

Aktywność przeciwnowotworowa amigdaliny

Anticancer activity of amygdalin

Zakład Biologii Komórki, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Małgorzata Latocha

SUMMARY

Amygdalin is a chemical compound abundant in seeds of many edible plants. It's natural function, as other cyanogenic compounds, is to protect the plant from being eaten by insects and bigger herbivores. Consumption of excessive amounts of amygdalin can, potentially, lead to lethal poisoning. Nevertheless this substance was and still is used in unconventional therapy of many medical conditions. Around half of 20th century intensive research into amygdalin's influence on limiting animal and human neoplasm development were led off. For a long time amygdalin remained a controversial chemical compound of ambiguously positive properties. Unfortunately, research performed in last century are most likely marked by invalid methodology which does not consider epimerization of amygdalin. One can see other mistakes that encourage to evaluate again amygdalin's therapeutic utility. Numerous current in vitro researches validate amygdalin's antineoplastic properties, including ability to inhibit proliferation and cause apoptosis. Distinctive responses of different examined cell types to amygdalin are pointed out. This phenomenon suggests that amygdalin's action is selective toward various neoplastic cell types.

Keywords: amygdalin, hydrogen cyanide, antineoplastic therapy

STRESZCZENIE

Amigdalina to związek występujący w nasionach wielu roślin jadalnych. Jej naturalną funkcją, podobnie jak i innych związków cyjanogennych, jest ochrona roślin przed owadami oraz większymi roślinożercami. Spożycie nadmiernych ilości amigdaliny może, potencjalnie, prowadzić do śmiertelnego zatrucia. Jednak substancja ta od dawna wykorzystywana jest w leczeniu niekonwencjonalnym różnych schorzeń. Około połowy XX wieku rozpoczęto intensywnie badania nad wpływem amigdaliny na ograniczenie rozwoju chorób nowotworowych u ludzi i zwierząt. Przez długi czas amigdalina pozostawała związkiem bardzo kontrowersyjnym, o niejednoznacznie pozytywnym działaniu. Niestety badania przeprowadzone w ubiegłym wieku najprawdopodobniej obarczone są wieloma błędami zastosowanej metodyki, która między innymi nie brała pod uwagę zachodzenia procesu epimeryzacji amigdaliny. Dostrzec można również inne błędy, które skłaniają do ponownej oceny przydatności amigdaliny w lecznictwie. Przeprowadzone w ostatnich latach badania w układach in vitro potwierdzają aktywność przeciwnowotworową amigdaliny, w tym jej zdolność do ograniczenia proliferacji i wywołania apoptozy. Przy czym, wskazuje się na nieco odmienną reakcję poszczególnych badanych typów komórek na działanie amigdaliny. Zjawisko to może sugerować prawdopodobne, wybiórcze działanie amigdaliny w odniesieniu do różnych typów komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe: amigdalina, cyjanowódór, terapia przeciwnowotworowa

Wstęp

Amigdalina – organiczny związek z grupy glikozydów – po raz pierwszy została wyizolowana w 1830 roku przez Robiqueta i Boutrona-Charlarda. Jej obecność zidentyfikowano w nasionach wielu owoców (tab. 1) (1, 2). Właściwości amigdaliny przedstawiono w tabeli 2.

Substancja ta jest kojarzona przede wszystkim z rodziną Różowatych (*Rosaceae* Juss.), jednak można wyizolować ją także z tkanek roślin

z rodziny Męczennicowatych (*Passifloraceae* Juss. ex Kunth in Humb.). Jej naturalną funkcją, podobnie jak i innych związków cyjanogennych, jest ochrona roślin przed owadami oraz większymi roślinożercami, albowiem, produktem jej rozpadu jest cyjanowódór; z 1 g amigdaliny może uwolnić się 59 mg HCN (1). Niezhydrolizowana amigdalina nie wykazuje szkodliwego działania. Natomiast, znaczną toksycznością charakteryzują się produkty jej rozpadu (4).

Tab. 1. Zawartość amigdaliny w wybranych owocach (1, 2)

Owoc	Ilość amigdaliny
Wiśnia	1,7 mg/1 g pestek
Grusza	nieznana
Pigwa	nieznana
Morela	3,6-5,2%
Brzoskwinia	2,7-3,1%
Jabłko (sok jabłkowy)	ilość rzędu ppm
Śliwa	nieznana
Gorzkie migdały	3-5%
Koniczyna	nieznana
Fasola	nieznana
Sorgo	nieznana

Tab. 2. Właściwości amigdaliny (3)

Cecha	Opis
Wzór sumaryczny	$C_{20}H_{27}NO_{11}$
Masa molowa	457,42 g/mol
Postać	proszek
Barwa	biała
Zapach	brak
Smak	silnie gorzki

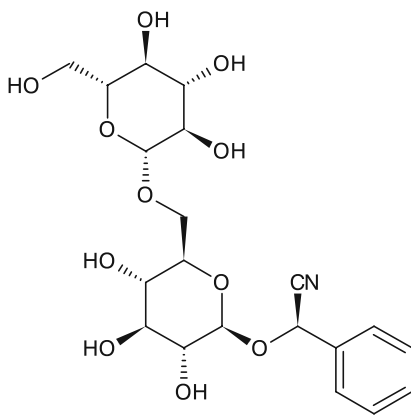
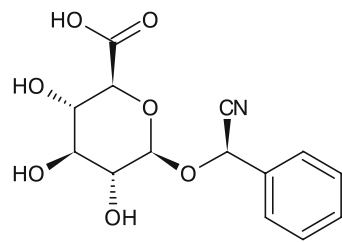
Amigdalina i letril

Częstym błędem, spotykanym w piśmiennictwie oraz w nazewnictwie preparatów amigdaliny, jest zamienne używanie nazw „amigdalina” i „letril”. Tymczasem nazwy te odnoszą się do dwóch, różniących się budową cząsteczki, związków chemicznych (tab. 3).

Letril (akronim słów „laevorotatory” i „mandelonitrile”) jest pochodną amigdaliny, która została zsyntetyzowana przez Krebsa w czasie badań nad poszukiwaniem mniej toksycznej postaci amigdaliny. W budowie amigdaliny występuje połączenie dwóch cząsteczek glukozy i mandelonitratu, natomiast w budowie letrilu występuje tylko jedna cząsteczka glukozy (tab. 3) (4).

