Biorąc pod uwagę czynniki sprzyjające hepatokancerogenezie podkreślenia wymaga, że to właśnie przewlekły stres oksydacyjny łączy uszkodzenie DNA z aktywacją szlaków zapalnych, regeneracją kompensacyjną i regulowaną śmiercią komórkową, które wspólnie kształtują przebieg transformacji nowotworowej. Włączenie LG u pacjentów na tym etapie, przez wykazane działanie wzmagające odpowiedź antyoksydacyjną i remodelującą aktywność wybranych izoform CYP P450 mogłoby opóźnić rozwój HCC.

7.2. Lisosan G a promocja nowotworzenia: przewlekłe zapalenie i śmierć komórkowa

Przewlekłe zapalenie stanowi pomost między chronicznym uszkodzeniem wątroby a promocją HCC. Jednym z przejawów tego jest opisana przez Nenu i wsp.¹³⁵ IL-6 jako cytokina sprzyjająca proliferacji i przebudowie TME. Podobnie He i Karin⁴⁹ wskazali, że aktywacja szlaków NF- κ B i IL-6-STAT3 tworzy sprzężony układ łączący zapalenie z nowotworzeniem w wątrobie, a nowsze opracowanie Zhang i wsp.¹³⁶ podkreśla również rolę szlaku STAT3 w zmianach aktywności komórek układu odpornościowego w przebiegu HCC. W procesie nowotworowym mniej jednoznaczna jest rola TNF- α , który z jednej strony podtrzymuje przewlekły proces zapalny i ogólnoustrojowe konsekwencje choroby nowotworowej, a z drugiej jednak strony wspiera również mechanizmy cytotoksyczne¹³⁷. Te dwa oblicza jej aktywności znajdują również odzworowanie w nomenklaturze, wszak ten czynnik określany jest zarówno jako kachektyna/kacheksyna jak i czynnik martwicy nowotworów.

Przez wzgląd na obniżenie stężenia IL-6 po zastosowaniu LG w HCC wnioskować można, że preparat osłabia sygnał przekazywany przez oś IL-6/STAT3, co z kolei wiąże się ze słabszą proliferacją komórek nowotworowych. O ile LG zmieniał stężenia IL-6, nie obserwowano jego istotnego wpływu na TNF- α . Brak wyraźnego obniżenia TNF- α pod wpływem LG może wskazywać na selektywny charakter działania tego nutraceuty.

Analizując wpływ procesu zapalnego na dynamikę rozwoju HCC wspomnieć należy również o roli RIPK1 i RIPK3. Kondylis i Pasparakis¹³⁸ opisali kinazy RIP jako cząsteczki regulacyjne, które decydują o tym, czy komórka w uszkodzonej wątrobie

aktywuje odpowiedź sprzyjającą przeżyciu i aktywacji NF- κ B, czy też przechodzi w kierunku programowanej śmierci komórkowej jaką jest nekroptoza. W warunkach sprzyjających nekroptozie RIPK3 uczestniczy w aktywacji MLKL, co prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej i uwalniania cząsteczek alarmowych DAMP. Cząsteczki pobudzają komórki odpornościowe oraz podtrzymują wytwarzanie cytokin, a w przewlekle uszkodzanej wątrobie mogą nasilać zapalenie i proliferację kompensacyjną. Kinaza RIP1 pełni w tym układzie funkcję szczególnie złożoną, ponieważ może regulować zarówno nekroptozę, jak i sygnalizację NF- κ B oraz apoptozę¹³⁹. Tezy zawarte w pracy Tayir i wsp.¹⁴⁰ podkreślają, że nekroptoza w HCC ma podwójny charakter, gdyż może ograniczać przeżycie części komórek nowotworowych, ale równocześnie wzmacniać prozapalne konsekwencje uwalniania DAMP do mikrośrodowiska guza i tym samym utrzymywać procesy sprzyjające progresji guza.

Mając to na uwadze, wartym zauważenia jest fakt, że obserwowanemu obniżeniu stężenia RIPK3 po zastosowaniu LG nie towarzyszyła porównywalna zmiana RIPK1. Poszerzając te obserwacje o wyniki dotyczące osi BAX/BCL2 stwierdzić należy, że LG nie działała klasycznie proapoptotycznie lub pronekroptotycznie, lecz może osłabiać komponent odpowiedzi zależny od RIPK3, który w przewlekle uszkodzanej wątrobie sprzyja podtrzymaniu zapalenia. Potencjalnym następstwem takiej modulacji jest ograniczenie uszkodzenia błon komórkowych, uwalniania DAMP oraz wtórnej rekrutacji i aktywacji komórek zapalnych^{141,142}.

Znaczenie odpowiedzi zapalnej w kancerogenezie wykracza poza same cytokiny i kinazy. Istotne są również syntezowane *de novo*, w środowisku guza reaktywne formy azotu. Dios-Barbeito i wsp.¹⁴³ wskazują, że w warunkach zwiększonego wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego NO może tworzyć reaktywne formy azotu, w tym nadtlenoazotyn, które silnie uszkodzają lipidy, białek i DNA. Utrzymujący się stres oksydacyjny i nitrozacyjny nie jest zatem wyłącznie następstwem choroby wynikającym np. z dysfunkcyjnych mitochondriów. Jest to przede wszystkim zjawisko aktywujące szlaki adaptacyjne, wspierające plastyczność metaboliczną i ułatwiające komórkom HCC przetrwanie w niekorzystnym środowisku^{144,145}. Obniżenie stężenia NO i anionorodnika ponadtlenkowego obserwowane w hodowli hepatocytów izolowanych od zwierząt z HCC, przy zachowanej wyższej aktywności oksydoredukcyjnej komórek, wskazuje na ograniczenie ich aktywności prooksydacyjnej, przy zachowaniu zdolności komórek do odpowiedzi adaptacyjnej o czym świadczy niezmienną sprawność mitochondriów.

