

## Możliwości i ograniczenia stosowania resweratrolu jako suplementu diety w kontekście działania estrogenowego

### *Possibilities and limitations of the use of resveratrol as a dietary supplement in the context of estrogenic activity*

Paulina Kobyłka, Marek Murias

Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

#### Streszczenie

Resweratrol 3,4',5'-trihydroksystylben jest fitoaleksyną, obecną w używanych od setek lat preparatach medycyny dalekowschodniej, ale także w winogronach oraz w czerwonym winie, obecnie dostępny jako suplement diety. W ostatnich kilkudziesięciu latach resweratrol wzbudził znaczne zainteresowania naukowców ze względu na swoje pleiotropowe działanie związane z hamowaniem rozwoju procesu nowotworowego, miażdżycy, cukrzycy, działanie neuroprotekcje oraz hamujące efekty procesu starzenia. Większość informacji o aktywności biologicznej resweratrolu dostarczają badania *in vitro* i *in silico*, jednak wyniki te nie zawsze korelują z efektami *in vivo*, z uwagi na intensywną biotransformację przez enzymy II fazy. W tym aspekcie rozpatrywane powinno być również działanie estrogenowe resweratrolu, z którym z jednej strony związane jest hamowanie proliferacji nowotworów estrogenozależnych, z drugiej jednak strony możliwa jest stymulacja proliferacji komórek nowotworowych. W związku z tym działanie estrogenowe resweratrolu powinno być zawsze rozpatrywane w przypadku zastosowania tego fitozwiązku jako suplementu diety. (*Farm Współ* 2021; 14: 186-193). doi: 10.53139/FW.20211423

Słowa kluczowe: resweratrol, ksenoestrogeny, suplementy diety, fitoterapia

#### Abstract

Resveratrol 3,4',5'-trihydroxystilbene is a phytoalexin, present in preparations of Far Eastern folk medicine. Resveratrol has also been found in grapes and red wine and currently is available as a dietary supplement. In the last few decades, resveratrol has aroused considerable interest among scientists due to the results of a research suggesting its pleiotropic effect related to the inhibition of the development of neoplastic processes, atherosclerosis, diabetes, neuroprotection and anti-ageing effects. Most of the information about the biological activity of resveratrol has been obtained in *in vitro* and *in silico* studies. Still, these results do not always correlate with the *in vivo* research since resveratrol is intensively metabolized by phase II enzymes. In this aspect, the estrogenic effect of resveratrol should be considered, which on the one hand is associated with the inhibition of the proliferation of estrogen-dependent neoplasms, on the other hand, it may also stimulate their proliferation. Therefore, estrogenic activity should always be considered when recommending dietary supplementation with resveratrol. (*Farm Współ* 2021; 14: 186-193). doi: 10.53139/FW.20211423

Keywords: resveratrol, xenoestrogens, supplements, phytotherapy

#### Wprowadzenie

Resweratrol (3,4',5'-trihydroksystylben) jest zaliczany do fitoaleksyn, czyli związków syntezowanych przez rośliny w odpowiedzi na obecność patogenów, ale także na skutek ekspozycji na czynniki stresogenne takie jak np. promieniowanie UV [1]. Z uwagi na obecność wiązania podwójnego w mostku etylenowym pomiędzy dwoma pierścieniami aromatycznymi,

z których zbudowany jest resweratrol, możemy mieć do czynienia z dwoma izomerami: *cis* i *trans*. Izomer *trans*, dużo bardziej aktywny biologicznie, wzbudza dużo większe zainteresowanie naukowców, ale także producentów suplementów diety. Resweratrol jest uważany za jeden z najbardziej aktywnych biologicznie związków występujących w roślinach używanych w dalekowschodniej medycynie ludowej. Jako przykład