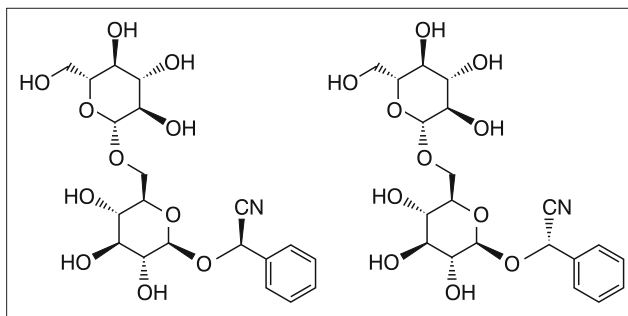
Często w piśmiennictwie, w stosunku do mieszaniny obydwu związków chemicznych (amigdalina i letril), jak i samej amigdaliny stosowane jest błędne określenie – witamina B₁₇ (4-6). Natomiast w Meksyku, gdzie znajduje się wiele klinik propagujących leczenie za pomocą amigdaliny, dla mieszaniny amigdaliny i letrilu stosuje się nazwę zwyczajową letril (5, 7).

Tab. 3. Porównanie amigdaliny i letrilu (4)

Nazwa	Definicja oraz wzór chemiczny
Amigdalina	<p>Substancja pochodzenia naturalnego o następującej strukturze:</p>  <p>(2<i>R</i>)-2-fenilo-2-[(2<i>R</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>R</i>)-3,4,5-trihydroksy-6-[(2<i>R</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>R</i>)-3,4,5-trihydroksy-6-(hydroksymetylo)oksan-2-yl)-oksymetylo]oksan-2-yl)oksyacetonyl</p>
Letril	<p>Pólsyntetyczna pochodna amigdaliny o następującej strukturze:</p>  <p>Synteza letrilu wiązała się bezpośrednio z nadzieją na zastosowanie go w terapii przeciwnowotworowej</p>
Letril (<i>Laetrile</i>)	<p>Opatentowany preparat składający się częściowo z amigdaliny i letrilu. Według zapewnień producentów powinien zawierać tylko pochodną, czyli letril. Niestety, analizy dostępnych w sprzedaży preparatów nazywanych <i>Laetrile</i> wykazały, że zawierają one głównie amigdalinę zamiast mniej niebezpiecznego letrilu</p>

Epimeryzacja amigdaliny

Epimeryzacja amigdaliny zachodzi wokół atomu węgla związanego z resztą fenolu oraz z resztą nitylową (ryc. 1). Naturalnie występującym epimerem amigdaliny jest R-amigdalina. W wodnych roztworach amigdalina podlega konwersji w biologicznie nieaktywną formę: S-amigdalinę (tzw. neo-amigdalinę). Dynamika tej reakcji zależy w dużym stopniu od czystości i składu chemicznego opakowania, w którym przechowywany jest roztwór amigdaliny.



Ryc. 1. Epimeryzacja amigdaliny (1)

Czynnikami wpływającymi na tę reakcję są również rodzaj rozpuszczalnika, temperatura oraz pH. Opóźnienie epimeryzacji można uzyskać dzięki zastosowaniu opakowań wykonanych z polietylenu. Dlatego też są one zalecane do przechowywania roztworów wodnych amigdaliny (1).

Nie obserwuje się epimeryzacji amigdaliny w czasie godzinowego gotowania roztworu przy kwaśnym pH, gotowania w naczyniu platynowym, ogrzewania w DMSO czy ogrzewania w etanolu. Po godzinie ogrzewania wodnego roztworu amigdaliny w szklanych, nieoczyszczonych naczyniach różnych producentów pozostaje w nim tylko około 35-40% R-amigdaliny (1, 8).

Mieszaninę obydwu epimerów określa się jako izoamigdalinę (5). W skład preparatów amigdaliny, komercyjnie dostępnych w sprzedaży, prawdopodobnie wchodzi izoamigdalina z przewagą S-amigdaliny, przy czym w preparatach tych obecne są również inne produkty rozpadu amigdaliny w ilości nawet do 5% (1).

Przez długi czas, zwłaszcza we wcześniejszych badaniach, epimeryzacja amigdaliny w ogóle nie była rozpatrywana (1). Obecnie zwraca się uwagę na konieczność

oczyszczania właściwego epimeru, a niepowodzenia i sprzeczność wyników we wcześniejszych badaniach przypisuje się obecności neo-amigdaliny w użytych do badań preparatach (8).

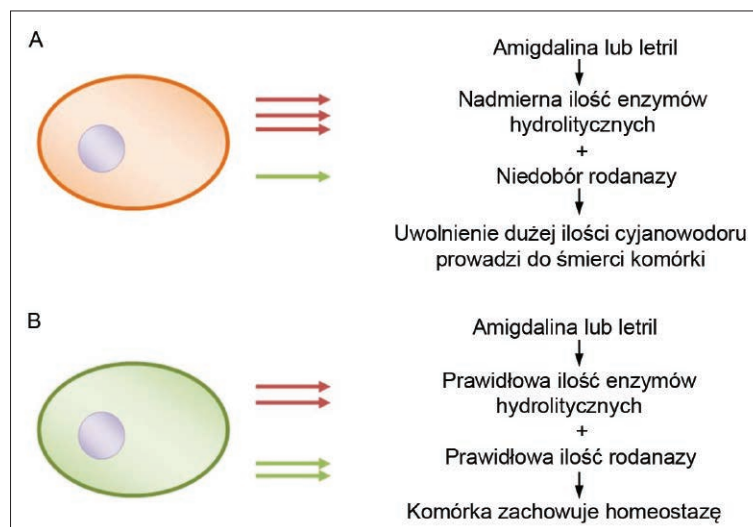
Przeciwnowotworowe właściwości amigdaliny

Mechanizm działania amigdaliny

Amigdalinę w charakterze leku przeciwnowotworowego zastosowano po raz pierwszy w 1845 roku (7). Od tamtego czasu opracowano wiele prawdopodobnych teorii wyjaśniających mechanizm przeciwnowotworowego działania tego związku chemicznego.

Początkowo, toksyczność amigdaliny względem komórek nowotworowych wiązano przede wszystkim z aktywnością enzymu hydrolitycznego β -glukozydazy, rozszczepiającej wiązanie pomiędzy dwoma cząsteczkami glukozy. W wyniku jej działania powstają: glukoza, aldehyd benzoesowy oraz cyjanowodór (3).

Zmiany, jakie zachodzą w komórkach podlegających transformacji nowotworowej, związane z zaburzeniem ekspresji genów i pojawianiem się aberracji chromosomowych, mogą prowadzić do podwyższenia poziomu β -glukozydazy, a także niedoboru rodanazy, enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie uwolnionych cyjanków do mniej szkodliwych tiocyjanków. W rezultacie, w komórkach nowotworowych następuje kumulacja szkodliwych dla nich cyjanków (ryc. 2). Jednak, najprawdopodobniej poziom rodanazy w komórkach nowotworowych oraz w komórkach prawidłowych jest porównywalny. Natomiast β -glukozydaza identyfikowana jest



Ryc. 2. Mechanizm działania amigdaliny i letrilu na komórki nowotworowe (4)

w tkankach zwierzęcych i ludzkich w śladowych ilościach i skupia się ona głównie w rąbku szczotczkowym jelita cienkiego (4).

