

Zarówno w badaniach naukowych jak i medycznych coraz większym zainteresowaniem cieszą się ekstrakty uzyskiwane z wytlóczyń z nasion wiesiołka (rodzina *Oenothera sp.*), stanowiących poprodukcyjny odpad przemysłowy otrzymywany w procesie tłoczenia oleju. Wykazano, że ekstrakty pozyskiwane z wykorzystanego surowca są bogate w związki o właściwościach przeciwzapalnych i przeciwutleniających, cennych dla prawidłowego funkcjonowania naszego organizmu. Okazuje się, że wspomniane surowce pochodzenia naturalnego wykazują również wobec pewnych typów nowotworów selektywną aktywność antyproliferacyjną i proapoptotyczną, a mechanizm ich działania polega na generowaniu reaktywnych form tlenu. To rzutuje na dwoisty charakter omawianych związków - z jednej strony mogą działać przeciwutleniająco i protekcyjnie względem komórek prawidłowych a z drugiej proapoptotycznie wobec komórek rakowych. Co więcej badania dowodzą, że związki pochodzenia naturalnego takie jak polifenole wspierają cytotoksyczość standardowych chemoterapeutyków. Jednym ze związków przeciwnowotworowych będącym obecnie na etapie badań klinicznych i rozpatrywanym jako lek przeciwko złośliwemu międzybłoniakowi opłucnej (ZMO) jest deiminaza argininy w formie pegylowanej (potocznie określana jako ADI-PEG20). Enzym ten jest odpowiedzialny za degradację L-argininy dostępnej w środowisku guza, co jest szczególnie kluczowe w przypadku komórek nowotworowych, których wzrost oraz żywotność są szczególnie zależne od stężenia tego aminokwasu. Biorąc pod uwagę fakt, że L-arginina jest wyjściowym aminokwasem do syntezy tlenku azotu (NO), a obniżenie stężenia tego aminokwasu może sprzyjać produkcji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) podjęliśmy próbę zbadania mechanizmu działania zarówno deiminazy argininy jak również właściwości prooksydacyjnych ekstraktu polifenolowego z wiesiołka w kierowaniu komórek ZMO na drogę apoptozy. W dotychczasowych badaniach wykazano, iż zwiększona generacja wolnych rodników sprzyja modyfikacji białek, w tym białek enzymatycznych wpływając na ich aktywność. Stąd też nasze badania będą skierowane wobec modyfikacji syntazy tymidylanowej zaangażowanej w syntezę kwasu deoksyrybonukleinowego. Powyższe przesłanki zachęciły nas do zbadania potencjału oksydacyjnego ekstraktu z wytlóczyń z wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*), zwanym dalej EPE, uzyskanego zoptymalizowaną w laboratorium Zakładu Biologii Strukturalnej (Uniwersytet Medyczny w Łodzi) metodą Soxhleta w komórkach wywodzących się z linii ZMO. Istotnym z punktu terapeutycznego celem projektu jest sprawdzenie skuteczności działania deiminazy argininy jako chemoterapeutyku w obecności badanego ekstraktu. Uzyskane wyniki umożliwią poznanie mechanizmu działania preparatu ADI i EPE, oraz pozwolą ocenić metabolizm komórek ZMO ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji enzymów zaangażowanych w proces syntezy nukleotydów pirymidynowych.

W pierwszy etapie badań ocenimy aktywność proapoptotyczną ekstraktu w komórkach wywodzących się z linii ZMO na podstawie analizy cyklu komórkowego i zachodzących w obecności EPE fizjologicznych zmian (asymetria bądź dezintegracja błony lipidowej) stosując barwienie Aneksyna-FITC-jodek propidyny z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Poziomu tlenku azotu i anionorodnika ponadtlenkowego, wraz z ogólną oceną reaktywnych form tlenu (RFT) będzie oceniony na podstawie znakowania specyficznymi barwnikami fluorescencyjnymi również w oparciu o cytometrię przepływową. W celu oznaczenia stopnia procesu nitrylacji białek, zachodzącego pod wpływem EPE i ADI, w uzyskanych lizatach komórkowych oznaczymy całkowity poziom nitrylacji reszt tyrozyny białek i peptydów a w szczególności syntazy tymidylanowej stosując technikę immunoblotingu z zastosowaniem swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko nitrotyrozynie. Ostatecznie, w celu analizy ogólnych zmian zachodzących w komórkach ZMO pod wpływem ADI i EPE zostanie przeprowadzona analiza poziomu wybranych metabolitów, w tym cząsteczek zaangażowanych w syntezę nukleotydów pirymidynowych i cyklu mocznikowego z zastosowaniem techniki mikroLC-MS.

Uzyskane wyniki dostarczą wiedzy na temat prooksydacyjnego mechanizmu działania zarówno ekstraktu jak i deiminazy argininy w stosunku do komórek międzybłoniaka opłucnej. Po raz pierwszy udokumentujemy potencjalny wpływ ekstraktu polifenolowego z wiesiołka na aktywność deiminazy argininy. Wierzmy, iż uzyskane wyniki dostarczą wiedzy na temat możliwości synergistycznego stosowania ekstraktu z *O. paradoxa* oraz ADI w kierunku zahamowania procesu nowotworzenia komórek złośliwego międzybłoniaka opłucnej. W sposób jednoznaczny i definitywny wykażemy, jakie korzyści może przynieść zastosowanie nowatorskiej terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem pionierskiego leku oraz powszechnie występującego surowca naturalnego.