takiego specyfiku na pierwszym miejscu wymieniany jest zwykle *kojo kon* preparat wytwarzany z *Polygonum cuspidatum* (rdest ostrokończysty). *Kojo kon* był używany do leczenia stanów zapalnych o różnej etiologii, infekcji jak również takich chorób jak wirusowe zapalenie wątroby czy choroby nowotworowe [2]. Ponadto, resweratrol jest obecny w innych roślinach jadalnych takich jak np. orzeszki ziemne czy jagody, ale przede wszystkim kojarzony jest z winogronami i czerwonym winem, w którym występuje w stosunkowo dużych ilościach [3]. To właśnie od czerwonego wina zaczęła się jego obecność w laboratoriach na całym świecie, a w konsekwencji liczne artykuły publikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Obecnie resweratrol, pojawił się na aptecznych półkach w postaci suplementów diety zarówno jako jedyny składnik aktywny jak i z zestawieniem z innymi związkami aktywnymi. Długa droga resweratrolu od laboratorium do leczenia otwartego rozpoczęła się w latach 90-tych ubiegłego stulecia, kiedy resweratrol został powiązany z tzw. francuskim paradoksem. Zjawisko to opiera się na obserwacji poczynionej w tym okresie, że pomimo znacznej podaży tłuszczów pochodzenia zwierzęcego w diecie mieszkańców Tuluzy (miasta położonego we Francji) w porównaniu z innymi mieszkańcami krajów Europy Zachodniej, zachorowalność na miażdżycę i związane z nią powikłania jest znacznie mniejsza. Niedługo później rozciągnięto to pojęcie na całą Francję, a naukowcy zaczęli poszukiwać jego wytłumaczenia [4]. Intensywne badania nad mechanizmem francuskiego paradoksu wykazały, że nie tylko resweratrol, ale również inne aktywne związki, takie jak alkohol etylowy, polifenole zarówno flawonoidowe i nieflawonoidowe, biorą udział w protekcyjnym działaniu na układ krążenia [5]. Pomimo licznych badań i publikacji opisujących prozdrowotne działanie czerwonego wina, od początku nie brakowało też doniesień dotyczących jego negatywnego oddziaływania na ludzki organizm [6]. Po wyizolowaniu resweratrolu jako jeden z głównych związków łączonych ze zjawiskiem francuskiego paradoksu stał się przedmiotem licznych badań naukowych i zaczął "żyć własnym życiem". Doniesienia o jego korzystnym i plejotropowym działaniu zaczęły lawinowo pojawiać się w bazach skupiających prace z dziedzin biomedycznych [5]. W samym 2020 roku, w bazie Pubmed codziennie ukazywało się około czterech artykułów naukowych dotyczących różnych aspektów związanych z resweratrollem. W pracach pojawiających się od początku lat

'90 wykazywano, że resweratrol wykazuje działanie przeciwnowotworowe na wszystkich trzech etapach rozwoju nowotworów: inicjacji, promocji i progresji [7]. Wykazano, że resweratrol indukuje różne drogi śmierci komórkowej (m.in. apoptozę, autofagię) wykazuje działanie antyoksydacyjne, neuroprotektoryjne przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwprzywrotniakowe. Dowiedziano, że resweratrol chroni przed skutkami ischemii-reperfuzy, spowalnia procesy związane ze starzeniem, przedłuża długość życia, chroni przed chorobami metabolicznymi (m.in. otyłością i cukrzycą), działa kardioprotekcyjne oraz wykazuje działanie estrogenowe [5,7,8]. Na podstawie tych danych, resweratrol stał się interesującym związkiem do stosowania w codziennej suplementacji diety.

### **Zjawisko hormezy w mechanizmie działania resweratrolu: kiedy mniej znaczy więcej**

Informacje o właściwościach biologicznych resweratrolu naukowcy uzyskali głównie dzięki doświadczeniom prowadzonym w modelu *in vitro* oraz *in silico*. Natomiast, znacznie trudniej było połączyć te efekty z wynikami badań *in vivo*. Już w początkowym okresie badań nad resweratrollem wykazano problemy z biodostępnością po doustnym podaniu, które wynikały z intensywnego metabolizmu przez enzymy II fazy metabolizmu ksenobiotyków (głównie sulfotransferazy i UDP-glukuronylotransferazy). W wyniku tych procesów resweratrol ulega przemianom do nieaktywnych metabolitów takich jak siarczany i glukuronidy [5,8-10]. Należy podkreślić, że metabolizm resweratrolu przy udziale wspomnianych powyżej enzymów zachodzi już w ścianie jelita, natomiast po przetransportowaniu przez żyłę wrotną do wątroby, sprzęgnięciu kwasem glukuronowym lub siarkowym ulega zwykle niemal cała dawka podanego resweratrolu [5,8]. Ze względu na ten czynnik limitujący biodostępność resweratrolu, wiele badań zostało wykonanych, głównie w pierwszej dekadzie XXI wieku w celu zarówno lepszego poznania właściwości tego związku, jak również możliwości ominięcia tych procesów zmniejszających w efekcie działanie biologiczne resweratrolu. Z jednej strony prace dotyczyły modyfikacji struktury chemicznej w celu uniemożliwienia reakcji II fazy metabolizmu np. poprzez zablokowanie grup hydroksylowych grupami metylowymi, z drugiej strony zmierzano do opracowania innowacyjnych formułacji resweratrolu w oparciu o nanotechnologię [11]. Ponadto, jedną ze strategii