Według teorii opracowanej przez Krebsa, w komórkach nowotworowych występuje podwyższony poziom enzymu β -glukuronidazy, który jest w stanie uwalniać cyjanki z letrilu – pochodnej amigdaliny. Jednak poziom tego enzymu w komórkach nowotworowych oraz prawidłowych również jest porównywalny. Ponadto, istotny jest tutaj fakt, iż preparaty letrilu zawierają duże ilości amigdaliny, która nie może być rozkładana przez β -glukuronidazę ze względu na budowę chemiczną cząsteczki (4).

Według innej teorii, amigdalinę można rozpatrywać jako witaminę (witamina B₁₇), której niedobór mógłby przyczynić się do zapoczątkowania procesu nowotworowego. Nie wykazano jednak, aby niedobór amigdaliny w diecie mógł leżeć u podstaw rozwoju awitaminozy. Zatem ostatecznie uznano, że amigdalina nie może być definiowana jako witamina (4).

Postulowano również, iż mechanizm działania amigdaliny związany z uwalnianiem cyjanków, cytotoksycznych względem komórek nowotworowych, może wyzwać reakcje mobilizujące odpowiedź immunologiczną organizmu, skierowaną przeciwko patologicznym komórkom (7, 9). Ponadto, próbowano tłumaczyć śmierć komórek nowotworowych jako następstwo zakwaszenia cytoplazmy na skutek destabilizacji lizosomów (5).

Przypuszcza się, że nie tylko produkty rozpadu amigdaliny, ale i sam niehydrolizowany wyjściowy związek może mieć aktywność biologiczną. Prawdopodobnie amigdalina przyczynia się do uniemożliwienia wbudowania do DNA komórek prawidłowych i nieprawidłowych (3H) tymidyny (2).

Enzymy uczestniczące w metabolizmie amigdaliny

W rozkładzie amigdaliny udział bierze β -glukozydaza, nazywana również emulsyną (3.2.1.21) oraz β -glukozydaza amigdaliny (3.2.1.117), enzym

o działaniu zawężonym do amigdaliny i prunazy. Obydwa enzymy mają wiele nazw synonimowych (często zależnych od organizmu, w którym występują), przy czym niekiedy są jednakowe dla obydwu tych białek (np. amigdalaza) (tab. 4). Enzymy te występują również w nasionach, z których pozyskuje się amigdalinę oraz w powszechnie spożywanych roślinach. Dlatego też, spożywanie surowych migdałów czy pestek moreli może spowodować przyswojenie większej ilości cyjanków przez organizm ludzki (5, 10, 11).

Metabolizm amigdaliny w dużej mierze uzależniony jest od mikroflory bakteryjnej bytującej w jelitach organizmu ludzkiego. Różnice osobnicze w jej składzie oraz w jej aktywności enzymatycznej (uzależnionej od diety) determinują więc indywidualną odmienność reakcji na podanie amigdaliny (12). Ponieważ β -glukozydazy wytwarzane przez bakterie przeprowadzają reakcję rozkładu amigdaliny, zatem przyjmowanie jej doustnie wiąże się z większym ryzykiem uwolnienia cyjanków i w konsekwencji – zatrucia (4, 10, 13). Natomiast β -glukozydazy występujące u ssaków prawdopodobnie przeprowadzają hydrolizę amigdaliny w inny sposób niż enzymy bakteryjne. Przypuszcza się, iż powstają wówczas inne półprodukty reakcji (ryc. 3) (2).

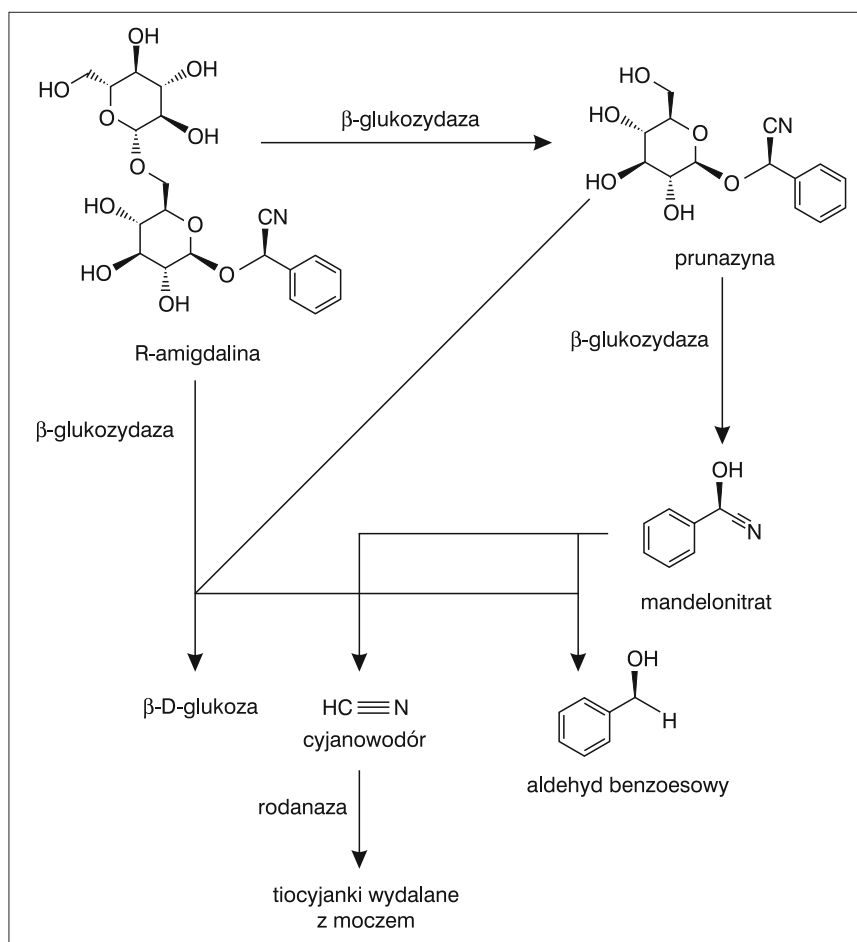
Amigdalina podawana drogą dożylną w większości wydalana jest z moczem, a cyjanowódór nie jest uwalniany (4, 10, 13). U myszy, u których zahamowano rozwój flory bakteryjnej w jelitach, dawka amigdaliny w wysokości 300 mg/kg masy ciała, podawana do żołądka, nie powodowała śmierci gryzoni. Natomiast w grupie kontrolnej, w której myszy miały aktywną florę bakteryjną, śmiertelność przy tej samej dawce, podanej tą samą drogą, obejmowała 60% zwierząt (10).

