

**Received:** 2006.12.04  
**Accepted:** 2007.03.15  
**Published:** 2007.04.11

## Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy?

### Do antioxidant vitamins influence carcinogenesis?

**Jolanta Guz, Tomasz Dziaman, Anna Szpila**

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### Streszczenie

Wolne rodniki tlenowe mogą oddziaływać na materiał genetyczny komórek powodując jego stopniowe uszkodzenie i mutacje. Akumulacja mutacji w obrębie pewnych genów może prowadzić do transformacji nowotworowej komórek i rozwoju raka. Szkodliwemu działaniu wolnych rodników przeciwdziałają antyoksydanty, do których należą m.in. witaminy A, C i E, a bogatym ich źródłem są owoce i warzywa.

Poniższy artykuł jest próbą podsumowania obecnego stanu wiedzy o wpływie witamin A, C i E na oksydacyjne uszkodzenia DNA, aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych oraz ekspresję wybranych genów. Celem pracy jest odpowiedź na pytanie, czy dieta bogata w witaminy może chronić przed rakiem.

**Słowa kluczowe:**

**witaminy antyoksydacyjne • nowotwory • reaktywne formy tlenu • czynniki transkrypcyjne**

#### Summary

Free radicals can affect the genetic material of cells, causing its gradual impairment and mutation. An accumulation of mutations in certain genes might lead to neoplastic transformations of the cells and to cancer development. The deteriorative effects of free radicals are counteracted by the antioxidant vitamins A, C, and E that quench free radical reactions. Fruits and vegetables are excellent sources of antioxidant vitamins. The following article attempts a short review of the current knowledge about the influence of vitamins A, C, and E on oxidative damage to DNA, the activity of some transcription factors, and the expressions of certain genes. The aim of this review is to answer the question whether a diet rich in vitamins can protect against cancer.

**Key words:**

**antioxidant vitamins • cancers • reactive oxygen species • transcription factors**

**Full-text PDF:**

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/10347.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10347.pdf)

**Word count:**

5971

**Tables:**

2

**Figures:**

5

**References:**

100

**Adres autorki:**

mgr Jolanta Guz, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: jolaguz@cm.umk.pl

**Wykaz skrótów:** **5-HMUr**a – 5-hydroksymetylouracyl; **8-oksyAde** – 8-oksyadenina; **8-oksyGua** – 8-oksyguanina; **8-oksydG** – 8-oksy-2'-deoksyguanozyna; **AP-1** – białko aktywatorowe 1 (activator protein); **COX-2** – cyklooksigenaza 2; **CTGF** – czynnik wzrostowy tkanki łącznej (connective tissue growth factor); **ELAM-1** – leukocytna cząsteczka adhezji, selektyna E (endothelial adhesion molecule 1, selectin E); **ERK** – kinaza białkowa regulowana czynnikami pozakomórkowymi (extracellular signal-regulated kinase); **gdC** – addukty glioksal-deoksytydyna; **hTAPs** – białka związane z tokoferolem (human tocopherol-associated proteins); **ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (intercellular adhesion molecule 1); **IκB** – inhibitor κB; **IKK** – kinazy fosforylujące IκB; **JNK** – kinaza fosforylująca N-terminalną część białka Jun (Jun N-terminal kinase); **MCP-1** – monocytarny chemotaktyczny czynnik białkowy-1 (monocyte chemoattractant protein-1); **MMP** – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej; **NER** – naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów (nucleotide excision repair); **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor κB); **PGE2** – prostaglandyna E; **PKC** – kinaza białkowa C; **PLA2** – fosfolipaza A2; **PP2A** – fosfataza białkowa A2; **PPAR** – receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów (peroxisome proliferator activated receptor); **TTP** – białko transportujące tokoferol; **VCAM-1** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 (vascular cell adhesion molecule 1); **VEGF** – naczyniowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor).

## WSTĘP

Materiał genetyczny komórek jest narażony na uszkodzenia przez reaktywne formy tlenu (RFT), powstające zarówno jako następstwo aerobowego metabolizmu, jak i na skutek działania czynników zewnątrznych. Ilość RFT reagujących z DNA jest ograniczana przez złożony system ochrony antyoksydacyjnej, do którego należą enzymy antyoksydacyjne (np. katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydazy), białka wiążące jony metali (np. transferyna, ceruloplazmina) oraz drobnocząsteczkowe antyoksydanty (np. askorbinian, tokoferole, karotenoidy, kwas moczowy, glutation), nazywane również „zmiataczami wolnych rodników” [8]. Zaburzenie równowagi pomiędzy formowaniem RFT a działaniem mechanizmów antyoksydacyjnych prowadzi do stresu oksydacyjnego skutkującego uszkodzeniem biomolekuł komórkowych, w tym DNA. Indukowane działaniem RFT uszkodzenia DNA obejmują modyfikacje zasad azotowych i reszt cukrowych, pojedyncze i podwójne pęknięcia nici, wiązania poprzeczne [8,36]. Na poziomie komórkowym uszkodzenia DNA mogą zakłócać procesy transkrypcji i replikacji lub prowadzić do niestabilności genomu (mutagenyzy). Konsekwencjami tych molekularnych zmian dla organizmu mogą być choroby nowotworowe i inne stany patologiczne, takie jak miażdżycy, choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona [36].

Wobec udziału wolnych rodników w patogenezie wielu chorób, m.in. nowotworów oraz w związku z uszkodzeniem komórek i tkanek przez RFT coraz większą uwagę przywiązuje się do profilaktycznego stosowania antyoksydantów oraz do prawidłowej diety.