na zwiększenie biodostępności resweratrolu stało się zwiększanie dawki połączone z częstym podawaniem, które pozwala na uzyskanie stosunkowo wysokich poziomów niezmienionego, a więc aktywnego biologicznie resweratrolu w surowicy. W licznych badaniach naukowych stosowano dawki resweratrolu wyższe o kilka rzędów wielkości od ilości resweratrolu przyjmowanego w normalnej diecie. W niektórych z nich podawano nawet dawki wynoszące około 5 g resweratrolu dziennie [5]. Tak jak wspomniano wcześniej należy zauważyć, że dawki resweratrolu, które przyjmujemy w diecie np. w wyniku spożywania czerwonego wina, skutkują bardzo niskim poziomem wolnego resweratrolu w surowicy, znacznie niższym od poziomu który pozwala uzyskać efekt biologiczny zbliżony do efektów badań *in vitro* [5,12]. Z tego powodu resweratrol, występujący w roli głównego bohatera wielu artykułów opisujących jego działanie przeciwnowotworowe *in vitro* określane często jako „obiecujące” w świecie *in vivo* został przeniesiony do kategorii suplementów diety [5]. Tak jak wspomniano wyżej obecnie dostępne są suplementy diety zawierające resweratrol oraz jego połączenia z innymi aktywnymi związkami pochodzenia naturalnego np. z kwercetyną. Połączenia resweratrolu z kwercetyną miały na celu inhibicję enzymów drugiej fazy metabolizmu przez kwercetynę, a tym samym zwiększyć biodostępność resweratrolu [10]. W wyniku zastosowania takiej strategii, resweratrol po przejściu przez błony komórkowe mógłby dotrzeć w postaci niezmienionej do określonych wewnątrzkomórkowych punktów uchwytu [10]. Od samego początku badań nad resweratrolem, próbowano te punkty uchwytu zidentyfikować, w wyniku czego obecnie znany jest wpływ resweratrolu na szereg szlaków sygnałowych w komórkach prawidłowych oraz nowotworowych ludzkiego organizmu. Wśród kluczowych mechanizmów działania można wymienić hamowanie aktywności cyklooksygenazy 1 i 2 (COX, ang. *cyclooxygenase*), reduktazy rybonukleotydowej, polimerazy DNA, metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (szczególnie MMP-9), czynników wzrostu związanych z angiogenezą: naczyniowo-śródbłonkowego (VEGF) i naskórkowego (EGFR), czynników transkrypcyjnych takich jak NF- $\kappa$ B czy AP1, receptora węglowodorów arylowych (AhR) i regulowanych przez ten receptor izoenzymów cytochromu P450: CYP1A1 i CYP1A2, czynników kontrolujących cykl komórkowy takich jak cykliny A, B1, D. Ponadto, możliwa jest modulacja całego szeregu ścieżek przekazywania

sygnałów związanych z procesem apoptozy w komórkach nowotworowych takich jak: kaspaza 3, czynnik nekrozy nowotworów (TNF), białko p53, interleukina 6, czy takie kluczowe białka regulujące proces apoptozy jak Bax i Bcl-2 [5,8,13]. Jednym z wcześniej zidentyfikowanych komórkowych celów resweratrolu był receptor estrogenowy (ER). Resweratrol został sklasyfikowany jako fitoestrogen już pod koniec lat '90. Szybko zauważono jego podobieństwo strukturalne do takich związków jak 17 $\beta$ -estradiol (E2) czy dietylostilbestrol (DES; 4-[(E)-4-(4-hydroksyfenyl)-heks-3-en-3-yl]fenol) (rycina 1) [14–16]. W tym czasie zaczęto także łączyć wyniki niektórych eksperymentów z działaniem estrogenowym. Było tak zarówno w przypadku wpływu na estrogenozależne komórki nowotworowe jak i z działaniem kardioprotekcyjnym [17]. Dlatego stosunkowo wcześniej w badaniach nad resweratrolem dużo uwagi poświęcono interakcji z receptorami estrogenowymi, wpływowi na proliferację komórek nowotworowych, ale także modulacji całego układu immunologicznego.

### **Skomplikowana relacja resweratrolu i receptora estrogenowego – niebezpieczny związek czy strategia terapeutyczna?**

Obecnie dysponujemy szerokim zakresem metod i modeli badawczych pozwalających ocenić szerokie spektrum aktywności biologicznej interesujących nas związków chemicznych. W przypadku oceny aktywności estrogenowej możemy użyć metod *in silico*, *in vitro* oraz *in vivo*. Modelowanie *in silico* (dosłownie: „w krzemie”) pozwala na zastosowanie oprogramowania komputerowego, które umożliwi przeprowadzenie symulacji „zadokowania” badanego związku do struktury receptora estrogenowego, określając miejsca wiązania potencjalnego ligandu. Oczywiście możliwe jest również zastosowanie szerokiego zakresu metod *in vitro*. W tym celu można wykorzystać metody z zastosowaniem rekombinowanych receptorów estrogenowych połączonych ze specjalnymi konstrukcjami molekularnymi powodującymi zmianę polaryzacji światła fluorescencyjnego. Bardzo często wykorzystywane są komercyjnie dostępne linie komórkowe oraz ich zmodyfikowane genetycznie odpowiedniki, które odpowiadają na stymulację estrogenową nie tylko zwiększoną proliferacją, ale także ekspresją genów reporterowych umożliwiających ilościową ocenę odpowiedzi np. za pomocą luminescencji [18]. Szerokie możliwości dają też modele zwierzęce, w których