Działanie cyjanowodoru na organizm

Amigdalina jest tzw. heterozydem, pochodną cukrów, która na skutek hydrolizy uwalnia nie tylko substancje cukrowe, ale i inne związki. Istotnym

Tab. 4. Nazewnictwo i występowanie enzymów zdolnych do hydrolizy amigdaliny (11)

Enzym	Synonimy	Występowanie
β -glukozydaza	Emulsyna Amigdalaza Amigdalinaza Hydrolaza amigdaliny i wiele innych	<i>Homo sapiens</i> <i>Prunus dulcis</i> <i>Bombyx mori</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Lactobacillus brevis</i> i wiele innych organizmów należących do wszystkich królestw
β -glukozydaza amigdaliny	Amigdalaza Hydrolaza amigdaliny Glukozydaza amigdaliny i wiele innych	<i>Prunus serotina</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>



Ryc. 3. Możliwe drogi hydrolizy amigdaliny (2)

produktem tego rozkładu jest wspomniany wcześniej toksyczny cyjanowodór. Spożycie 50-60 gorzkich migdałów przez dorosłą osobę może doprowadzić do śmiertelnego zatrucia. Natomiast u dziecka może dojść do zatrucia po spożyciu zaledwie 10 pestek. Zakłada się, iż w jednym gorzkim migdale zawarty jest 1 mg cyjanowodoru. Ten niebezpieczny związek chemiczny jest również obecny w oleju pozyskiwanym z migdałów – w ilości 4% (14).

Objawy i przebieg zatrucia uwolnionym cyjanowodorem są zindywidualizowane. Zależą one m.in. od szybkości metabolizowania cyjanków w organizmie oraz od zawartości kwasu solnego i glukozy, które regulują zdolność wchłaniania substancji z przewodu pokarmowego (14).

Cyanowodór dysocjuje do jonów cyjanowych. Rodanaza (siarkotransferaza tiosiarczanowa), będąca enzymem mitochondrialnym, przekształca jony cyjanowe do wydalnych z moczem rodanek (tiocyjanianów) o znacznie mniejszej toksyczności. W organizmie identyfikuje się wysoki poziom rodanazy, która cechuje się znaczną aktywnością. Jednak, szybkość

katalizowanej przez nią reakcji uzależniona jest od dostępności siarki (14).

Cyjanki mogą być również przekształcane do dwutlenku węgla (wydalanego przez płuca wraz z nieprzetworzonym cyjanowodorem) i mrówczanów (usuwanym z moczem) oraz łączyć się z cystyną i witaminą B_{12} . Mechanizm toksycznego działania jonów cyjanowych związany jest ze zdolnością cyjanków do łączenia się z jonami żelaza Fe^{3+} , co powoduje zakłócenie procesów oddechowych komórek. Dochodzi do zablokowania oksydazy cytochromowej, na skutek czego komórka nie jest w stanie wykorzystać dostarczonego jej z krwią tlenu, a krew żylna przyjmuje wyjątkowo jasną barwę (14).

Jony cyjanowe zakłócają funkcję wielu innych enzymów – blokując je lub wpływając na ich aktywację – jednakże zjawisko to nie odgrywa znaczącej roli w zatruciu, ponieważ śmierć następuje głównie z powodu niedotlenienia tkanek. Cyanowodór wykazuje również powinowactwo do hemoglobiny i methemoglobiny. Ponadto, wskazuje się na możliwość działania teratogennego i mutagennego cyjanowodoru (14).

Zahamowanie metabolizmu tlenowego działa na komórki destrukcyjnie, powoduje również zwyrodnienie tkanek układu nerwowego. Skutkiem zaburzeń w ośrodkach nerwowych dochodzi do zmian rytmu serca (tachykardia). Początkowo obserwuje się wzrost ciśnienia krwi, a następnie jego spadek, co może doprowadzić do zapaści. W zatruciu drogą pokarmową, na błonie śluzowej żołądka pojawiają się nadżerki oraz przekrwienia. Objawy zatrucia mają zróżnicowane nasilenie, zależne od przyjętej dawki (14).

Zatrucie cyjankami wywołuje: duszności, drgawki, stan splątania, ucisk i ból w klatce piersiowej, kwasicę, nudności i wymioty, rozszerzenie źrenic, utratę przytomności, następnie porażenie z mimowolnym oddaniem kału i moczu prowadzące do zgonu. Skóra pacjenta nabiera wiśniowej barwy (14). W zatruciach lekkich obserwuje się: ból głowy, nudności, zaburzenia mowy oraz równowagi. Przedłużająca się intoksykacja doprowadza do nasilonych objawów ostrego zatrucia. Małe dawki cyjanowodoru mogą być na bieżąco metabolizowane i usuwane z organizmu, jednakże wywołują tzw. mikrouszkodzenia, powodujące bóle głowy, dolegliwości ze strony układu pokarmowego, zaburzenia układu nerwowego oraz układu krążenia, osłabienie i spadek masy ciała. Dawka śmiertelna cyjanowodoru wynosi 1 mg/kg masy ciała (14). Połączenie jonów cyjanowych z enzymami jest odwracalne. Jednak po wyleczeniu obserwuje się u pacjentów, nawet przez okres dwóch lat, ogólne osłabienie oraz zaburzenia mowy i pamięci (14).

Toksyczność amigdaliny

LD₅₀ dla amigdaliny podawanej doustnie wynosi u szczurów 0,88 g/kg masy ciała, u myszy po podaniu dootrzewnowym – 8 g/kg masy ciała, a w iniekcji dożylniej – 25 g/kg masy ciała. Najwyższa tolerowana przez króliki i psy dawka podawana doustnie wynosi

0,075 g/kg masy ciała, a dożylnie lub domięśniowo – 3 g/kg masy ciała.

U ludzi dawka tolerowana, po podaniu dożylnym, szacowana jest na 0,07 g/kg masy ciała. Przyjmowanie doustnie dawek 0,6-1 g dziennie może nie powodować zatrucia (10). Najprawdopodobniej jednak wrażliwość na amigdalinę jest cechą osobniczą, gdyż istnieją doniesienia o stosowaniu dożylnie dawek 2-9 g/kg masy ciała (9).

Wśród zarejestrowanych przypadków zatruc amigdalina wyróżnić można zatrucia ciężkie i śmiertelne, w tym przypadkowe – po spożyciu tej substancji przez dzieci (tab. 5).