## REAKTYWNE FORMY TLENU A NOWOTWORY

Proces powstawania nowotworu zachodzi wieloetapowo, a najprostszy model zakłada obecność trzech etapów: inicjacji, promocji i progresji. RFT mogą mieć wpływ na każdy z tych etapów [28]. Komórka ulega transformacji nowotworowej wskutek utraty kontroli nad procesami wzrostu i różnicowania, co jest związane z nagromadzeniem mutacji w materiale genetycznym. Jeżeli mutacja wystąpi w obrębie genów supresorowych bądź protoonkogenów może

zapoczątkować transformację nowotworową i niekontrolowaną proliferację komórki. Jedną z najczęściej powstających oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych DNA o właściwościach mutagennych jest 8-oksyguanina (8-oksyGua). Jeżeli w procesie replikacji DNA naprzeciwko 8-oksyGua zostanie włączona adenina, to po dwóch rundach replikacyjnych pojawi się transwersja G→T. Inne oksydacyjne modyfikacje DNA jak 8-oksyadenina (8-oksyAde), 5-hydroksycytosyna (5-OH-Cyt), czy 5-hydroksyuracyl (5-OH-Ura) wykazują również właściwości mutagenne [70]. Transwersje GC→TA typowe dla błędnego parowania 8-oksyGua są obserwowane *in vivo*, jako częste przyczyny mutacji protoonkogenu *ras* w przypadku raka wątroby u człowieka i mutacji genu supresorowego *p53* komórek raka płuc [28,70]. Na rolę, jaką mogą pełnić oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe w procesie karcynogenezy, mogą wskazywać wyniki badań, w których wykazano znacznie wyższy poziom 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oksydG) w tkankach nowotworowych w porównaniu z obrzębami wolnymi od zmian nowotworowych [70]. Należy również podkreślić, że wzrost zawartości zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA komórki nowotworowej może się przyczynić do wzrostu potencjału metastatycznego, czyli wzrostu możliwości tworzenia przerzutów [69]. Potwierdzają to badania, w których wykazano, że w przypadku ludzkich raków piersi potencjał metastatyczny zwiększał się ze wzrostem liczby oksydacyjnych uszkodzeń DNA [69]. W innych badaniach dotyczących mięśniaka macicy wykazano pozytywną korelację pomiędzy rozmiarem guza a zawartością 8-oksydG, przy czym większy rozmiar guza jest jednym z czynników predysponującym do złośliwienia. Wyniki te mogą sugerować, że wysoki poziom 8-oksydG może być czynnikiem odpowiedzialnym za formowanie mięśniaka oraz determinującym transformację guza łagodnego w złośliwą postać nowotworu [39].

Reaktywne formy tlenu uczestniczą w procesie karcynogenezy nie tylko poprzez uszkodzanie DNA i indukcję mutacji. W ostatnich latach wysunięto hipotezę, że RTF mogą w komórkach pełnić funkcje regulacyjne i pośredniczą w przekazywaniu sygnałów komórkowych zaangażowanych w regulację wzrostu komórek, ich różnicowanie, apo-



ptozę, a także ekspresję różnych cytokin, cząsteczek adhezyjnych i ich receptorów. W procesie ekspresji genów RFT biorą udział poprzez modulację czynników transkrypcyjnych, m.in. AP-1, NF- $\kappa$ B, p53 [2,9].

NF- $\kappa$ B wpływa na ekspresję wielu genów związanych z fazą promocji nowotworu (m.in. angiogenezą) i metastazą. Angiogeneza i przerzutowanie to procesy wymagające wielu białek: cytokin, chemokin, czynników np: VEGF, MCP-1, enzymów, takich jak: metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-9, MMP-2), cyklooksygenaza 2 (COX-2), aktywator plazminogenu (uPA), syntaza tlenu azotu (iNOS), cząsteczek adhezyjnych, m.in. ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1, których synteza jest regulowana przez NF- $\kappa$ B. [11,42]. W kilku typach nowotworów m.in. w czerniaku, raku trzustki, białaczce typu T, raku piersi, stercza, okrężnicy, pęcherza i płuc zauważono trwałą konstytutywną aktywność NF- $\kappa$ B, co nasuwa sugestię wpływu tego czynnika na oporność komórek na czynniki cytotatyczne [42].

Czynnik transkrypcyjny AP-1 jest kolejnym przykładem czynnika regulowanego przez zmiany stanu redoks komórki. AP-1 również moduluje transkrypcję wielu genów zaangażowanych w promocję i progresję nowotworową [65].

#### **WPLYW WITAMIN ANTYOKSYDACYJNYCH NA POZIOM OKSYDACYJNE ZMODYFIKOWANYCH ZASAD DNA**

Wiele badań epidemiologicznych wskazuje na odwrotną zależność między konsumpcją warzyw i owoców a częstością zachorowania na nowotwory. Możliwym mechanizmem tego ochronnego działania wydaje się aktywność antyoksydacyjna zawartych w pokarmach roślinnych witamin, głównie A, C i E [13,48]. Trudno jednoznacznie stwierdzić czy dodatkowe przyjmowanie witamin antyoksydacyjnych chroni przed oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA. Możliwe jest, że uzupełnianie diety witaminami działa ochronnie tylko wtedy, gdy ich endogenne poziomy są bardzo niskie np. z powodu ostrego stresu oksydacyjnego. Wykazano, że podawanie witamin antyoksydacyjnych pacjentom zainfekowanym wirusem HIV, którzy mieli bardzo niski poziom witamin antyoksydacyjnych i podwyższony poziom 8-oksydGua oraz innych zmodyfikowanych zasad w limfocytach skutkuje podniesieniem poziomu tych witamin do obserwowanego w grupie kontrolnej i jednoczesnym obniżeniem poziomu oksydacyjnych modyfikacji DNA [49].