7.3. Lisosan G a progresja i fenotyp komórki nowotworowej

Progresja nowotworu wiąże się m.in. z zaburzeniami procesu prawidłowego różnicowania komórek. Wobec tego w przebiegu hepatokancerogenezy ważnym staje się analiza markerów różnicowania wskazujących na dojrzały fenotyp komórki. Do głównych czynników odpowiedzialnych za dojrzewanie hepatocytów zaliczyć należy HNF4 α . Jak wykazują liczni autorzy spadek ekspresji HNF4 α wiąże się z nasileniem transformacji epitelialno-mezenchymalnej komórek (EMT), zaburzeniami metabolicznymi a tym samym większą agresywnością komórek HCC¹⁴⁶. Wśród czynników molekularnych istotną rolę pełni również TP53 uczestniczący w kontroli cyklu komórkowego, naprawie DNA i ograniczaniu ekspansji komórek o niestabilnym genomie. Ranjbar-Niavol i wsp.¹⁴⁷ wskazują, że równowaga p53/NANOG współkształtuje stan różnicowania komórek raka wątroby. Ekspresję HNF4 α i TP53 należy więc rozpatrywać wspólnie jako czynniki, które decydują o fenotypie i funkcji komórki nowotworowej.

Przedstawiony w niniejszej pracy wzrost ekspresji HNF4 α pod wpływem LG oraz równoległy wzrost TP53 w grupie HCC wskazują na utrzymywanie przez komórki fenotypu bardziej zróżnicowanego. Taki kierunek zmian można łączyć z wcześniej omówioną zmianą homeostazy redoks i zapalenia. Przewlekłe uwalnianie ROS/RNS, IL-6 oraz sygnały płynące z komórek mikrośrodowiska mogą aktywować proliferację i metaboliczne przeprogramowanie komórek HCC. Ograniczenie tych czynników przekłada się na częściowe zachowanie funkcji hepatocytów. Nie oznacza to co prawda przywrócenia prawidłowej funkcji tych komórek w przebiegu HCC, jednak wyniki te wskazują, że LG może ograniczać utratę przez komórki ich aktywności metabolicznej, a tym samym może spowalniać progresję choroby.

Uzyskane obserwacje uzupełniają wyniki zmian poziomów AFP i PKM2. Niższymi wartościami AFP i PKM2 w grupach otrzymujących LG towarzyszyło mniejsze obciążenie metaboliczne. Kim i wsp.¹⁴⁸ wskazali że, AFP może wspierać wzrost komórek HCC przez aktywację szlaku PI3K/Akt/mTOR, promować przeżycie komórek przez wpływ na Bcl-2 oraz uczestniczyć w immunosupresji i lekooporności. Z kolei jak wykazali Wan i wsp.¹⁴⁹, PKM2 reguluje tempo przemian energetycznych w HCC i wpływa nie tylko na glikolizę, ale również na sygnalizację PI3K/Akt/mTOR i MAPK. W

wymierny sposób zatem aktywność tej kinazy przekłada się na wzrost guza, przeżycie komórek oraz ich zdolność do progresji. Nowsze opracowania wskazują również, że PKM2 może warunkować zmiany epigenetyczne i odpowiedź komórki na stres, co czyni to białko jednym z centralnych markerów plastyczności fenotypowej komórki HCC¹⁵⁰. Biorąc pod uwagę całokształt obserwowanych po LG zmian można powiedzieć, że ograniczenie zapalenia i stresu oksydacyjnego zmniejsza presję na metaboliczną adaptację komórek a wraz z nią słabnie ekspresja markerów związanych z bardziej agresywnym fenotypem, równoczesny wzrost HNF4α odpowiada utrzymaniu przez komórki ich funkcji. Wyniki własne zatem wskazują, że Lisosan G osłabia przeprogramowanie metaboliczne.

7.4. Lisosan G a rezerwa czynnościowa wątroby i ogólna kondycja organizmu

W ocenie klinicznej HCC aktywność guza nie może być rozpatrywana wyłącznie przez samą aktywność komórek, bez odniesienia jej do funkcji i rezerwy czynnościowej wątroby. Strategia BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer - system oceny zaawansowania oraz doboru leczenia dla pacjentów z HCC) podkreśla, że postępowanie terapeutyczne w HCC jest nierozdzielnie związane z oceną wydolności wątroby, a nowsze opracowania dotyczące wykorzystania prognostycznego wskaźnika ALBI (albumina-bilirubina) wskazują, że albumina i bilirubina tworzą obiektywny układ parametrów służący do oceny funkcji narządu¹⁵¹⁻¹⁵³.

Najbardziej korzystne działanie Lisosanu G wyrażało się w spadku aktywności GGT. Jest to korzystna obserwacja ponieważ metaanaliza przeprowadzona przez Huang i wsp.¹⁵⁴ potwierdziła dodatnią korelację utrzymującej się wysokiej aktywności GGT z gorszym rokowaniem u chorych z HCC.

Dodatek LG do diety wpływał również na pozostałe analizowane enzymy wątrobowe. Obniżenie surowiczej aktywności ALT i AST po zastosowaniu LG świadczy o mniejszego stopnia uszkodzeniu miększu i zachowaniu rezerwy czynnościowej narządu.

Zależność między albuminą a ALP jest również opisywana w piśmiennictwie jako prognostyczny wskaźnik oceny funkcji narządu i rokowania w HCC¹⁵⁵. Wyższe wartości

ALB/ALP w grupach otrzymujących LG w punkcie końcowym HCC mogą sugerować lepsze rokowanie u pacjentów.

W HCC również spadek masy ciała, niedożywienie i sarkopenia należą do najważniejszych czynników pogarszających rokowanie oraz tolerancję pacjenta na leczenia. Cespiati i wsp. podkreślili, że sarkopenia negatywnie wpływa na wyniki leczenia HCC¹⁵⁶. Obniżona masa mięśniowa i niekorzystny skład ciała wiążą się z gorszym przeżyciem po leczeniu radykalnym lub paliatywnym¹⁵⁷. W tym kontekście utrzymanie wyższej masy ciała po Lisosan G należy interpretować korzystnie, ponieważ preparat ten ograniczał część niekorzystnych następstw przewlekłej hepatokarcynogenezy dla kondycji ogólnej zwierząt.