najczęściej stosowane są niedojrzałe płciowo samice lub zwierzęta poddane owarektomii, jak również zwierzęta w okresie prenatalnym oraz dojrzałe płciowo samce [19]. Oceniany może być nie tylko "klasyczny" efekt uterotropowy [20], ale również wpływ na steroidogenezę, biosyntezę estrogenów ich metabolizm oraz wpływ na poziom globulin wiążących hormony płciowe (SHBG) [21]. Z powodu ograniczeń objętościowych pracy, zostanie omówiony jeden model eksperymentalny tzw. test E-screen. Test E-screen był jedną z pierwszych metod, jakie zastosowano w ocenie działania estrogenowego resweratrolu. Zazwyczaj w tym teście używane są komórki estrogenozależnego gruczolakoraka piersi MCF7, które charakteryzują się ekspresją ER $\alpha$ . Hodowla *in vitro* tych komórek w obecności E2 lub związków o działaniu ksenoestrogenowym powoduje wzrost ich proliferacji. Aktualnie, dostępny jest szereg komercyjnych linii komórkowych, wykazujących ekspresję zarówno ER $\alpha$  lub ER $\beta$ . Ponadto, modyfikacje takich komórek technikami biologii molekularnej istotnie zwiększają możliwość oceny ich reakcji na stymulację estrogenami, ksenoestrogenami czy fitoestrogenami [22,23]. Pierwszym doniesieniem o estrogenowym działaniu resweratrolu była klasyczna już dzisiaj praca opublikowana przez Gehm i współpracowników [14]. Autorzy pracy wykazali, że w stężeniach 3-10  $\mu$ M, resweratrol hamował wiązanie znakowanego estradiolu z receptorem estrogenowym i aktywował transkrypcję genów reporterowych reagujących na estrogeny, a stymulacja ta była hamowana przez antagonistę receptora estrogenowego. W komórkach MCF-7, resweratrol działał jako superagonista (tj. powodował większą maksymalną odpowiedź transkrypcyjną niż estradiol). W tej pracy opisano też wpływ resweratrolu na proliferację innych estrogenozależnych komórek raka piersi – komórek linii T47D. W tym przypadku również wykazano, że resweratrol w stosunkowo niskim stężeniu (10  $\mu$ M) stymulował proliferację komórek w stopniu podobnym do E2 w stężeniu 0,1 nM. Efekt ten również mógł być zablokowany przez antagonistę ER - ICI182780, wskazując, że pośredniczyła w nim aktywacja ER. Praca ta była pierwszym sygnałem wskazującym na dwufazowy: stymulujący estrogenozależne komórki nowotworowe w niższych dawkach i hamujący ich proliferację wyższych dawkach charakter działania resweratrolu. [14]. Wyniki te, jak się wydaje zostały przyćmione przez pracę opublikowaną przez Jang i współpracowników, w której opisano efekty dostępnych do tej pory eksperymentów

z zakresu działania antyoksydacyjnego, chroniącego przed powstawaniem mutacji, działania przeciwzapalnego i powodującego różnicowanie niektórych komórek nowotworowych. Artykuł ten spowodował lawinowy wzrost prac dotyczących resweratrolu, w których resweratrol był opisywany w ślad za tą pracą, jako związek hamujący rozwój nowotworów na wszystkich trzech etapach rozwoju inicjacji, promocji, progresji [7]. Rok później ukazała się publikacja, w której wykazano, że resweratrol hamował proliferację i działał cytotoksycznie wobec ER-dodatnich komórek MCF-7, ER-ujemnych prawidłowych komórek gruczołu piersiowego linii MCF-10F i estrogenoniezależnych komórek MDA-MB-231. Testowane stężenia były jednak znacznie wyższe niż w poprzedniej opisywanej pracy i wynosiły od 22 do 175  $\mu$ M. Wyniki tych badań wskazywały, na w dużej mierze niezależny od ekspresji receptora estrogenowego mechanizm działania resweratrolu, w tym wykazano istotny udział procesu apoptozy [15]. Wyniki tych badań zostały potwierdzone przez Garvin i współpracowników, którzy wykonali badania w modelu mysich ksenograftów dla linii MDA-MB231 [24]. Nakagawa i wsp. ponownie zwrócili uwagę na dwufazowy charakter odpowiedzi komórek estrogenozależnych na inkubację z resweratolem. W swoich eksperymentach badali wpływ niskich i wysokich stężeń resweratrolu na proliferację ER-dodatnich komórek KPL-1 i MCF-7 oraz ER-ujemnych komórek MKL-F. Niskie stężenia resweratrolu sprzyjały proliferacji komórek ER-dodatnich, podczas gdy wyższe stężenia hamowały wzrost i proliferację wszystkich typów komórek. Ponadto zaobserwowano zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie subG1, wzrost poziomu białek Bax i Bak, obniżenie poziomu białka Bcl-xL a także aktywację kaspazy-3, które świadczyły o aktywacji procesu apoptozy w komórkach [25]. Kamieniem milowym w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie o powiązanie pomiędzy estrogenowym i antyproliferacyjnym działaniem resweratrolu była praca Levenson i wsp. [16]. W eksperymentach opisanych w tej pracy użyto estrogenoniezależnych komórek raka piersi MDA-MB-231 transfekowanych receptorem estrogenowym typu dzikiego (wt, ang, *wild type*) oraz jego zmutowaną formą. Odpowiedź komórek oceniano zarówno na poziomie molekularnym jaki i na poziomie proliferacji komórek. Resweratrol hamował wzrost komórek transfekowanych ER typu dzikiego i zmutowanych, przy wartościach IC<sub>50</sub> wynoszących odpowiednio 6,7