W innych badaniach wykazano, że endogenne poziomy witamin antyoksydacyjnych w osoczu pacjentów z rakiem jelita grubego jest znacząco niższy niż w grupie kontrolnej. Jest więc prawdopodobne, że stres oksydacyjny, charakterystyczny dla zaawansowanych stanów raka jelita grubego, odpowiada za obniżenie poziomu witamin antyoksydacyjnych. Stwierdzono również znaczący wzrost poziomu 8-oksydG w DNA limfocytów pacjentów z rakiem jelita w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki sugerują, że stres oksydacyjny może dotyczyć nie tylko zmienionych chorobowo tkanek, ale również innych tkanek organizmu pacjenta z chorobą nowotworową. Stosowanie suplementacji antyoksydantami u osób z zaawansowanym stadium choroby nowotworowej, może więc spowolnić jej progresję [41].

W naszych ostatnich badaniach analizowaliśmy różne markery oksydacyjnych uszkodzeń DNA (poziom 8-oksydG

w DNA leukocytów, zawartość 8-oksydG, 8-oksydGua i 5-HMUra w moczu) i ich zależności od podstawowego (zależnego od diety i biodostępności) poziomu drobnocząsteczkowych antyoksydantów (witamina A, C, E, kwas moczowy) w osoczu osób zdrowych. Wyniki badań wykazały słabą, ale wysoce znamienne statystycznie, ujemną korelację między wymienionymi powyżej biomarkerami a analizowanymi antyoksydantami. Wyniki te wskazują, że podstawowa zawartość witamin antyoksydacyjnych może wpływać na poziom potencjalnie mutagennych oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz zależy nie tylko od diety, ale prawdopodobnie od biodostępności, która może być genetycznie uwarunkowana [38].

#### **WITAMINA C**

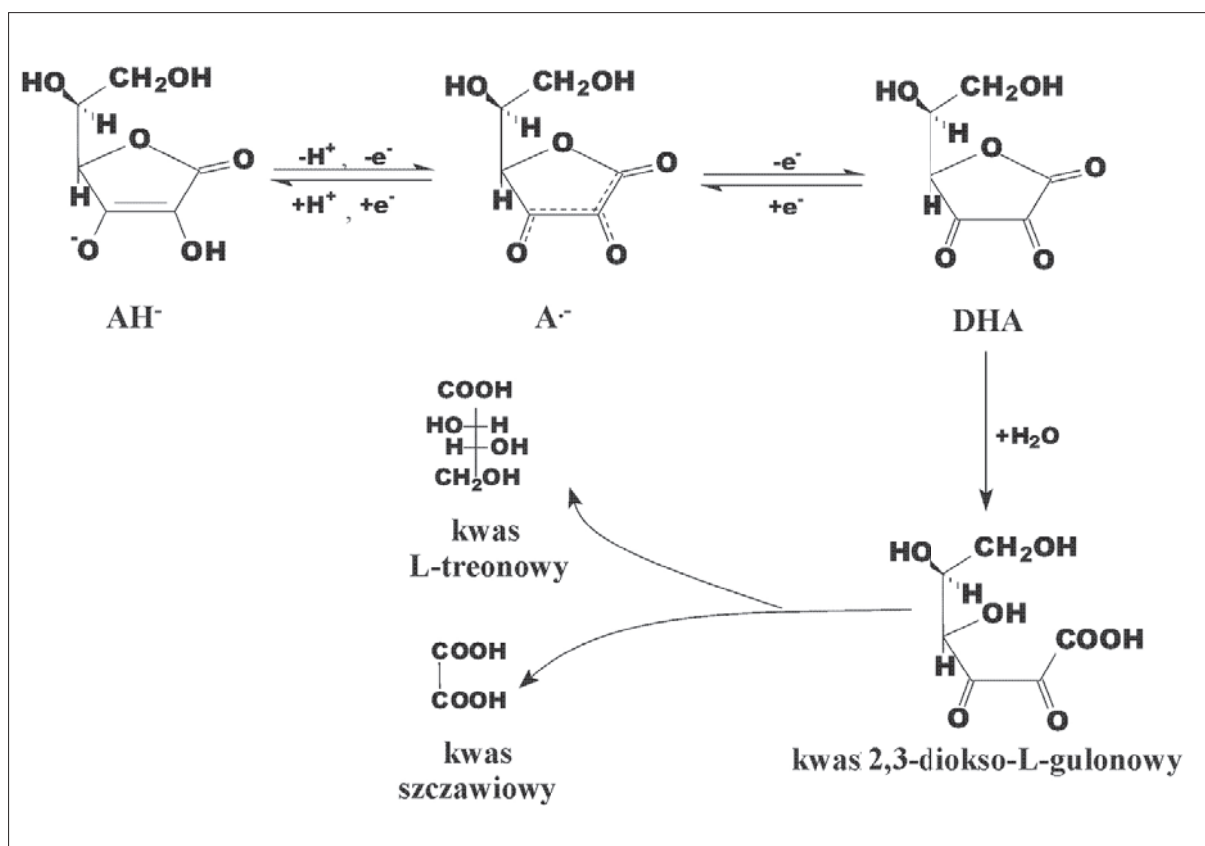
Kwas askorbinowy (AA), czyli witamina C, w płynach ustrojowych jest prawie całkowicie zdysocjowany i występuje w postaci anionu askorbinianowego (AH<sup>-</sup>). Ważną właściwością askorbinianu jest jego aktywność redukująca. W reakcjach z czynnikami utleniającymi askorbinian w wyniku redukcji jednoelektronowej może tworzyć wolny rodnik askorbylowy (A<sup>•-</sup>), cząsteczkę o małej reaktywności chemicznej. W rezultacie oddania dwóch elektronów powstaje kwas dehydroaskorbinowy (DHA). Jest on nietrwały i może się rozpaść do kwasu 2,3-diokso-L-gulonowego, który jest podatny na dalsze utlenianie, prowadzące do powstania kwasu szczawowego i L-treonowego (ryc. 1) [31,72].