7.5 Nieliniowy charakter odpowiedzi na zróżnicowany udział LG w diecie

W badaniach nad produktami wieloskładnikowymi oczekiwanie, że większy udział preparatu w diecie wywoła proporcjonalnie silniejszą odpowiedź biologiczną, nie zawsze jest uzasadnione. Wang i Wang¹⁵⁸ oraz Yadav¹⁵⁹ opisują zjawisko hormezy żywieniowej jako odpowiedź adaptacyjną, w której efekt zależy od intensywności bodźca, jego czasu oraz stanu komórki. Z tego względu nie można jednoznacznie określić która z obserwowanych diet, z 2,5% czy 5% udziałem LG, wykazywała skuteczniejszy efekt biologiczny, pomimo tego że kierunek zmian pozostawał spójny. Dla części parametrów zauważalną przewagą odznaczało się zastosowanie 2,5% dodatku (np. aktywność BqD i GST), podczas gdy dla innych był to 5% dodatek (np. ekspresja BAX i generowanie NO)

Dane dotyczące samego LG przemawiają za tym że jego działanie najsilniej uwidacznia się w komórkach o upośledzonej funkcji. Analizując dostępne dane literaturowe widać że w badaniu przeprowadzonym przez La Marca i wsp.¹¹³ jego działanie w hepatocytach było najsilniejsze w tych komórkach które poddano stresowi oksydacyjnemu, a w badaniu przeprowadzonym przez Pozzo i wsp.¹⁶⁰ udowodniono że u zdrowych królików efekt działania LG był marginalny. Zbieżne z tymi obserwacjami są wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Porównanie trzech stanów wątroby uwidacznia że w warunkach zdrowia odpowiedź na LG była niewielka, natomiast po PH i w HCC obserwowano znaczący wpływ tego nutraceutyku. Kuklin i wsp.¹⁶¹ wykazali, że krzyżowanie się szlaków Nrf2 i NF-κB reguluje proliferację hepatocytów w wątrobie prawidłowej i uszkodzonej. Badanie to pomaga zrozumieć, dlaczego odpowiedź na LG

może różnić się między regeneracją a hepatokarcynogenezą. W jednym przypadku celem homeostazy jest odtworzenie miększu, w drugim odpowiedź komórek obciążona jest trwałym współistniejącym niekorzystnym TME.

7.6. Znaczenie translacyjne i kierunki dalszych badań

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że LG może modyfikować elementy środowiska prokancerogenego: równowagę redoks, komponent zapalny, funkcjonalny profil biotransformacji oraz część markerów fenotypu i kondycji narządu.

Analiza tak złożonego i polietiologicznego procesu, jakim jest hepatokancerogeneza wymaga kompleksowej oceny nie tylko funkcji samych komórek, ale również komórek wchodzących w skład TME. Obserwacje takie będą szczególnie istotne, gdyż Gu i wsp¹⁶². wykazali, że mikrośrodowisko okołoguzowe ma własny profil proteomiczny związany z HCC. Biorąc to pod uwagę, dalszy kierunek badań powinien obejmować również równoległą ocenę ekspresji mRNA, poziomu białka i aktywności katalitycznej konkretnych izoform CYP oraz bezpośredni pomiar adduktów DNA związanych z ekspozycją na DEN. Uzupełnienie tych badań o parametry funkcji mitochondrialnej, potencjał błony, zużycie tlenu, produkcję ATP, mitochondrialne ROS i markery mitofagii, pozwoliłoby połączyć obserwowaną odpowiedź redoks z metabolizmem i przeżyciem komórki. Taki projekt umożliwiłby rozdzielenie wpływu LG na wczesną bioaktywację prokancerogenu od jego późniejszych następstw w TME.

Ocena translacyjna powinna obejmować również bezpieczeństwo farmakokinetyczne. Wielu autorów^{163–165} zwraca uwagę, że preparaty pochodzenia naturalnego mogą modulować CYP, transportery oraz inne elementy farmakokinetyki leków przeciwnowotworowych. Ponieważ w niniejszym badaniu LG zmieniał profil aktywności mikrosomalnej, ewentualne wykorzystanie go jako elementu postępowania wspomagającego wymaga uprzedniej oceny interakcji z lekami stosowanymi w HCC i przewlekłych chorobach wątroby.

Podsumowując, LG w badanym modelu działał przez ograniczenie stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego, modulację enzymów biotransformacji i układu antyoksydacyjnego oraz osłabienie prozapalnej sygnalizacji, szczególnie zależnej od IL-6. Zmianom tym towarzyszyło ograniczenie części wskaźników uszkodzenia hepatocytów, śmierci komórkowej i niekorzystnego fenotypu HCC, co wskazuje na

częściowe osłabienie środowiska sprzyjającego progresji nowotworu. Zakres oraz kierunek tej odpowiedzi zależały jednak od stanu funkcjonalnego wątroby i udziału LG w diecie. Uzyskane wyniki wstępne są obiecującą przesłanką do podjęcia dalszych badań nad tym nutraceutykiem.