i 1,5  $\mu\text{M}$ . Hamowanie proliferacji komórkowej obserwowano również w przypadku ER-ujemnych MDAMB-231. Użyty w badaniach związek ICI182780 o działaniu antagonistycznym wobec receptora estrogenowego, nie blokował całkowicie działania resweratrolu, tym samym wskazując, że jego działanie obejmuje również szlaki niezależne od ekspresji ER. Wykazano również, że resweratrol bierze udział w regulacji ponad 80 genów, w tym znaczną aktywację zaobserwowano dla genu *p21<sup>cip1</sup>/waf1*, który reguluje podziały komórkowe. W oparciu o stworzony przez wcześniej w ośrodku autorów tej pracy system klasyfikacyjny, resweratrol został scharakteryzowany jako estrogen typu I, który łączy się z domeną wiążącą ligand, a jego działanie wzmacniane jest przez domeny AF-1 i AF2 [16]. W trakcie badań nad estrogenowym działaniem resweratrolu zwrócono również uwagę na sam model badawczy, w tym na skład pożywki hodowlanej. Basly i wsp. porównywali wpływ obu izomerów resweratrolu na proliferację komórek MCF-7 w obecności i nieobecności E2. Stwierdzono, że każdy z izomerów przy braku E2 sprzyja proliferacji komórek w stężeniach w zakresie 10–25  $\mu\text{M}$ , przy czym izomer (E)-trans był bardziej skuteczny w porównaniu z izomerem (Z)-cis. Przy stężeniu przekraczającym 50  $\mu\text{M}$  oba izomery obniżały proliferację komórek. W obecności E2 (agonisty ER) w stężeniu 0,1 nM zaobserwowano obniżenie proliferacji komórek MCF-7 w przypadku obu izomerów, przy czym silniejsze działanie wykazał izomer (E)-trans, który zadziałał już przy stężeniu 25  $\mu\text{M}$  [26]. Omawiając rolę pożywki w tego typu eksperymentach nadmienić należy, że płodowa surowica bydłęca używana w hodowlach komórkowych, a więc również w tego typu eksperymentach może zawierać znaczne ilości E2. Pomimo, że komercyjnie dostępne są surowice traktowane węglem aktywnym lub dializowane procedury te nie zawsze usuwają całość E2, pomimo deklaracji producenta. Pamiętać należy, że eksperymenty tego typu należy prowadzić bez czerwieni fenolowej która dodawana jest do części pożywek. Działanie antyproliferacyjne resweratrolu w modelu *in vitro* zaobserwowano także w przypadku innych estrogenozależnych linii komórkowych, w tym w komórkach raka jajnika BG-1, czy komórkach gruczolakoraka endometrium Ishikawa [27–29]. Komórki Ishikawa odpowiadają na stymulację estrogenową wzrostem aktywności fosfatazy alkalicznej, co pozwala na stosunkowo prostą ocenę ich odpowiedzi za pomocą metod spektrofotometrycznych [28]. Resweratrol

hamował proliferację komórek Ishikawa stymulowanych przez E2, podobnie jak w przypadku estrogenozależnych komórek raka piersi, a działanie to było kontrolowane przez mechanizmy zależne i niezależne od receptorów estrogenowych [28]. Podsumowując, wyniki testu E-screen, który prowadzony jest w stosunkowo prostym modelu hodowli komórkowych 2D wskazują na złożoną dwufazową reakcję estrogenozależnych komórek nowotworowych, skomplikowaną jeszcze przez dodatkową ingerencję tego związku w komórkowe szlaki przekazywania sygnałów prowadzące do indukcji apoptozy [19,30]. Można się więc spodziewać, że w warunkach *in vivo* sytuacja będzie bardziej skomplikowana.