Publikacje dotyczące przeciwnowotworowego działania amigdaliny

Dotychczas wielokrotnie badano wpływ amigdaliny na szereg linii komórkowych, w tym nowotworowych. Przeprowadzone eksperymenty dowodzą, iż w kulturach komórkowych *in vitro* amigdalina hamuje proliferację komórek nowotworowych, wywołuje ich apoptozę, a także zmniejsza ich zdolność do przerzutów (8, 9, 13, 15-18).

Efekt przeciwnowotworowego działania amigdaliny analizowano w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem następujących hodowli komórek ludzkich (tab. 6): raka pęcherza moczowego (linie RT112, UMUC-3 i TCCSUP), niedrobnokomórkowego raka płuca (linie H1299 i PA), raka szyjki macicy (linia HeLa), raka okrężnicy (linia SNU-C4), raka prostaty (linie DU145 i LNCaP), białaczki promielocytowej (linia HL-60), raka piersi (linie MDA-MB-231, MCF-7, Hs578T), raka nerki (linie A498, Caki-1 i KTC-26), a także mysiego chłoniaka (linii P388) (8, 9, 13, 15-20).

W hodowlach komórek raka pęcherza moczowego linii RT112, UMUC-3 i TCCSUP, poddanych działaniu amigdaliny w stężeniach 1,25-10 mg/ml,

Tab. 5. Przykłady udokumentowanych przypadków zatrucia amigdalina (2)

Wiek pacjenta	Opis przypadku
Dziecko 11-miesięczne	Śmierć po spożyciu 1-5 tabletek zawierających 500 mg amigdaliny
Dziecko 2-letnie	Objawy ostrego zatrucia po codziennym podawaniu 500 mg amigdaliny doustnie oraz 3,5 g w formie lewatywy; objawy wystąpiły po podaniu drugiej lewatywy w ciągu jednego dnia
Dziecko 4-letnie	Objawy ostrego zatrucia po spożyciu 12 tabletek zawierających po 500 mg amigdaliny
Dziecko 4-letnie	Objawy ostrego zatrucia po codziennym spożywaniu 4 tabletek zawierających po 500 mg amigdaliny oraz 5-10 pestek moreli
Osoba dorosła	Śmierć po spożyciu 12 g amigdaliny
Osoba dorosła	Objawy ostrego zatrucia po spożyciu 9 g amigdaliny w celu popełnienia samobójstwa
Osoba dorosła	Objawy ostrego zatrucia u osoby dorosłej, która spożyła jednorazowo 6-9 g amigdaliny

Tab. 6. Efekty działania amigdaliny na komórki nowotworowe w warunkach *in vitro* (8, 9, 13, 15-20)

Linie komórkowe wykorzystane do badań	Testowane stężenia amigdaliny (mg/ml)	Zaobserwowane efekty działania amigdaliny	Piśmiennictwo
Rak pęcherza moczowego			
RT112 UMUC-3 TCCSUP	1,25-10	Ograniczone zdolności proliferacyjne, apoptoza, wzrost liczby komórek w fazie G0/G1, spadek poziomu ekspresji cdk1, cdk2, wpływ na szlak sygnałowy kinazy mTOR. Spadek poziomu ekspresji cdk4 w linii RT112 i TCCSUP.	(15)
RT112 UMUC-3 TCCSUP	10	Oslabienie zdolności do adhezji do komórek śródbłonka naczyń oraz do immobilizowanego kolagenu. Zmniejszona zdolność do migracji w kierunku medium chemotaktycznego. Wpływ na zewnątrz- i wewnątrzkomórkową ekspresję integrzyn.	(19)
Niedrobnokomórkowy rak płuca			
H1299 PA	2,5-25 w teście zdolności do proliferacji 2,5 i 5 w kolejnych testach	Ograniczenie inwazyjności i zdolności proliferacyjnych komórek. Zmiany w ekspresji pewnych genów na poziomie transkrypcji: – spadek ekspresji β -kateniny, kinaz związanych z integrzynami, integryny- β 1, integryny- β 4, powiązanych ze złośliwym fenotypem komórek, – wzrost ekspresji E-kadheryny, – spadek poziomu fosforylacji kinazy ogniskowo-adhezyjnej FAK, kinazy białkowej B (Akt) i Rictor.	(16)
Rak szyjki macicy			
HeLa	1,25-20	Uruchomienie programu apoptozy komórek, najprawdopodobniej przez szlak wewnątrzpochodny: – obniżenie poziomu ekspresji białka Bcl-2, – podwyższenie poziomu ekspresji białka Bax, – wzrost aktywności kaspazy 3.	(17)
Rak okrężnicy			
SNU-C4	0,25-5	Obniżenie poziomu ekspresji wielu genów powiązanych z następującymi funkcjami komórki: wzrost, przekazywanie sygnałów, transkrypcja, cykl komórkowy, apoptoza, odpowiedź immunologiczna oraz odpowiedź na stres (m.in. ABCF2, EXO1, FRAP1, MRE11A, TOP1).	(13)
Rak prostaty			
DU145 LNCaP	0,01-10	Zależne od dawki ograniczenie żywotności komórek. Spadek poziomu ekspresji genu Bcl-2 na poziomie mRNA i białka. Wzrost poziomu ekspresji genu Bax na poziomie mRNA i białek. Wzrost aktywności kaspazy 3 przy wszystkich badanych stężeniach amigdaliny poza najwyższym (10 mg/ml), przy którym aktywność ta uległa obniżeniu.	(9)
Białaczka promielocytowa			
HL-60	1-10	Ograniczenie zdolności proliferacyjnych komórek, powodowanie apoptozy.	(8)
Rak piersi			
MDA-MB-231 MCF-7	2,5-80	Obniżenie aktywności proliferacyjnej komórek.	(18)
Hs578T		Obniżenie aktywności proliferacyjnej komórek. Apoptoza, najprawdopodobniej na szlaku związanym z kaspazą 3: – spadek poziomu ekspresji prokaspazy 3, – wzrost poziomu ekspresji białka Bax, – spadek poziomu ekspresji białka Bcl-2, – obniżony poziom ekspresji integryny- α 5. Obniżony poziom ekspresji integryny- α 5. Oslabienie zdolności komórek do adhezji.	
Rak nerki			
Caki-1 A498 KTC-26 xds	10	Oslabiona zdolność do adhezji do śródbłonka naczyń krwionośnych po 2 tyg. Zmniejszona zdolność do wiązania się do kolagenu i fibronektyny. Zmniejszona ruchliwość komórek. Zmiana profilu ekspresji integrzyn powierzchniowych. Wzrost ogólnego poziomu ekspresji integryny- α 2. Spadek poziomu ekspresji integryny- α 3 i ufosforylowanej kinazy ogniskowo-adhezyjnej.	(20)