8. Wnioski

1. Lisosan G, wpływając korzystnie na utrzymanie masy ciała zwierząt z rakiem wątrobowokomórkowym oraz jednocześnie podtrzymując rezerwę czynnościową wątroby, wykazuje potencjał do zastosowania w terapii wspomagającej leczenie tego nowotworu.
2. Lisosan G niejednoznacznie wpływa na mikrosomalny metabolizm ksenobiotyków. Jego korzystne działanie wiąże się z obniżeniem aktywności AnH, a tym samym ograniczeniem bioaktywacji kancerogenu, przy jednoczesnym wzroście aktywności ECOD i EROD oraz BqD, wskazujących na utrzymanie metabolicznego zróżnicowania komórek.
3. Uzyskane wyniki potwierdziły, że Lisosan G antyoksydacyjnie moduluje mikrośrodowisko guza, poprzez ograniczenie peroksydacji lipidów i hamowanie oksydacyjnego uszkodzenia białek. Ponadto niezależnie od użytej w doświadczeniu dawki LG hamuje zapalny komponent hepatokarcynogenezy zależny od osi IL-6–RIPK3.
4. Mając na uwadze fakt obniżonego stężenia białka pro-nekroptotycznego RIPK3 oraz brak przesunięcia równowagi BAX/BCL-2 w kierunku odpowiedzi proapoptotycznej, należy wnioskować, że LG nie nasila programowanej śmierci komórkowej na drodze apoptozy ani nekroptozy. Z drugiej jednak strony, zwiększając ekspresję HNF4 α i TP53, nutraceutyk utrzymuje korzystny, zróżnicowany fenotyp komórek.
5. Opierając się na wynikach aktywności enzymów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych, markerów zapalenia oraz analizowanej *in vitro* aktywności komórek, należy stwierdzić, że w większości przypadków działanie LG jest niezależne od jego dawki.
6. Brak jednoznacznego wpływu LG w przebiegu HCC na szlaki programowanej śmierci komórkowej oraz jego złożony wpływ na metabolizm ksenobiotyków uzasadniają konieczność dalszych badań przed zastosowaniem tego nutraceutyku w terapii wspomagającej leczenie nowotworów wątroby.

9. Bibliografia

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* **74**, 229–263 (2024).
2. Rumgay, H. *et al.* Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *Journal of Hepatology* **77**, 1598–1606 (2022).
3. Bruix, J. & Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **42**, 1208–1236 (2005).
4. Sangro, B. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines on the management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **82**, 315–374 (2025).
5. Singal, A. G., Pillai, A. & Tiro, J. Early Detection, Curative Treatment, and Survival Rates for Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis: A Meta-analysis. *PLOS Medicine* **11**, e1001624 (2014).
6. Cassinotto, C. *et al.* Life expectancy of patients with hepatocellular carcinoma according to the upfront treatment: A nationwide analysis. *Diagnostic and Interventional Imaging* **104**, 192–199 (2023).
7. Patnaik, A. K., Hurvitz, A. I. & Lieberman, P. H. Canine Hepatic Neoplasms: A Clinicopathologic Study. *Vet Pathol* **17**, 553–564 (1980).
8. Kinsey, J. R., Gilson, S. D., Hauptman, J., Mehler, S. J. & May, L. R. Factors associated with long-term survival in dogs undergoing liver lobectomy as treatment for liver tumors. *Can Vet J* **56**, 598–604 (2015).
9. Gibson, E. A., Goldman, R. E. & Culp, W. T. N. Comparative Oncology: Management of Hepatic Neoplasia in Humans and Dogs. *Vet Sci* **9**, 489 (2022).
10. Grabarević, Z. *et al.* Comparative analysis of hepatocellular carcinoma in men and dogs. *Coll Antropol* **33**, 811–814 (2009).
11. Leela-Arporn, R. *et al.* Epidemiology of massive hepatocellular carcinoma in dogs: A 4-year retrospective study. *Vet J* **248**, 74–78 (2019).
12. Liptak, J. M. *et al.* Massive hepatocellular carcinoma in dogs: 48 cases (1992–2002). *J Am Vet Med Assoc.* **225**, 1225–1230 (2004).
13. Brandstetter, V. *et al.* Feline primary nonhematopoietic malignant liver tumours: A multicenter retrospective study (2000–2021). *Vet Com Oncol* **21**, 191–199 (2023).
14. Post, G. & Patnaik, A. K. Nonhematopoietic hepatic neoplasms in cats: 21 cases (1983–1988). *J Am Vet Med Assoc.* **201**, 1080–1082 (1992).
15. Pesavento, P. A. *et al.* A Novel Hepadnavirus is Associated with Chronic Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Cats. *Viruses* **11**, 969 (2019).
16. Capozza, P. *et al.* Domestic Cat Hepadnavirus: Molecular Epidemiology and Phylogeny in Cats in Hong Kong. *Viruses* **15**, 150 (2023).
17. Cavasin, J. P. *et al.* Recurrent integration of domestic cat hepatitis B virus DNA near feline *CCNE1* supports an oncogenic role in hepatocellular carcinoma in cats. *Tumour Virus Research* **20**, 200324 (2025).
18. Macek Jilkova, Z., Kurma, K. & Decaens, T. Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: The Role of Immune System and Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* **11**, 1487 (2019).
19. Newell, P., Villanueva, A., Friedman, S. L., Koike, K. & Llovet, J. M. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **48**, 858–879 (2008).
20. Brown, Z. J., Heinrich, B. & Greten, T. F. Mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and highlights for immunotherapy research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 536–554 (2018).
21. Liu, S. *et al.* Mouse Models of Hepatocellular Carcinoma: Classification, Advancement, and Application. *Front Oncol* **12**, 902820 (2022).
22. Schulien, I & Hasselblatt P., Diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice. in *Methods in Cell Biology* vol. 163 137–152 (Academic Press, 2021).