Z powodu hydrofilowego charakteru i ładunku cząsteczek zarówno askorbinianu jak i dehydroaskorbinianu, dyfuzja prosta przez błonę komórkową pełni znikomą rolę w ich transporcie. Witamina C dostaje się do komórek w wyniku dyfuzji ułatwionej w postaci dehydroaskorbinianu, który jest transportowany przez białka z rodziny transporterów heksoz (głównie GLUT-1). Po wewnętrznej stronie błony komórkowej jest on szybko redukowany, co zabezpiecza go przed usunięciem na zewnątrz komórki oraz umożliwia efektywną akumulację askorbinianu wbrew gradientowi stężeń. Drugi mechanizm przezbłonowego transportu askorbinianu jest zależny od jonów sodowych i charakterystyczny dla niektórych komórek. Transport Na<sup>+</sup>-zależny zachodzi z udziałem białek transportujących L-askorbinian – SVCT1 i SVCT2 [96].

Właściwości redukujące witaminy C decydują o jej aktywności antyoksydacyjnej wobec wszystkich RFT oraz ich pochodnych (tab. 1) [45]. Kwas askorbinowy uczestniczy również w regenerowaniu antyoksydantów hydrofobowych, takich jak:  $\alpha$ -tokoferol i  $\beta$ -karoten z ich postaci rodnikowych [31,72].

Kwas askorbinowy może modulować stan redoks komórki. Wynika to zarówno z jego właściwości oksydo-redukcyjnych, jak i zdolności do utrzymywania innych cząsteczek w stanie zredukowanym (np. grup sulfhydrylowych białek i glutationu). Dzięki temu może wpływać na wiele procesów komórkowych regulowanych stanem redoks, takich jak np. przekazywanie sygnałów komórkowych, cykl komórkowy i naprawa DNA [60].

Opublikowano wiele prac dotyczących wpływu witaminy C na uszkodzenia DNA indukowane przez czynniki wywołujące w komórkach reakcje wolnorodnikowe. Niektóre



Ryc. 1. Produkty pośrednie i końcowe oksydatywnej degradacji askorbinianu

Tabela 1. Antyoksydacyjna aktywność kwasu askorbinowego [45]

Zmiata wolne rodniki	·OH, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> , RS <sup>•</sup> , RSO <sup>•</sup> , RSO <sub>2</sub> <sup>•</sup> , RNO <sub>2</sub> <sup>•</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> ; rodniki pochodne kwasu moczowego i leków
Zmiata nierodnikowe reaktywne formy tlenu	tlen singletowy, kwas podchloryny (HOCl), kwas nadtlenoazotawy (ONOOH), ozon O <sub>3</sub> , czynniki nitrujące
Hamuje peroksydację lipidów	współdziała z witaminą E poprzez regenerowanie α-tokoferolu z rodnika α-tokoferylowego, hamuje peroksydację zależną od aktywacji neutrofilów i dymu tytoniowego w lipoproteinach osocza
Uczestniczy w reakcjach enzymatycznych	stanowi kosubstrat dla peroksydaz zależnych od askorbinianu, biorących udział w usuwaniu nadtlenu wodoru
Chroni układ naczyniowy i oddechowy	poprawia tolerancję nitratów u pacjentów z chorobami naczyń, zabezpiecza układ oddechowy przed uszkodzeniami powodowanymi przez wdychane zanieczyszczenia powietrza

z tych prac przedstawiają dowody wskazujące na ochronne działanie witaminy C, jednak nie można pominąć doniesień przedstawiających prooksydacyjne działanie kwasu askorbinowego.

Wiele danych literaturowych wskazuje, że kontrolowane przyjmowanie witaminy C przeważnie skutkuje wzrostem stężenia tego związku w osoczu [40,77], ale wyniki analiz kilku biomarkerów tlenowych uszkodzeń DNA są rozbieżne. Duthie i wsp. z użyciem metody kometkowej wykazali, że wzbogacanie diety witaminą C (100 mg/dobę), E (280 mg/dobę) i β-karotenem (25 mg/dobę) znacząco zmniejszyła poziom oksydacyjnych uszkodzeń w DNA limfocytów [32]. Podobny efekt zaobserwowano w spermie ludzkiej po podawaniu samej witaminy C. Obniżenie

zawartości witaminy C w diecie do 5 mg/dobę spowodowało znaczny wzrost poziomu 8-oksydG w DNA spermy, natomiast ponowne zwiększenie spożycia witaminy C (już 60 mg/dobę) obniżyło poziom tego oksydacyjnego uszkodzenia [45]. W innych badaniach wykazano natomiast, że przyjmowanie witaminy C w dawce 500 mg/dobę obniża poziom 8-oksyaGua w DNA limfocytów, ale stymuluje wzrost poziomu 8-oksyaAde [77]. Z badań Rehmana i wsp. wynika, że uzupełnianie diety witaminą C było korzystne u osób, z małym wyjściowym stężeniem tej witaminy w osoczu (mniejsze niż 50 μmol/l), natomiast odwrotny skutek odnosiło, gdy stężenie to było większe niż 70 μmol/l [83].