zaobserwowano spadek liczby komórek w hodowli wraz z rosnącym stężeniem tej substancji oraz ograniczenie proliferacji komórek (15). Ponadto badane komórki, po dwutygodniowej ekspozycji na działanie amigdaliny, zaczęły wykazywać cechy typowe dla komórek apoptotycznych. Natomiast nie zaobserwowano cytotoksycznego działania badanego związku chemicznego po 24 godzinach. W badaniach analizowano również wpływ amigdaliny na ekspresję białek regulatorowych cyklu komórkowego, łącznie z tymi, które zaangażowane są w przebieg mitozy. W przypadku hodowli komórkowych poszczególnych linii zaobserwowano odmienne wzory zmian profilu ekspresji badanych białek, przy czym różnice te obserwowane były także w zależności od długości czasu ekspozycji komórek na działanie badanej substancji. W poszczególnych hodowlach wpływ amigdaliny na przebieg mitozy był zróżnicowany, jednak w każdym przypadku przejawiał się jako czynnik zakłócający prawidłowy podział komórek. Przypuszcza się zatem, iż amigdalina oddziałuje na wiele kluczowych etapów mitozy (15).

W piśmiennictwie można spotkać opisy wielu badań, zarówno potwierdzających, jak i wykluczających korelację pomiędzy poziomem ekspresji konkretnych białek cyklu komórkowego (np. p19, p27) a nasileniem procesu chorobowego. Stanowi to niewątpliwy dowód zróżnicowania zmian fenotypowych, jakim podlegają komórki ulegające transformacji nowotworowej. Jednak otrzymane, rozbieżne wyniki badań nie pozwalają na ostateczne wyjaśnienie mechanizmu działania amigdaliny (15).

Linie komórkowe raka pęcherza zostały również wykorzystane do badań dotyczących wpływu amigdaliny na parametry biochemiczne komórek. Komórki hodowane w warunkach *in vitro* ekspozowano na działanie amigdaliny o stężeniu 10 mg/ml i oceniano zmianę wybranych parametrów po upływie 24 godzin oraz po upływie 2 tygodni. Zaobserwowano znaczną utratę zdolności komórek nowotworowych do adhezji do komórek śródbłonna naczyń oraz do immobilizowanego kolagenu. Ponadto, w przypadku komórek linii UMUC-3 oraz RT112 po dwutygodniowej ekspozycji na działanie amigdaliny odnotowano ograniczenie zdolności komórek do migracji w kierunku medium chemotaktycznego. Natomiast, w przypadku komórek linii TCCSUP, zaobserwowano odwrotną zależność – zdolność komórek do migracji uległa podwyższeniu (19).

Oddziaływanie komórek nowotworowych z kolagenem odgrywa istotną rolę w procesie odłączania się komórek od pierwotnego guza oraz w procesie inwazji tkanek. Badania wykazały, że amigdalina zmniejsza

prawdopodobieństwo przedostania się komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych oraz do ich przemieszczania się w macierzy pozakomórkowej po opuszczeniu naczynia krwionośnego. Ponadto zaobserwowano, że zdolność komórek do migracji korelowała z długością okresu ekspozycji komórek na działanie amigdaliny (19).

Potencjalne, przeciwnowotworowe działanie amigdaliny badano również w odniesieniu do komórek ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc linii H1299 i PA. Przed przystąpieniem do zasadniczej części eksperymentu, najpierw dokonano selekcji komórek charakteryzujących się zdolnością do przerzutów. W tym celu, do hodowli komórek użyto dwukomorowych naczyń hodowlanych z warstwą matrigelu. Po 24 godz. hodowli zbierano komórki, które przedostały się do dolnej komory i ponownie wysiewano je do nowego dwukomorowego naczynia hodowlanego. Procedurę powtarzano dziesięciokrotnie, co pozwoliło uzyskać komórki o wysoce inwazyjnym fenotypie. Następnie, komórki te poddano działaniu amigdaliny w zakresie stężeń 0-25 mg/ml przez 48 godz. Zaobserwowano osłabienie zdolności inwazyjnych oraz ograniczenie proliferacji komórek (IC_{50} amigdaliny oszacowano na 12,5 mg/ml). Ponadto, odnotowano spadek ekspresji białek związanych z inwazyjnym fenotypem komórek, takich jak β -katenina, kinazy związane z integrzynami (ILK), integryna- β 1, integryna- β 4 oraz wzrost ekspresji E-kadheryny, białka charakteryzującego komórki o przeciwnym fenotypie. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wysokie stężenia amigdaliny efektywnie hamują proliferację komórek niedrobnokomórkowego raka płuc, natomiast niższe stężenia ograniczają inwazyjność tych komórek i co za tym idzie, zdolność do przerzutów (16).

W badaniach z wykorzystaniem hodowli komórkowych raka szyjki macicy linii HeLa zaobserwowano wpływ amigdaliny na ograniczenie żywotności komórek poprzez prawdopodobne uruchomienie wewnątrz-pochodnego szlaku apoptozy; odnotowano obniżenie poziomu ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz podwyższenie poziomu ekspresji proapoptotycznego białka Bax i kaspazy 3. U myszy szczepu BALB/c, którym przeszczepiono komórki HeLa, a następnie podawano amigdalinę w dawce 300 mg/kg masy ciała, zaobserwowano apoptozę przeszczepionych komórek nowotworowych (17).

Z kolei, w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem linii komórkowej raka okrężnicy SNU-C4 wykazano cytotoksyczne działanie amigdaliny, zależne od wielkości dawki. Podczas eksperymentu hodowle komórkowe traktowano amigdalina o stężeniu 0,25; 0,5; 2,5 i 5 mg/ml przez okres 24 godz.

Następnie przeprowadzono analizę z wykorzystaniem mikromacierzy cDNA oraz reakcji RT-PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją). Analiza wykazała wpływ amigdaliny na obniżenie poziomu ekspresji wielu istotnych genów powiązanych z: procesami wzrostu komórek, przekazywaniem sygnałów, transkrypcją, cyklem komórkowym, apoptozą, odpowiedzią immunologiczną i odpowiedzią na stres (tab. 7). Niektóre spośród tych genów są celem leków obecnie stosowanych w terapii przeciwnowotworowej (np. kamptotecyna, inhibitor topoisomerazy) (13).