23. Roberfroid, M. B., Delzenne, N. & Preat, V. Modulation of Hepatocarcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **31**, 163–175 (1991).
24. Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Takano, T. & Ito, N. Dose responses of five hepatocarcinogens for the initiation of rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters* **14**, 279–283 (1981).
25. Machado, M. V. *et al.* Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PLoS ONE* **10**, e0127991 (2015).
26. Febbraio, M. A. *et al.* Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They? *Cell Metabolism* **29**, 18–26 (2019).
27. Kim, G.-Y., Kim, D., Jeon, J., Seo, W. & Park, S. H. Navigating liver cancer with mouse models: a comprehensive overview of HCC experimental systems. *J Liver Cancer* **25**, 239–250 (2025).
28. Donati, B. *et al.* MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. *Sci Rep* **7**, 4492 (2017).
29. Bianco, C. *et al.* Non-invasive stratification of hepatocellular carcinoma risk in non-alcoholic fatty liver using polygenic risk scores. *J Hepatol* **74**, 775–782 (2021).
30. Den Boer, E. R., Fieten, H. & Aicher, K. M. Copper-associated Chronic Hepatitis in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **55**, e25–e54 (2025).
31. Hirose, N. *et al.* A Retrospective Histopathological Survey on Canine and Feline Liver Diseases at the University of Tokyo between 2006 and 2012. *Journal of Veterinary Medical Science* **76**, 1015–1020 (2014).
32. Amin, N., Anwar, J., Sulaiman, A., Naumova, N. N. & Anwar, N. Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review. *Diseases* **13**, 207 (2025).
33. Axley, P., Ahmed, Z., Ravi, S. & Singal, A. K. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* **6**, 1–6 (2018).
34. Lv, X., Ye, G., Zhang, X. & Huang, T. p16 Methylation was associated with the development, age, hepatic viruses infection of hepatocellular carcinoma, and p16 expression had a poor survival: A systematic meta-analysis (PRISMA). *Medicine (Baltimore)* **96**, e8106 (2017).
35. Liu, C. *et al.* MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **53**, 98–107 (2010).
36. Pan, Z. *et al.* A literature review of genetics and epigenetics of HCV-related hepatocellular carcinoma: translational impact. *Hepatobiliary Surg Nutr* **13**, 650–661 (2024).
37. Vogel, A., Meyer, T., Sapisochin, G., Salem, R. & Saborowski, A. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet* **400**, 1345–1362 (2022).
38. Devarbhavi, H. *et al.* Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology* **79**, 516–537 (2023).
39. Motta, B. M., Masarone, M., Torre, P. & Persico, M. From Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) to Hepatocellular Carcinoma (HCC): Epidemiology, Incidence, Predictions, Risk Factors, and Prevention. *Cancers* **15**, 5458 (2023).
40. Clark, M. & Hoenig, M. Feline comorbidities: Pathophysiology and management of the obese diabetic cat. *J Feline Med Surg* **23**, 639–648 (2021).
41. Clark, M. & Hoenig, M. Metabolic Effects of Obesity and Its Interaction with Endocrine Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **46**, 797–815 (2016).
42. Van Den Bossche, L. *et al.* Aberrant hepatic lipid storage and metabolism in canine portosystemic shunts. *PLoS ONE* **12**, e0186491 (2017).
43. Habermaass, V. *et al.* Lipid Dysmetabolism in Canine Chronic Liver Disease: Relationship Between Clinical, Histological and Immunohistochemical Features. *Veterinary Sciences* **12**, 220 (2025).
44. Jia, W., Xie, G. & Jia, W. Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 111–128 (2018).

45. Alison, M. R., Nicholson, L. J. & Lin, W.-R. Chronic Inflammation and Hepatocellular Carcinoma. in *Inflammation and Gastrointestinal Cancers* (ed. Jankowski, J. A. Z.) vol. 185 135–148 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011).
46. Roy, A. M., Iyer, R. & Chakraborty, S. The extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: Mechanisms and therapeutic vulnerability. *Cell Rep Med* **4**, 101170 (2023).
47. Min, K., Karuppannan, S. K. & Tae, G. The impact of matrix stiffness on hepatic cell function, liver fibrosis, and hepatocellular carcinoma—Based on quantitative data. *Biophysics Rev.* **5**, 021306 (2024).
48. Brown, Z. J., Ruff, S. M. & Pawlik, T. M. The effect of liver disease on hepatic microenvironment and implications for immune therapy. *Front Pharmacol* **14**, 1225821 (2023).
49. He, G. & Karin, M. NF- κ B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* **21**, 159–168, 760971 (2011).
50. Xu, J., Lin, H., Wu, G., Zhu, M. & Li, M. IL-6/STAT3 Is a Promising Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **11**, (2021).
51. Webster, C. R. L. *et al.* ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. *J Vet Intern Med* **33**, 1173–1200 (2019).
52. Jaffey, J. A. Feline cholangitis/cholangiohepatitis complex. *J Small Anim Pract* **63**, 573–589 (2022).
53. Sato, K. *et al.* Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology* **69**, 420–430 (2019).
54. Kew, M. C. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* **22**, 305–310 (2013).
55. Gemedé, H. F. Toxicity, Mitigation, and Chemical Analysis of Aflatoxins and Other Toxic Metabolites Produced by *Aspergillus*: A Comprehensive Review. *Toxins* **17**, 331 (2025).
56. Mouchtaris Michailidis, T. *et al.* The interplay of dietary mycotoxins and oncogenic viruses toward human carcinogenesis: a scoping review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **65**, 5008–5026 (2025).
57. Zheng, C. *et al.* Serum microcystin levels positively linked with risk of hepatocellular carcinoma: A case-control study in southwest China. *Hepatology* **66**, 1519–1528 (2017).
58. Huang, D. Q., Mathurin, P., Cortez-Pinto, H. & Loomba, R. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **20**, 37–49 (2023).
59. Huang, D. Q. *et al.* Hepatocellular Carcinoma Incidence in Alcohol-Associated Cirrhosis: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **21**, 1169–1177 (2023).
60. Marra, M. *et al.* Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *J Transl Med* **9**, 171 (2011).
61. Gao, J. *et al.* Changes in cytochrome P450s-mediated drug clearance in patients with hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo: a bottom-up approach. *Oncotarget* **7**, 28612–28623 (2016).
62. Zhang, Y. J. *et al.* Expression of cytochrome P450 1A1/2 and 3A4 in liver tissues of hepatocellular carcinoma cases and controls from Taiwan and their relationship to hepatitis B virus and aflatoxin B1-and 4-aminobiphenyl-DNA adducts. *Biomarkers* **5**, 295–306 (2000).
63. Gao, J. *et al.* Higher CYP2E1 Activity Correlates with Hepatocarcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **365**, 398–407 (2018).
64. Chang, T. K. H. & Waxman, D. J. Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Methods Mol Biol* **320**, 85–90 (2006).
65. Williams, G. M. *et al.* Diethylnitrosamine exposure-responses for DNA ethylation, hepatocellular proliferation, and initiation of carcinogenesis in rat liver display non-linearities and thresholds. *Arch Toxicol* **73**, 394–402 (1999).