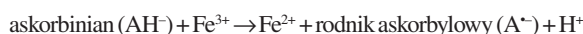
Jednym z ważnych czynników powodującym powstawanie stresu oksydacyjnego jest dym tytoniowy. Substancje





smoliste, znajdujące się w jednym wdechu dymu tytoniowego, zawierają aż  $10^{14}$  rodników, z których większość jest bardzo stabilna. Liczne badania wykazały, że palacze muszą przyjmować prawie 40% więcej witaminy C niż osoby niepalące, aby uzyskać porównywalny poziom kwasu askorbinowego w osoczu [3]. Próbowano również ustalić związek między paleniem papierosów przez ojca, przyjmowaniem witaminy C, oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA spermy oraz wystąpieniem dziecięcego nowotworu u potomstwa [3]. U palaczy wykazano mniejsze stężenie witaminy C w spermie oraz wyższy poziom oksydacyjnych uszkodzeń niż u mężczyzn niepalących. Palenie obniża poziom antyoksydantów niezbędnych do ochrony DNA spermy przed oksydacyjnymi uszkodzeniami, czyli do zminimalizowania ryzyka mutacji, które mogłyby prowadzić do defektów, chorób genetycznych lub nowotworów u potomstwa. [3]. Istnieją dowody, że dzieci, których ojcowie są palaczami mają zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory. Badania epidemiologiczne w Chinach wykazały, że chłoniaki, ostra białaczka limfatyczna, nowotwory mózgu występują 3–4 razy częściej u dzieci palących mężczyzn, a ryzyko zachorowania wzrasta wraz z ilością wypalanych papierosów rocznie. Wydaje się prawdopodobne, że ryzyko nowotworu u potomstwa palących mężczyzn może być wyższe, kiedy jest za mała zawartość antyoksydantów w diecie [3].

Prooksydacyjna aktywność kwasu askorbinowego jest związana z jego zdolnością do interakcji z jonami metali przejściowych, głównie żelaza i miedzi [31]:



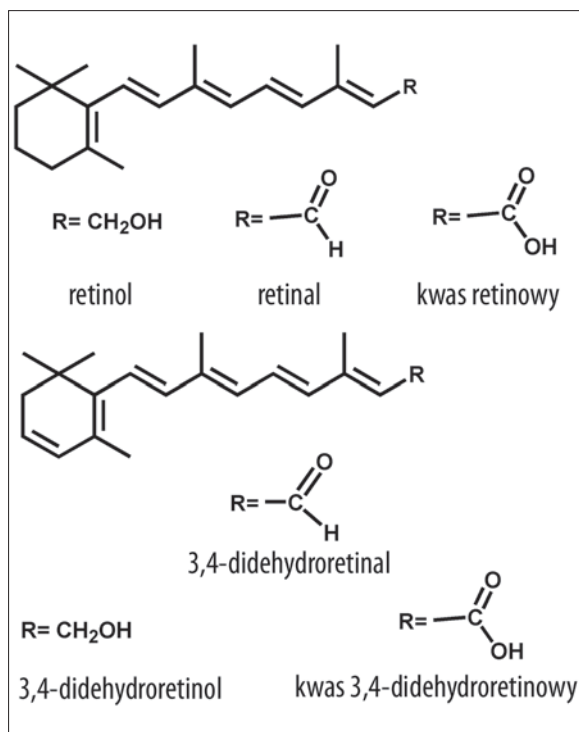
Zredukowane jony metali, np. żelaza, wchodzi w reakcje z nadtleniem wodoru prowadząc do wytworzenia wysoce reaktywnych rodników hydroksylowych. Badania *in vivo* nie potwierdziły jednoznacznie prooksydacyjnej aktywności kwasu askorbinowego podawanego łącznie z jonami żelaza. W badaniach, w których przez 12 tygodni ochotnikom podawano witaminę C (60 mg/dobę lub 260 mg/dobę) łącznie z solami żelaza (14 mg/dobę), po 6 tygodniach stwierdzono znaczący wzrost poziomu kilku zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA limfocytów (głównie 5-hydroksyhydantoiny, 5-hydroksymetylohydantoiny, fapy-guaniny), a po 12 tygodniach obserwowano powrót poziomu tych związków do stanu początkowego. Po 12 tygodniach odnotowano ponadto spadek poziomu 8-oksygua i 8-oksya, przy jednoczesnym wzroście poziomu gliokolu tyminy i 5-metylocytozyny [83]. W innych badaniach w czasie wzbogacania diety kwasem askorbinowym (260 mg/dobę) łącznie z jonami żelaza (14 mg/dobę) nie stwierdzono różnic w poziomie oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych DNA w porównaniu z grupą przyjmującą placebo [82]. Nie stwierdzono również zmian w poziomie oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych u osób z wysokim poziomem witaminy C w osoczu (ok. 70  $\mu\text{mol/l}$ ), którym podawano jony żelaza (ok. 12,5 mg/dobę) przez 6 tygodni [81].