### Wybrane aspekty działania resweratrolu na układ hormonalny

Ogromne zainteresowanie ewentualnymi korzyściami zdrowotnymi stosowania resweratrolu i niską biodostępność tradycyjnych preparatów po podaniu doustnym sprawiły, że nie dostrzegano w wystarczającym stopniu potencjalnych zagrożeń takiej suplementacji dla układu endokrynnego. Należy zwrócić uwagę, że stężenia osiągnięte *in vivo* na skutek suplementacji resweratrolem odpowiadają zakresom stężeń, które w doświadczeniach *in vitro* powodowały wzrost proliferacji komórek nowotworowych. Dodatkowo o potencjalnym bezpieczeństwie preparatów resweratrolu świadczyły wyniki testów *in vivo*, w tym test uteroficzny jak i badania wpływu na układ hormonalny, które dały wyniki negatywne [20]. W tym aspekcie można rozważyć opisane powyżej plejotropowe działanie resweratrolu, które moduluje aktywność całego szeregu receptorów w komórkach w nieprzewidywalnym do końca stopniu. W związku z tym, interakcja resweratrolu i receptorów estrogenowych może mieć charakter zarówno agonistyczny jak i antagonistyczny w różnych tkankach i narządach, które w większym i mniejszym stopniu podlegają regulacji przez estrogeny. Ponadto, należy uwzględnić również pośrednie działanie na układ hormonalny, wpływ na enzymy biorące udział w steroidogenezie, modulację aktywności enzymów i białek biorących udział w dystrybucji estrogenów, oraz enzymów (zarówno pierwszej jak i drugiej fazy) unieczynnających estrogeny. Tak jak wspomniano powyżej w eksperymentach *in vitro* prawie wszystkie estrogenne i hormonalne efekty resweratrolu obserwowano w stężeniach mikromolowych. Taki poziom resweratrolu można uzyskać podając

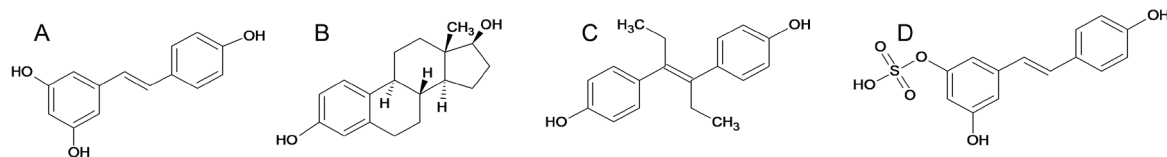
resweratrol w dawce 0,5–1 g dziennie. Wydaje się to być wystarczające do zainicjowania efektów biologicznych w różnym stopniu dla poszczególnych tkanek organizmu. Tym samym długotrwała suplementacja resweratrolu może wiązać się z zaburzeniem homeostazy całego organizmu [21]. Takie działanie resweratrolu może zostać wykorzystane do opracowania nowych strategii leczenia niektórych zaburzeń endokrynologicznych, takich jak zespół policystycznych jajników, endometrioza, czy nowotwory zależne od estrogenów. Jednocześnie niekontrolowana suplementacja resweratrolu przy uwzględnieniu predyspozycji osobniczych i genetycznych, może również, prawdopodobnie, prowadzić do zaburzeń endokrynologicznych, a ich przejawy mogą obejmować, zaostrzenie wyżej wymienionych chorób [21]. Przytoczone poniżej przykłady badań przeprowadzonych w tym zakresie wydają się być wystarczające, aby wzbudzić uzasadnione obawy, że resweratrol może powodować zaburzenia endokrynologiczne [31–36]. Efekty takiego działania zaobserwowano zarówno w badaniach na zwierzętach, jak także u ludzi przyjmujących resweratrol. Na przykład w badaniach klinicznych z udziałem kobiet z zespołem policystycznych jajników [31] oraz mężczyzn z syndromem metabolicznym [33] resweratrol w dawce 1 g [31] i 1,5 g [33] dziennie w ciągu 3–4 miesięcy zmienił poziom hormonów steroidowych, oraz ich prekursorów w osoczu pacjentów biorących udział w tych testach. Interesującym doniesieniem w tym aspekcie wydaje się być praca dotycząca zastosowania resweratrolu w celu zwiększenia skuteczności działania doustnych środków antykoncepcyjnych (drospirenon+etynyloestradiol) w leczeniu bólu towarzyszącego endometriozie. Autorzy wskazali na obniżoną ekspresję aromatazy i cyklooksygenazy-2 jako możliwe przyczyny zmniejszenia dolegliwości bólowych u kobiet przyjmujących terapię antykoncepcją kojarzoną z resweratrolu [35]. Środki antykoncepcyjne mają wiele wspólnych szlaków metabolicznych z endogennymi estrogenami i steroidami w związku z tym, resweratrol może zwiększać ich skuteczność terapeutyczną poprzez hamowanie metabolizmu tych ksenobiotyków. Wpływ resweratrolu na szlaki hormonów steroidowych może być również związany ze zużyciem niezbędnych kofaktorów i prekursorów wymaganych, niezbędnych dla zachowania odpowiedniej aktywności enzymów [32,37]. Taka sytuacja może przekierowywać metabolizm estrogenów ma szlaki metabolizmu, które prowadzą do powstania metabolitów o właściwościach mutagennych i może