66. Williams, G. M. *et al.* Diethylnitrosamine exposure-responses for DNA damage, centrilobular cytotoxicity, cell proliferation and carcinogenesis in rat liver exhibit some non-linearities. *Carcinogenesis* **17**, 2253–2258 (1996).
67. Kang, J. S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F. J. & Fukushima, S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* **67**, 11141–11146 (2007).
68. Fuentes-Hernández, S. *et al.* Chronic administration of diethylnitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **378**, 114611 (2019).
69. Ho, J. C., Cheung, S. T., Leung, K. L., Ng, I. O. & Fan, S. T. Decreased expression of cytochrome P450 2E1 is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **111**, 494–500 (2004).
70. Hartman, J. H., Knott, K. & Miller, G. P. CYP2E1 hydroxylation of aniline involves negative cooperativity. *Biochem Pharmacol* **87**, 523–533 (2014).
71. Iwahori, T. *et al.* CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* **37**, 665–673 (2003).
72. Yan, T. *et al.* Severely Impaired and Dysregulated Cytochrome P450 Expression and Activities in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Personalized Treatment in Patients. *Mol Cancer Ther* **14**, 2874–2886 (2015).
73. Yu, T. *et al.* The prognostic value of differentially expressed CYP3A subfamily members for hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res* **10**, 1713–1726 (2018).
74. Baririan, N., Desager, J.-P., Petit, M. & Horsmans, Y. CYP3A4 activity in four different animal species liver microsomes using 7-benzyloxyquinoline and HPLC/spectrofluorometric determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, 211–214 (2006).
75. Li, T. *et al.* Glutathione S-Transferase P1 Correlated with Oxidative Stress in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Med Sci* **10**, 683–690 (2013).
76. Singh, R. R. & Reindl, K. M. Glutathione S-Transferases in Cancer. *Antioxidants (Basel)* **10**, 701 (2021).
77. Joseph, P., Xie, T., Xu, Y. & Jaiswal, A. K. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase): expression, regulation, and role in cancer. *Oncol Res* **6**, 525–532 (1994).
78. Li, W.-Y. *et al.* NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 overexpression in hepatocellular carcinoma potentiates apoptosis evasion through regulating stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Cancer Lett* **451**, 156–167 (2019).
79. Lin, M. T. *et al.* Superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma affects patient prognosis. *Hepatology* **48**, 1102–1105 (2001).
80. Gan, L. *et al.* Dual role of Nrf2 signaling in hepatocellular carcinoma: promoting development, immune evasion, and therapeutic challenges. *Front Immunol* **15**, 1429836 (2024).
81. Garcia, E. J., Lawson, D., Cotsonis, G. & Cohen, C. Hepatocellular carcinoma and markers of apoptosis (bcl-2, bax, bcl-x): prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **10**, 210–217 (2002).
82. Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S. & Thayyullathil, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine* **104**, 144–164 (2017).
83. Ikeguchi, M., Hirooka, Y. & Kaibara, N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **95**, 1938–1945 (2002).
84. Bai, L., Ni, H.-M., Chen, X., DiFrancesca, D. & Yin, X.-M. Deletion of Bid impedes cell proliferation and hepatic carcinogenesis. *Am J Pathol* **166**, 1523–1532 (2005).
85. Wree, A. *et al.* Hepatocyte-specific Bid depletion reduces tumor development by suppressing inflammation-related compensatory proliferation. *Cell Death Differ* **22**, 1985–1994 (2015).
86. Weber, K., Roelandt, R., Bruggeman, I., Estornes, Y. & Vandenabeele, P. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Commun Biol* **1**, 6 (2018).

87. Mohammed, S. *et al.* Absence of Either *Ripk3* or *Mlkl* Reduces Incidence of Hepatocellular Carcinoma Independent of Liver Fibrosis. *Molecular Cancer Research* **21**, 933–946 (2023).
88. Li, Z. *et al.* Sorcin regulate pyroptosis by interacting with NLRP3 inflammasomes to facilitate the progression of hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* **14**, 678 (2023).
89. Michalopoulos, G. K. & DeFrances, M. C. Liver Regeneration. *Science* **276**, 60–66 (1997).
90. He, G. *et al.* Hepatocyte IKK β /NF- κ B Inhibits Tumor Promotion and Progression by Preventing Oxidative Stress-Driven STAT3 Activation. *Cancer Cell* **17**, 286–297 (2010).
91. Villanueva, A. & Hoshida, Y. Depicting the role of TP53 in hepatocellular carcinoma progression. *J Hepatol* **55**, 724–725 (2011).
92. Yu, H. *et al.* Single-Gene Mutations in Hepatocellular Carcinoma: Applications and Challenges in Precision Medicine. *Int J Med Sci* **22**, 3268–3276 (2025).
93. Ning, B.-F. *et al.* Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Suppresses the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* **70**, 7640–7651 (2010).
94. Yin, C. *et al.* Differentiation therapy with hepatocyte nuclear factor 4 α for patients with hepatocellular carcinoma. *Cell Res* **35**, 687–690 (2025).
95. Svinka, J., Mikulits, W. & Eferl, R. STAT3 in hepatocellular carcinoma: new perspectives. *Hepat Oncol* **1**, 107–120 (2014).
96. Wegner, K. W., Saleh, D. & Degterev, A. Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3: Moving Beyond Necroptosis. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 202–225 (2017).
97. Moujalled, D. M. *et al.* TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis* **4**, e465 (2013).
98. Morgan, M. J. & Kim, Y.-S. RIPK3 in necroptosis and cancer. *Mol Cells* **48**, 100199 (2025).
99. Rickard, J. A. *et al.* RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell* **157**, 1175–1188 (2014).
100. Li, T.-E. *et al.* PKM2 Drives Hepatocellular Carcinoma Progression by Inducing Immunosuppressive Microenvironment. *Front Immunol* **11**, 589997 (2020).
101. Park, S. & Hall, M. N. Metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma: mechanisms and therapeutic implications. *Exp Mol Med* **57**, 515–523 (2025).
102. Chao, J., Zhao, S. & Sun, H. Dedifferentiation of hepatocellular carcinoma: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Am J Transl Res* **12**, 2099–2109 (2020).
103. Lee, T. K.-W., Guan, X.-Y. & Ma, S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma — from origin to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **19**, 26–44 (2022).
104. Hanif, H. *et al.* Update on the applications and limitations of alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **28**, 216–229 (2022).
105. Tu, J. *et al.* Current status and new directions for hepatocellular carcinoma diagnosis. *Liver Research* **8**, 218–236 (2024).
106. Wang, X. & Wang, Q. Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. *Can J Gastroenterol Hepatol* **2018**, 9049252 (2018).
107. Li, W., Liu, K., Chen, Y., Zhu, M. & Li, M. Role of Alpha-Fetoprotein in Hepatocellular Carcinoma Drug Resistance. *Current Medicinal Chemistry* **28**, 1126–1142 (2021).
108. Koretz, R. L. Nutritional support in liver disease - an updated systematic review. *Curr Opin Gastroenterol* **39**, 115–124 (2023).
109. Hiraoka, A. *et al.* Easy clinical predictor for low BCAA to tyrosine ratio in chronic liver disease patients with hepatocellular carcinoma: Usefulness of ALBI score as nutritional prognostic marker. *Cancer Med* **10**, 3584–3592 (2021).
110. Tang, K., Chen, Q., Liu, Y., Wang, L. & Lu, W. Combination of Metformin and Sorafenib Induces Ferroptosis of Hepatocellular Carcinoma Through p62-Keap1-Nrf2 Pathway. *J Cancer* **13**, 3234–3243 (2022).
111. Kensler, T. W. *et al.* Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 2605–2613 (2005).