Wyniki niektórych eksperymentów sugerują, że witamina C może wpływać na obniżenie poziomu oksydacyjnych uszkodzeń nie tylko jako zmiatacz wolnych rodników, ale również poprzez modulację naprawy DNA. Cooke i wsp. badali skutek wzbogacania diety witaminą C (500

mg/dobę) na poziom 8-oksydG w DNA limfocytów oraz na poziom 8-oksydG w surowicy i moczu. W czasie 6 tygodni podawania kwasu askorbinowego stwierdzono znaczne obniżenie poziomu 8-oksydG w DNA limfocytów silnie skorelowane ze wzrostem stężenia witaminy C w osoczu. Wykazano jednocześnie wzrost poziomu 8-oksydG w surowicy i w moczu, przy czym maksymalne stężenie tego zmodyfikowanego nukleozydu obserwowano w 7 tygodniu od zaprzestania przyjmowania witaminy C. Badania te wskazują, że obniżenie poziomu 8-oksydG w DNA limfocytów jest związane ze wzrostem aktywności naprawczej, co skutkuje zwiększoną zawartością 8-oksydG w moczu [29]. Wyciągnięto więc wnioski, że witamina C nie tylko chroni przed formowaniem oksydacyjnych uszkodzeń, ale może również uczestniczyć w ich usuwaniu z DNA i/lub puli nukleotydów poprzez regulację aktywności enzymów naprawczych. Nowsze badania Cooke'a i wsp. również potwierdzają pogląd, że witamina C wpływa na naprawę DNA. Wykazano, że w początkowych tygodniach przyjmowania kwasu askorbinowego w dawce 400 mg/dobę, poziom adduktów glioksal-deoksytydyna (gdC) w DNA limfocytów wzrastał, podobnie jak w innych badaniach poziom fapy-guaniny, 5-hydroksyhydantoiny [83] czy 8-oksya [77]. Jednak kontynuowanie suplementacji spowodowało znaczący spadek poziomu gdC. Oceniano również poziom dimerów tyminy T<>T (powstających w czasie ekspozycji DNA na promieniowanie UV) i stwierdzono obniżenie ich poziomu podczas przyjmowania witaminy C. Wzrost, a następnie obniżenie poziomu gdC połączone ze spadkiem poziomu T<>T może sugerować, że za usuwanie gdC z DNA odpowiada naprawa głównie typu NER, a witamina C może modulować ten proces [30].

Badania Catani i wsp. również wskazują, że przeciwnowotworowa aktywność witaminy C może być związana z indukcją genów naprawy DNA. Wykazano, że kwas askorbinowy indukuje syntezę białka MLH1 (Mut L homologue-1) biorącego udział w naprawie błędnie sparowanych zasad (mismatch repair) oraz białka p73, indukującego apoptozę [21]. W badaniach tych wykazano również, że poprzez indukcję ekspresji genów *MLH1* i *p73* askorbinian może wzmacniać antyneoplastyczną aktywność niektórych chemioterapeutyków. W przeprowadzonym eksperymencie askorbinian wraz z cisplatyną nasilał apoptozę komórek nowotworowych. MLH1 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA (spowodowane cisplatyną) uaktywnia drogę przekazywania sygnałów, która prowadzi do aktywacji białka c-Abl, następnie białka p73, a w ostateczności do śmierci komórki [21].

Za udziałem witamin w obniżaniu poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA bardziej jednoznacznie przemawiają wyniki badań, w których jako źródło witamin antyoksydacyjnych zastosowano dietę bogatą w owoce i warzywa. Wydajnym źródłem witaminy C są np. owoce kiwi, które w 100 g zawierają prawie 100 mg witaminy C, co wystarcza do pokrycia dobowego zapotrzebowania na tę witaminę u dorosłego człowieka [46]. Badania Collinsa i wsp. wykazały, że owoce kiwi mają znaczące właściwości antyoksydacyjne, jednak nie można ich przypisywać wyłącznie zawartej w nich w dużych ilościach witaminie C. W eksperymencie *in vitro*, w którym porównywano poziom pęknięć nici DNA w limfocytach indukowanych nadtleniem wodoru, wykazano, że



Ryc. 2. Budowa chemiczna głównych postaci witaminy A

ekstrakt z owoców kiwi jest bardziej efektywny w ochronie przed uszkodzeniami DNA niż roztwór witaminy C o podobnym stężeniu. Również w badaniach *ex vivo*, po spożyciu 500 ml homogenizowanych owoców kiwi (8 owoców), stwierdzono zwiększoną odporność DNA limfocytów na oksydacyjne uszkodzenia indukowane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w porównaniu z grupą przyjmującą placebo. Spadek poziomu pęknięć nici DNA przy jednoczesnym wzroście stężenia witaminy C w osoczu obserwowano już po 3 godz. od spożycia owoców kiwi. Po 24 godz. nadal utrzymywał się niski poziom uszkodzeń, natomiast poziom witaminy C powrócił do poziomu podstawowego [27]. W późniejszych badaniach, w których ochotnicy spożywali 1, 2 lub 3 owoce kiwi na dobę przez 3 tygodnie, oceniano poziom antyoksydantów w osoczu i poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA w limfocytach. Stwierdzono przede wszystkim znaczny wzrost stężenia witaminy C, zwłaszcza po spożyciu 2 i 3 owoców kiwi na dobę (odpowiednio o 20 i 26%), czemu towarzyszył podobnie jak w poprzednich badaniach spadek pęknięć nici DNA w limfocytach. Ponadto wykazano obniżony poziom zmodyfikowanych pirymidyn i puryn w porównaniu do poziomów tych uszkodzeń przed suplementacją oraz wzrost aktywności naprawczej oksydacyjnie zmodyfikowanych puryn. Niewielkie wzbogacenie diety owocami kiwi może zapewnić podwójną ochronę przeciw oksydacyjnym uszkodzeniom DNA: poprzez podniesienie poziomu antyoksydantów oraz stymulację naprawy DNA. Możliwe, że te działania mogą prowadzić do obniżenia ryzyka powstawania mutacji prowadzących do powstania nowotworów [26].

#### WITAMINA A I KAROTENOIDY

Istotną rolę w funkcjonowaniu komórki i całego organizmu odgrywa również rozpuszczalna w tłuszczach witamina A. Jej podstawowymi postaciami jest retinol i 3,4-dide-

hydroretinol, które łatwo ulegają utlenieniu do aldehydów, a następnie do kwasów (ryc. 2). Dobrze poznano i opisano udział witaminy A w procesach widzenia oraz stymulowania wzrostu zwierząt [66].