Zależny od dawki cytotoksyczny wpływ amigdaliny zaobserwowano również w komórkach raka prostaty linii DU145 i LNCaP. Hodowle komórkowe obydwu linii inkubowano w obecności amigdaliny o stężeniach 0,01; 0,1; 1 oraz 10 mg/ml, przez okres 24 godz. Najsilniejszy efekt cytotoksycznego działania zaobserwowano przy stężeniu wynoszącym 10 mg/ml amigdaliny. Komórki nowotworowe wykazywały cechy morfologiczne charakterystyczne dla komórek podlegających apoptozie (powstawanie ciałek apoptotycznych, fragmentacja chromatyny). Ponadto, zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji Bcl-2 oraz wzrost poziomu ekspresji Bax zarówno na poziomie transkrypcji, jak i białka. Co więcej, w hodowlach komórkowych obydwu linii odnotowano wzrost aktywności kaspazy 3 wraz z rosnącą dawką amigdaliny, przy czym przy najwyższej dawce zaobserwowano odwrócenie zależności, a mianowicie przy stężeniu amigdaliny 10 mg/ml aktywność enzymatyczna kaspazy 3 uległa obniżeniu (9).

Działanie amigdaliny, w zakresie stężeń 1-10 mg/ml, na komórki białaczki promielocytowej linii HL-60 w obecności lub bez dodatku β -glukozydazy, przyczy-

Tab. 7. Przykładowe geny oraz ich produkty zaangażowane w regulację cyklu komórkowego oraz w mechanizmy odpowiedzi na stres, których poziom ekspresji uległ obniżeniu w komórkach linii SNU-4, poddanych działaniu amigdaliny (13)

Gen	Funkcja białkowego produktu genu
<i>ABCF2</i>	Białko z grupy transporterów przenoszących cząsteczki przez błony biologiczne
<i>EXO1</i>	Naprawa niesparowanych zasad oraz rekombinacja
<i>FRAP1</i>	Odpowiedź na niedobór składników odżywczych oraz uszkodzenie DNA
<i>MRE11A</i>	Kontrola długości telomerów, rekombinacja oraz naprawa uszkodzeń obu nici DNA
<i>TOP1</i>	Topoisomeraza

niło się do ograniczenia zdolności proliferacyjnych komórek oraz do uruchomienia w nich programu apoptozy (8).

Podobne efekty działania amigdaliny zaobserwowano także w hodowlach komórek raka piersi linii MDA-MB-231, MCF-7 i Hs578T. Oprócz obniżenia aktywności proliferacyjnej oraz uruchomienia mechanizmów związanych z apoptozą, w komórkach linii Hs578T odnotowano spadek poziomu ekspresji integryny- $\alpha 5$ oraz ograniczenie zdolności tych komórek do adhezji (18).

Analizowano również wpływ amigdaliny na komórki raka nerki linii A498, Caki-1 i KTC-26. W badaniu tym wykorzystano również ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVECs), wyizolowane ze sznura pępowinowego. Komórki nowotworowe traktowano amigdalina w stężeniu 10 mg/ml przez 24 godz. oraz przez 2 tyg. Już po 24 godz. komórki linii Caki-1 wykazywały osłabioną zdolność do adhezji do śródbłonna naczyń krwionośnych, a po 2 tyg. komórki wywodzące się ze wszystkich trzech linii wykazywały taką cechę. Zmniejszyła się również ich zdolność do wiązania się do kolagenu i fibronektyny oraz ich ruchliwość. Ponadto, zaobserwowano zmianę profilu ekspresji integryn na powierzchni komórek. Odnotowano ogólny wzrost ekspresji integryny- $\alpha 2$, spadek ekspresji integryny- $\alpha 3$ i pFAK oraz wiele innych zmian, charakterystycznych dla danej linii komórkowej (20).

Przytoczone powyżej przykłady badań potwierdzają właściwości antyproliferacyjne amigdaliny w stosunku do komórek nowotworowych w hodowlach *in vitro*. Obniżenie liczby komórek nowotworowych oraz oddziaływanie na procesy interakcji komórek ze składnikami macierzy pozakomórkowej może sugerować wpływ amigdaliny na ograniczenie zdolności inwazyjnych omawianych komórek. Liczne przykłady potwierdzają większą efektywność działania amigdaliny wraz ze wzrostem jej stężenia. Co więcej, im dłuższy był czas ekspozycji komórek na działanie amigdaliny, tym jej skutki oddziaływania były silniejsze. Aczkolwiek, jednocześnie może temu towarzyszyć zjawisko zaniku wrażliwości pewnych białek (np. kinazy cyklino-zależnej 2) na tę substancję (19).

Wpływ amigdaliny na różne typy komórek nowotworowych, hodowanych w warunkach *in vitro*, nie jest jednakowy, a mianowicie komórki poszczególnych linii prezentują odmienne wzory zmian profilów ekspresji wielu białek, w tym uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego. W niektórych przypadkach komórki nowotworowe ekspozowane *in vitro* na działanie amigdaliny wykazują wyższą aktywność proliferacyjną oraz potencjał inwazyjny. Takie przykłady wydają się

wykluczać możliwość zastosowania amigdaliny jako potencjalnego środka przeciwnowotworowego. Zatem istotne jest bardzo dokładne poznanie mechanizmów zachodzących w komórkach nowotworowych poddanych działaniu amigdaliny, aby możliwe było precyzyjne ustalenie, w przypadkach których nowotworów oraz ich stadiów rozwoju amigdalina faktycznie będzie spełniała rolę czynnika przeciwnowotworowego, a w których będzie wręcz sprzyjała rozwojowi choroby. Prawdopodobnie, znaczną rolę w sposobie oddziaływania amigdaliny na komórki nowotworowe odgrywa zjawisko powstawania oporności na tę substancję w trakcie jej stosowania. Przypuszcza się, że oporność ta może być związana ze zmianami w obrębie powierzchniowych receptorów dla integryn, których poziom ekspresji może ulegać znacznym zmianom, w zależności od typu komórek nowotworowych oraz od stadium zaawansowania ich zdolności do inwazji i przerzutów (19).

Podsumowanie

Amigdalina należy do związków chemicznych pochodzenia roślinnego, który od wielu lat wzbudza liczne kontrowersje. Historia jej zastosowania w leczeniu sięga połowy ubiegłego wieku. Od ok. 1957 roku prowadzone są badania nad jej właściwościami leczniczymi, chociaż przegląd prac naukowych z wcześniejszego okresu badań, dotyczących przeciwnowotworowego działania amigdaliny, ujawnia liczne braki w obrębie istotnych informacji dotyczących m.in. cofania się objawów choroby, stanu pacjentów przed rozpoczęciem leczenia, struktury podawanego związku, metod jego pozyskania i oczyszczania. Ponadto, niejasności związane z nomenklaturą stwarzają podejrzenie, iż zamiast amigdaliny często podawano pacjentom inne związki chemiczne (5). Dlatego też, wiele wcześniejszych badań sprawiało wrażenie braku właściwości przeciwnowotworowych amigdaliny.