112. Tarantino, G. & Balsano, C. Gastrointestinal peptides and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **27**, 11–15 (2020).
113. La Marca, M., Beffy, P., Pugliese, A. & Longo, V. Fermented Wheat Powder Induces the Antioxidant and Detoxifying System in Primary Rat Hepatocytes. *PLoS ONE* **8**, e83538 (2013).
114. Lucchesi, D. *et al.* Grain and bean lysates improve function of endothelial progenitor cells from human peripheral blood: involvement of the endogenous antioxidant defenses. *PLoS One* **9**, e109298 (2014).
115. Longo, V., Gervasi, P. G. & Lubrano, V. Cisplatin induced toxicity in rat tissues: The protective effect of Lisosan G. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 233–237 (2011).
116. Higgins, G. & Anderson, R. Experimental pathology of liver: restoration of liver in white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **9**, 186–202 (1931).
117. Solt, D. B., Medline, A. & Farber, E. Rapid Emergence of Carcinogen-Induced Hyperplastic Lesions in a New Model for the Sequential Analysis of Liver Carcinogenesis. *Am J Pathol* **88**, 595–618 (1977).
118. Seglen, P. O. Chapter 4 Preparation of Isolated Rat Liver Cells. in *Methods in Cell Biology* vol. 13 29–83 (Elsevier, 1976).
119. Wójcik, M., Wessely-Szponder, J., Cichoż-Lach, H., Celiński, K. & Bobowiec, R. In Vitro Proinflammatory Polarization of Macrophages Isolated from Hepatocarcinogenic Stage in Humans and Rats. *In Vivo* **30**, 853–862 (2016).
120. Strzemecki, D., Guzowska, M. & Grieb, P. Survival rates of homozygotic Tp53 knockout rats as a tool for preclinical assessment of cancer prevention and treatment. *Cell Mol Biol Lett* **22**, 9 (2017).
121. Sadeghzadeh, S., *et al.* The effect of carvacrol on transcription levels of Bcl-2 family proteins in hypertrophied heart of rats.
122. Liu, N. *et al.* MicroRNA-135a Regulates Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide in Rat Cardiomyoblast Cells. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 13–21 (2017).
123. Liu, K. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4a induces a tendency of differentiation and activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* **21**, 5856–5866 (2015).
124. Sántha, P. *et al.* Cytoskeletal Protein Translation and Expression in the Rat Brain Are Stressor-Dependent and Region-Specific. *PLoS ONE* **8**, e73504 (2013).
125. Baglieri, J., Brenner, D. A. & Kisseleva, T. The Role of Fibrosis and Liver-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1723 (2019).
126. Wijaya, G. Y. A. *et al.* Solid-State Fermented Cereals: Increased Phenolics and Their Role in Attenuating Liver Diseases. *Nutrients* **17**, 900 (2025).
127. Yu, J. *et al.* CYP1A2 suppresses hepatocellular carcinoma through antagonizing HGF/MET signaling. *Theranostics* **11**, 2123–2136 (2021).
128. Li, J., Wang, X., Ren, M., He, S. & Zhao, Y. Advances in experimental animal models of hepatocellular carcinoma. *Cancer Medicine* **12**, 15261–15276 (2023).
129. Leung, H. W. *et al.* NRF2/SHH signaling cascade promotes tumor-initiating cell lineage and drug resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* **476**, 48–56 (2020).
130. Xue, W. *et al.* NQO1 Mediates Lenvatinib Resistance by Regulating ROS-induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Curr Med Sci* **44**, 168–179 (2024).
131. Chen, H. *et al.* UBA2 SUMOylates NQO1 and promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma by modulating the MAPK pathway. *Cancer Science* **115**, 2998–3012 (2024).
132. Tang, Y. *et al.* Multi-omics analysis revealed the novel role of NQO1 in microenvironment, prognosis and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* **15**, 8591 (2025).
133. Liu, X. *et al.* High GSTP1 inhibits cell proliferation by reducing Akt phosphorylation and is associated with a better prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **9**, 8957–8971 (2017).
134. Zhang, X., Han, K., Yuan, D. & Meng, C. Overexpression of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Induced