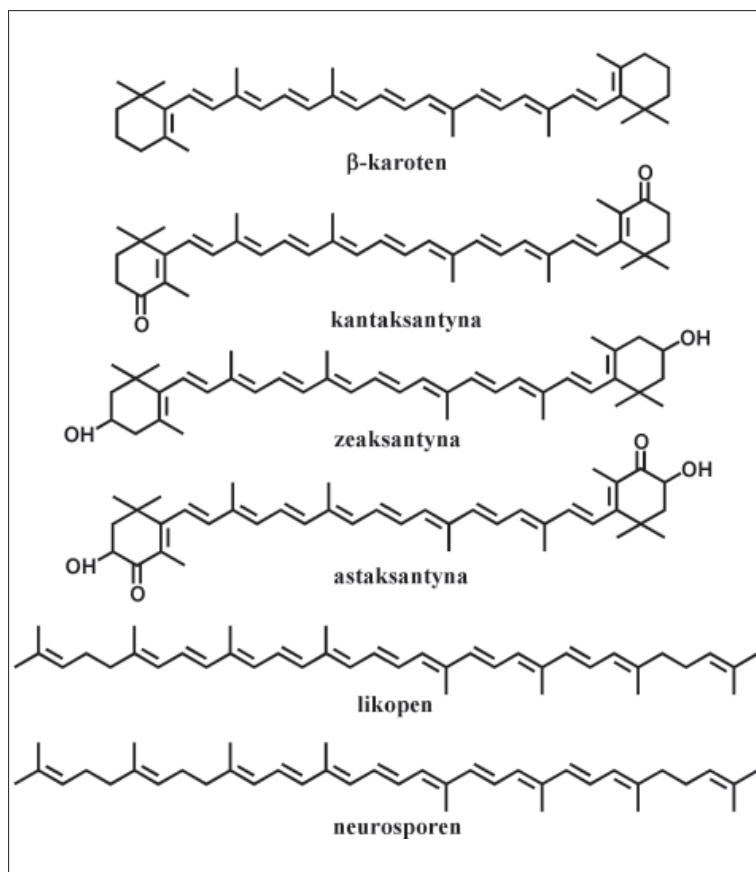
W organizmach zwierząt witamina A jest gromadzona głównie w tkance tłuszczowej oraz wątrobie. W diecie źródłem witaminy A są warzywa i owoce zawierające karotenoidy, z których część ma charakter prowitaminy A. Przykładem może być  $\beta$ -karoten, który poddany działaniu dioksygenazy  $\beta$ -karotenowej uwalnia dwie cząsteczki retinalu. Do grupy karotenoidów niemających właściwości prowitaminy A należą takie formy pierścieniowe jak: luteina, astaksantyna, fukoksantyna,  $\beta$ -kryptoksantyna, kantaksantyna, zeaksantyna. Ich bezpośrednimi prekursorami mogą być karotenoidy mające budowę liniową, np. likopen, neurosporen, zeakaroten (ryc. 3).

Właściwości antyoksydacyjne witaminy A wielokrotnie wykazywano w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro* [33,73]. Ujawniają się one w pełni przy niskim (fizjologicznym) ciśnieniu parcjalnym tlenu. Retinol może reagować z rodnikami nadtlenkowymi (ROO<sup>•</sup>), dzięki czemu przerywa reakcję łańcuchowej peroksydacji lipidów tworząc wodoronadtlenki (ROOH). Witamina A jest ponadto zdolna do bezpośredniego reagowania z RFT, tworząc 5,6-epoksyd retinoidowy [73]. Również karotenoidy wykazują szerokie właściwości antyoksydacyjne. Oprócz zmiatania rodników nadtlenkowych (ROO<sup>•</sup>) są efektywnymi wygaszaczami tlenu singletowego. Tlen singletowy może być zmiatany za pośrednictwem dwóch procesów: bezpośredniego przeniesienia energii wzbudzenia na cząsteczkę karotenoidu i jej rozprzelenia w postaci ciepła (bez uszkodzenia samej cząsteczki) lub/i chemicznej reakcji z tlenem, co jednak prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia cząsteczki karotenoidu [33]. Elementem strukturalnym, który zapewnia tym związkom zdolność do udziału w reakcjach redoks, jest łańcuch poli-enowy, zawierający wiele wiązań podwójnych.

Wyniki wielu badań wskazują, że spożywanie dużej ilości owoców i warzyw bogatych w witaminę A i karotenoidy redukuje ryzyko zachorowań na raka m.in. okrężnicy, stercza, piersi, płuc [56,62].

Pośród wszystkich znanych karotenoidów, badanych *in vitro*, likopen wydaje się najskuteczniejszym zmiataczem tlenu singletowego i wolnych rodników. Głównym źródłem likopenu w diecie są pomidory, a także arbuzy i różowe grejpfruty. Spożywanie likopenu zawartego w pomidorach, jest odwrotnie skorelowane z ryzykiem zachorowania na niektóre nowotwory. Zależność ta była najbardziej wyraźna w przypadku raka stercza, płuc i żołądka [63]. Zauważono, że ryzyko zachorowania na te nowotwory jest tym mniejsze, im większe jest spożycie pomidorów, a co za tym idzie większe jest stężenie likopenu we krwi. Wykazano, że spożywanie surowych pomidorów powoduje znaczące (o 26%) obniżenie ryzyka zachorowania na raka stercza, natomiast dieta bogata w przetworzone pomidory obniża to ryzyko nawet o 35% [18]. W innych badaniach, w których przez 2 tygodnie spożywano 25 g/dobę przecieru pomidorowego (o zawartości ok. 7 mg likopenu i 0,3 mg  $\beta$ -karotenu) stwierdzono wzrost stężenia karotenoidów w osoczu oraz znaczne obniżenie poziomu uszkodzeń DNA leukocytów indukowanych nadtlenkiem wodoru [79].