Dopiero w ostatnich latach amigdalina ponownie zaczęła cieszyć się zainteresowaniem wśród dużej grupy badaczy. Kierując się zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej, odnotowano szereg pozytywnych właściwości tego związku chemicznego, m.in. korzystny wpływ na układ krwionośny, oddechowy, pokarmowy i immunologiczny. Ponadto, wykazano jego działanie przeciwniażdżycowe, przeciwastmatyczne, przeciwkaszlowe, zapobiegające zwłóknieniu płuc, przeciwzapalne, przeciwbólowe i immunomodulujące (10).

Liczne badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* potwierdzają aktywność przeciwnowotworową amigdaliny, w tym jej zdolność do ograniczania proliferacji i wywoływania apoptozy. Jak dotychczas,

nie udowodniono różnicy w ilości enzymów zaangażowanych w reakcję hydrolizy amigdaliny pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi. Aczkolwiek, wyniki wielu badań wskazują na nieco odmienną reakcję poszczególnych badanych typów komórek na działanie amigdaliny. Zjawisko to może wskazywać na prawdopodobne, wybiórcze działanie amigdaliny w odniesieniu do różnych typów komórek nowotworowych.

Przykładowo, analiza wpływu amigdaliny na komórki raka pęcherza w hodowlach *in vitro* wykazała, że liczba komórek wchodzących w stan wczesnej apoptozy powoli rosła dopiero po długim czasie ekspozycji komórek na działanie amigdaliny (2 tyg.) (15). Krótki czas działania tej substancji na komórki nowotworowe przyczyniał się jedynie do ograniczenia aktywności proliferacyjnej, która nie była spowodowana cytotoksycznym działaniem amigdaliny, lecz silnym wpływem na czynniki regulujące przebieg cyklu komórkowego. Z kolei w badaniach dotyczących wpływu amigdaliny na komórki raka prostaty *in vitro* zaobserwowano, po 24-godz. inkubacji, znaczną aktywację kaspazy 3, której towarzyszył spadek poziomu białka Bcl-2 i wzrost poziomu białka Bax (15).

Tak więc, prawdopodobnie amigdalina wykazuje nieco odmiennie spektrum oddziaływania na komórki różnych typów nowotworów, a śmierć komórek może być wynikiem nieco innych korelacji pomiędzy czynnikami biorącymi udział w mechanizmach regulujących to zjawisko.

Z przedstawionych powyżej badań wynika, że amigdalina jest dość interesującym związkiem pochodzenia naturalnego, który może być rozpatrywany jako potencjalna substancja o działaniu przeciwnowotworowym lub jako element profilaktyki przeciwnowotworowej. Niemniej, w celu dokładnego określenia jej potencjału przeciwnowotworowego konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań uwzględniających szerokie spektrum różnych typów komórek, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Piśmiennictwo

1. Wahab MF, Breitbach ZS, Armstrong DW i wsp. Problems and pitfalls in the analysis of amygdalin and its epimer. *J Agric Food Chem* 2015; 63(40):8966-73.
2. Blaheta RA, Nelson K, Haferkamp A i wsp. Amygdalin, quackery or cure? *Phytomed* 2016; 23(4):367-76.
3. Zdrojewicz Z, Otlewska A, Hackemer P i wsp. Amigdalina – budowa i znaczenie kliniczne. *Pol Merkur Lek* 2015; 38(227):300-3.
4. Unproven methods of cancer management. *Laetrile. CA Cancer J Clin* 1991; 41(3):187-92.
5. Milazzo S, Lejeune S, Ernst E. Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence. *Support Care Cancer* 2007; 15(6):583-95.
6. Bode AM, Dong Z. Toxic phytochemicals and their potential risks for human cancer. *Cancer Prev Res* 2015; 8(1):1-8.
7. Laetrile/Amygdalin. PDQ Cancer Complementary and Alternative Medicine Editorial Board 2015; <http://www.ncbi.nlm.nih>.

- gov/pubmedhealth/PMH0032851 (data dostępu: 13.01.2016).
- 8.** Kwon HY, Hong SP, Hahn DH i wsp. Apoptosis induction of *Persicæ semen* extract in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. Arch Pharm Res 2003; 26(2):157-61. **9.** Chang HK, Shin MS, Yang HY i wsp. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells. Biol Pharm Bull 2006; 29(8):1597-602. **10.** Song Z, Xu X. Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin. J Cancer Res Ther 2014; 10 (suppl. 1):3-7. **11.** BRENDA: <http://www.brenda-enzymes.org> (data dostępu: 28.01.2016). **12.** Kim YS, Kim JJ, Cho KH i wsp. Biotransformation of ginsenoside Rb1, crocin, amygdalin, geniposide, puerarin, ginsenoside Re, hesperidin, poncirin, glycyrrhizin, and bicalin by human fecal microflora and its relation to cytotoxicity against tumor cells. J Microbiol Biotechnol 2008; 18(6):1109-14. **13.** Park H-J, Yoon S-H, Han L-S i wsp. Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells. World J Gastroenterol 2005; 11(33):5156-61. **14.** Seńczuk W. Toksykologia współczesna. PZWŁ, Warszawa 2012. **15.** Makarević J, Rutz J, Juengel E i wsp. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth *in vitro* by diminishing cyclin A and cdk2. PLoS One 2014; 9(8):1-9. **16.** Qian L, Xie B, Wang Y i wsp. Amygdalin-mediated inhibition of non-small cell lung cancer cell invasion *in vitro*. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(5):5363-70. **17.** Chen Y, Ma J, Wang F i wsp. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 2013; 35(1):43-51. **18.** Lee HY, Moon A. Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells. Biomol Ther (Seoul) 2016; 24(1):62-6. **19.** Makarević J, Rutz J, Juengel E i wsp. Amygdalin influences bladder cancer cell adhesion and invasion *in vitro*. PLoS One 2014; 9(10):1-11. **20.** Juengel E, Afschar M, Makarević J i wsp. Amygdalin blocks the *in vitro* adhesion and invasion of renal cell carcinoma cells by an integrin-dependent mechanism. Int J Mol Med 2016; 37(3):843-85.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 25.08.2016

zaakceptowano/accepted: 05.09.2016

Adres/address:

*dr n. med. Aleksandra Zielińska
Zakład Biologii Komórki
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem
Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu
SUM w Katowicach
ul. Jedności 8, 41-200, Sosnowiec
tel. +48 (32) 364-12-12
e-mail: azielinska@sum.edu.pl