- Apoptosis by Activating AMPK/PGC-1 α Pathway. *DNA and Cell Biology* **36**, 256–263 (2017).
135. Nenu, I. *et al.* Interleukin-6 in Hepatocellular Carcinoma: A Dualistic Point of View. *Biomedicines* **11**, 2623 (2023).
 136. Zhang, C., Hu, S., Yin, C., Wang, G. & Liu, P. STAT3 orchestrates immune dynamics in hepatocellular carcinoma: A pivotal nexus in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* **207**, 104620 (2025).
 137. Laha, D., Grant, R., Mishra, P. & Nilubol, N. The Role of Tumor Necrosis Factor in Manipulating the Immunological Response of Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
 138. Kondylis, V. & Pasparakis, M. RIP Kinases in Liver Cell Death, Inflammation and Cancer. *Trends Mol Med* **25**, 47–63 (2019).
 139. Yao, K. *et al.* RIPK1 in necroptosis and recent progress in related pharmaceuticals. *Front. Immunol.* **16**, (2025).
 140. Tayir, M. *et al.* The function of necroptosis in liver cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1871**, 167828 (2025).
 141. Li, M.-J., Wen, C.-L., Cheng, H.-T., Lyu, H.-N. & Han, Y.-Y. PANoptosis in hepatocellular carcinoma: Underlying mechanisms. *World Journal of Hepatology* **17**, (2025).
 142. Wu, X., Cao, J., Wan, X. & Du, S. Programmed cell death in hepatocellular carcinoma: mechanisms and therapeutic prospects. *Cell Death Discov.* **10**, 356 (2024).
 143. Dios-Barbeito, S. *et al.* Impact of nitric oxide in liver cancer microenvironment. *Nitric Oxide* **128**, 1–11 (2022).
 144. Xing, L., Tang, Y., Li, L. & Tao, X. ROS in hepatocellular carcinoma: What we know. *Arch Biochem Biophys* **744**, 109699 (2023).
 145. Li, Y., Yu, Y., Yang, L. & Wang, R. Insights into the Role of Oxidative Stress in Hepatocellular Carcinoma Development. *Front Biosci (Landmark Ed)* **28**, 286 (2023).
 146. Hamdy, H. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4-Alpha: a key regulator in liver carcinogenesis. *Cell Oncol.* **48**, 885–897 (2025).
 147. Ranjbar-Niavol, F. *et al.* P53/NANOG balance; the leading switch between poorly to well differentiated status in liver cancer cells. *Front. Oncol.* **14**, (2024).
 148. Kim, H., Jang, M. & Kim, E. Exploring the Multifunctional Role of Alpha-Fetoprotein in Cancer Progression: Implications for Targeted Therapy in Hepatocellular Carcinoma and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences* **26**, 4863 (2025).
 149. Wan, Q., Zhao, C. & Zhao, R. Progress of Pyruvate Kinase M2 in Hepatocellular Carcinoma-Associated Signaling Pathway. *Tissue Engineering Part C: Methods* **31**, 101–107 (2025).
 150. Zhang, X., Zhang, D., Guo, J., Shi, C. & Gong, Z. Pyruvate Kinase M2 Links Metabolism and Epigenetics: A New Target for Liver Disease Treatment. *Biomolecules* **15**, 1327 (2025).
 151. Reig, M. *et al.* BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol* **76**, 681–693 (2022).
 152. Toyoda, H. & Johnson, P. J. The ALBI score: From liver function in patients with HCC to a general measure of liver function. *JHEP Rep* **4**, 100557 (2022).
 153. Kim, K.-P. *et al.* Prognostic Efficacy of the Albumin-Bilirubin Score and Treatment Outcomes in Hepatocellular Carcinoma: A Large-Scale, Multi-Center Real-World Database Study. *Liver Cancer* **13**, 610–628 (2024).
 154. Huang, Z., Zhou, M., Feng, S., Xiao, X. & Zhong, B. Gamma-glutamyltransferase and the survival of hepatocellular carcinoma patients after transarterial chemoembolization: a meta-analysis and systematic review. *BMC Gastroenterol* **25**, 802 (2025).
 155. Ibn Awadh, A., Alanazi, K. & Alkhenizan, A. Prognosis of hepatocellular carcinoma using the albumin to alkaline phosphatase ratio, literature review, and meta-analysis. *Ann Med Surg (Lond)* **86**, 6062–6070 (2024).
 156. Cespiati, A., Smith, D., Lombardi, R. & Fracanzani, A. L. The Negative Impact of Sarcopenia on Hepatocellular Carcinoma Treatment Outcomes. *Cancers* **16**, 2315 (2024).

157. Esposto, G. *et al.* Ultrasound Evaluation of Sarcopenia in Patients with Hepatocellular Carcinoma: A Faster and Easier Way to Detect Patients at Risk. *Diagnostics* **14**, 371 (2024).
158. Wang, Y. & Wang, Z. Dietary hormesis: beyond nutrition and energy supply. *npj Sci Food* **9**, 144 (2025).
159. Yadav, M. Dietary hormetic phytochemicals and cellular resilience: Molecular insights - a review. *Food Chemistry Advances* **9**, 101189 (2025).
160. Pozzo, L. *et al.* The effects of fermented wheat powder (Lisosan G) on the blood lipids and oxidative status of healthy rabbits. *Food and Chemical Toxicology* **84**, 1–7 (2015).
161. Kuklin, A. *et al.* An Nrf2-NF-κB Crosstalk Controls Hepatocyte Proliferation in the Normal and Injured Liver. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **19**, 101480 (2025).
162. Gu, Y. *et al.* The proteomic characterization of the peritumor microenvironment in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **41**, 2480–2491 (2022).
163. Taş, E. E. & Ulgen, K. O. Predictive Modeling of Pharmacokinetic Drug-Drug and Herb-Drug Interactions in Oncology: Insights From PBPK Studies. *Int J Toxicol* **44**, 424–440 (2025).
164. Gandhi, A., Master, S. & Bhise, V. When Nature Meets Oncology: Unraveling Herb–Drug Interactions in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **26**, 10494 (2025).
165. Marques, L. & Vale, N. A Review on New Frontiers in Drug-Drug Interaction Predictions and Safety Evaluations with In Vitro Cellular Models. *Pharmaceutics* **17**, 747 (2025).