dotyczyć także niektórych leków metabolizowanych przez te enzymy. W tej sytuacji metabolizm takich leków może być „przesunięty” w stronę bardziej toksycznych metabolitów [32,37].

Tak jak wspomniano wyżej szereg eksperymentów zmierzających do opisanie procesów związanych z wchłanianiem, dystrybucją, metabolizmem i wydalaniem resweratrolu pozwoliły na określenie zależności dawka - poziom w surowicy. Doustne dawki resweratrolu dobrze korelują z poziomami w osoczu, ale trudniej jest określić korelację między poziomami resweratrolu w osoczu oraz ilości, które gromadzą się w tkankach [19]. Z tego punktu widzenia stężenie resweratrolu w osoczu nie wydaje się być wystarczające, aby przewidzieć poziomy tego związku w tkankach zarówno w postaci metabolitu jak i postaci wolnej. Brak takiego parametru powoduje, trudności w ocenie wpływu resweratrolu podczas długoterminowej ekspozycji np. w postaci suplementu diety. Dysponujemy jednak obecnie dowodami z badań na zwierzętach, że resweratrol i jego koniugaty gromadzą się w tkankach do poziomów, które zdolne są do wywołania efektów biologicznych obserwowanych w warunkach *in vitro* [38]. Ostatnie badania wykazały, że resweratrol może zostać „zregenerowany” *in vivo* z jego metabolitów w wyniku aktywności enzymów: sulfatazy i  $\beta$ -glukuronidazy, co w efekcie może skutkować podwyższeniem poziomu resweratrolu w tkankach [12,39,40]. W obu przypadkach jednak trudno jest określić wzajemne relacje pomiędzy procesami sprzęgania i hydrolizy w poszczególnych tkankach i ich wpływ na poziom resweratrolu w komórkach narządów. Należy zwrócić uwagę, że dostępne dane literaturowe, nadal w niewystarczający sposób pozwalają na ocenę bezpieczeństwa stosowania resweratrolu.

## Podsumowanie

Długofalowe konsekwencje zdrowotne zmian powodowanych przez suplementację resweratrolu w dalszym ciągu są trudne do oszacowania. Bardzo poważnym wyzwaniem jest wskazanie najważniejszych kluczowych zależnych od receptorów estrogenowych celów komórkowych modulowanych przez resweratrol [5]. Ponadto interferencja resweratrolu z metabolizmem hormonów sterydowych może powodować wzrost stężenia estrogenów oraz znaczne nasilenie skutków ich działania również poprzez pośrednie działanie estrogenne na skutek hamowania metabolizmu estrogenów i wzrostu poziomu E2 w osoczu.



Rycina 1. A) trans-resweratrol, B) 17-β-estradiol, C) dietylostilbestrol, D) 3-O-siarczan trans-resweratrolu  
Figure 1. A) resveratrol, B) 17-β-estradiol, C) diethylstilbestrol D) *trans*-resveratrol-3-O-sulfate

W związku z powyższym należy zachować szczególną ostrożność w przypadku rekomendowania długotrwałego przyjmowania suplementów resweratrolu o wysokiej dawce.

Konflikt interesów/Conflict of interest  
Brak/None

✉ Marek Murias  
Katedra i Zakład Toksykologii  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu  
ul. Dojazd 30, 60-631 Poznań  
☎ (+48 61) 847 07 21  
✉ marek.murias@ump.edu.pl

#### Piśmiennictwo/References

- Romagnolo DF, Davis CD, Milner JA. Phytoalexins in cancer prevention. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:2035–2058.
- Peng W, Qin R, Li X, Zhou H. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: a review. *J Ethnopharmacol*. 2013;148:729–745.
- Careri M, Corradini C, Elviri L, et al. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. *J Agric Food Chem*. 2004;52:6868–6874.
- Fragopoulou E, Antonopoulou S. The French paradox three decades later: Role of inflammation and thrombosis. *Clin Chim Acta*. 2020;510:160–169.
- Pezzuto JM. Resveratrol: Twenty Years of Growth, Development and Controversy. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019;27:1–14.
- Chudzińska M, Rogowicz D, Wołowicz Ł, et al. Resveratrol and cardiovascular system—the unfulfilled hopes. *Ir J Med Sci Published Online First*. 2020;
- Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275:218–220.
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*. 2004;24:2783–2840.
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:493–506.
- de Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, et al. Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica*. 2000;30:1047–1054.
- Abdulridha MK, Al-Marzoqi AH, Al-Awsi GRL, et al. Anticancer Effects of Herbal Medicine Compounds and Novel Formulations: a Literature Review. *J Gastrointest Cancer*. 2020;51:765–773.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*. 2004;32:1377–1382.
- Ko J-H, Sethi G, Um J-Y, Shanmugam MK, et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *IJMS*. 2017;18:2589.
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14138–14143.
- Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *Int J Oncol*. 1998;12:865–869.
- Levenson AS, Gehm BD, Pearce ST, et al. Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha. *Int J Cancer*. 2003;104:587–596.
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801–11.

18. Kucinska M, Giron M-D, Piotrowska H, et al. Novel Promising Estrogenic Receptor Modulators: Cytotoxic and Estrogenic Activity of Benzanilides and Dithiobenzanilides. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0145615.
19. Whitten PL, Patisaul HB. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect*. 2001;109:5–20.
20. Ashby J, Tinwell H, Pennie W, et al. Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects. *J Appl Toxicol*. 1999;19:39–45.
21. Qasem RJ. The estrogenic activity of resveratrol: a comprehensive review of in vitro and in vivo evidence and the potential for endocrine disruption. *Critical Reviews in Toxicology*. 2020;50:439–462.
22. Basu P, Maier C. Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomed Pharmacother*. 2018;107:1648–1666.
23. Hsieh C-J, Hsu Y-L, Huang Y-F, et al. Molecular Mechanisms of Anticancer Effects of Phytoestrogens in Breast Cancer. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19:323–332.
24. Garvin S, Ollinger K, Dabrosin C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Lett*. 2006;231:113–122.
25. Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, et al. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127:258–264.
26. Basly JP, Marre-Fournier F, Le Bail JC, et al. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci*. 2000;66:769–777.
27. Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res*. 1999;249:109–115.
28. Bhat KP, Pezzuto JM. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res*. 2001;61:6137–6144.
29. Kang N-H, Hwang K-A, Kim T-H, et al. Induced growth of BG-1 ovarian cancer cells by 17 $\beta$ -estradiol or various endocrine disrupting chemicals was reversed by resveratrol via downregulation of cell cycle progression. *Mol Med Rep*. 2012;6:151–156.
30. Borgert CJ, LaKind JS, Witorsch RJ. A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1020–1036.
31. Banaszewska B, Wrotyńska-Barczyńska J, Spaczynski RZ, et al. Effects of Resveratrol on Polycystic Ovary Syndrome: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:4322–4328.
32. Chow H-HS, Garland LL, Hsu C-H, et al. Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:1168–1175.
33. Kjaer TN, Ornstrup MJ, Poulsen MM, et al. Resveratrol reduces the levels of circulating androgen precursors but has no effect on, testosterone, dihydrotestosterone, PSA levels or prostate volume. A 4-month randomised trial in middle-aged men. *Prostate*. 2015;75: 1255–1263.
34. Ornstrup MJ, Harsløf T, Kjaer TN, et al. Resveratrol increases bone mineral density and bone alkaline phosphatase in obese men: a randomized placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:4720–4729.
35. Maia H, Haddad C, Pinheiro N, et al. Advantages of the association of resveratrol with oral contraceptives for management of endometriosis-related pain. *Int J Womens Health*. 2012;4:543–549.
36. Ávila-Gálvez MÁ, García-Villalba R, Martínez-Díaz F, et al. Metabolic Profiling of Dietary Polyphenols and Methylxanthines in Normal and Malignant Mammary Tissues from Breast Cancer Patients. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63:
37. Chow H-HS, Garland LL, Heckman-Stoddard BM, et al. A pilot clinical study of resveratrol in postmenopausal women with high body mass index: effects on systemic sex steroid hormones. *J Transl Med*. 2014;12:223.
38. Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, et al. Distribution of [<sup>14</sup>C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci*. 2003;72:2219–2233.
39. Boocock DJ, Faust GES, Patel KR, et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:1246–52.
40. Patel KR, Andreadi C, Britton RG, et al. Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. *Sci Transl Med*. 2013;5(205):205ra133.
41. Andreadi C, Britton RG, Patel KR, et al. Resveratrol-sulfates provide an intracellular reservoir for generation of parent resveratrol, which induces autophagy in cancer cells. *Autophagy*. 2014;10:524–5.