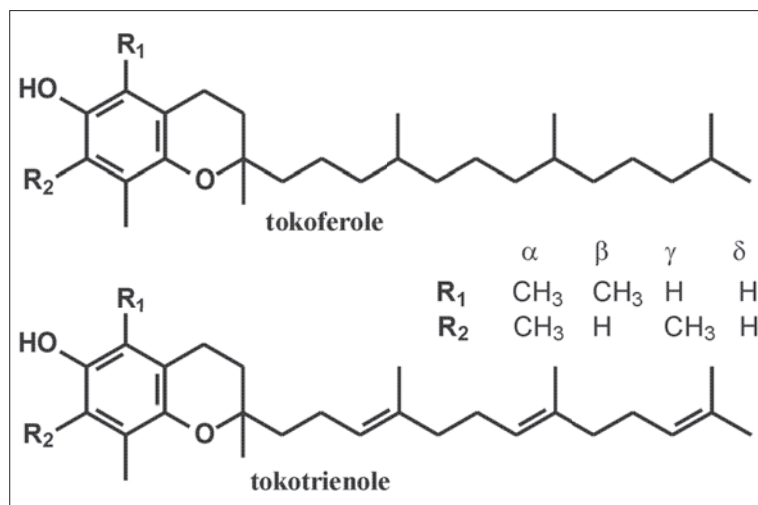
Ryc. 3. Struktura najpopularniejszych karotenoidów

Z niektórych doświadczeń na zwierzętach wynika, że podawanie  $\beta$ -karotenu (lub innych karotenoidów) zmniejsza częstość aberracji chromosomowych, a przez to ryzyko karcynogenezy [73]. Palacios i wsp. [74] wykazali, że witamina A odgrywa istotną rolę w ochronie organelli, takich jak mikrosomy i mitochondria przed negatywnymi skutkami peroksydacji lipidów. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na mitochondriach wątroby szczurów. W grupie zwierząt, których dieta pozbawiona była witaminy A, obserwowano wzrost poziomu 8-oksydG w mtDNA oraz poziomu malonyldialdehydu (produktu peroksydacji lipidów), a także spadek potencjału błonowego i stosunku GSH/GSSG w porównaniu z grupą kontrolną [6].

Witamina A i jej cząsteczki prekursorowe, głównie  $\beta$ -karoten, mogą wykazywać również działanie prooksydacyjne, które ujawnia się przy wysokim, porównywalnym z atmosferycznym, ciśnieniu tlenu. Ciśnienie takie jest osiągane na ogół tylko w nabłonku dróg oddechowych. W takich warunkach karotenoidy i retinoidy mogą ulegać autooksydacji, a następnie rozpoczynać reakcje łańcuchowej peroksydacji.  $\beta$ -karoten może ulegać również oksydacyjnym modyfikacjom w wyniku interakcji z RFT zawartymi w dymie tytoniowym [98]. Potwierdzają to badania, w których przyjmowanie  $\beta$ -karotenu w dawkach przekraczających typowe dzienne zapotrzebowanie, spowodowało większą częstość występowania raka płuc w grupie palaczy w porównaniu z grupą osób niepalących. Analogiczne wyniki uzyskano wśród osób pracujących w środowisku o dużym stężeniu azbestu w powietrzu [71]. W innych badaniach wykazano również, że u osób niepalących tytoniu i niepijących alko-

holu, podawanie  $\beta$ -karotenu zmniejsza ryzyko ponownego wystąpienia polipów okrężnicy w porównaniu z grupą otrzymującą placebo. Jednocześnie ryzyko tej choroby było dwukrotnie większe u ludzi często sięgających po te używki [7]. Podobnych wyników dostarczyły badania na zwierzętach, w których wykorzystano fretki (*Mustela furo*) ze względu na duże podobieństwo ich metabolizmu i absorpcji  $\beta$ -karotenu do obserwowanego u ludzi. W doświadczeniu *in vitro*, w którym ekstrakty tkanek płucnych zwierząt eksponowanych przez 6 miesięcy na działanie dymu tytoniowego inkubowano z  $\beta$ -karotenem, wykazano wzrost oksydacyjnie zmodyfikowanych pochodnych  $\beta$ -karotenu w porównaniu z grupą kontrolną. Pochodne te mogą zakłócać przekazywanie sygnału wewnątrz komórki lub indukować aktywność enzymów cytochromu P-450, co może się potencjalnie przyczynić do powstawania nowotworu [25].

Uważa się, że spożywanie wszystkich karotenoidów jest skuteczniejsze niż wzbogacanie diety wybranym związkiem z tej grupy. Zaobserwowano, że jedzenie dużej ilości warzyw i owoców będących źródłem  $\alpha$ -,  $\beta$ -karotenu, luteiny, zeaksantyny może zmniejszać ryzyko raka piersi u kobiet przed menopauzą [61]. W innych badaniach, po dwutygodniowych okresach spożywania soku z pomidorów (330 ml/dobę z 40 mg likopenu), soku z marchwi (330 ml/dobę z 22,3 mg  $\beta$ -karotenu i 15,7 mg  $\alpha$ -karotenu), suszonego szpinaku (10 g/dobę z 11,3 mg luteiny) odnotowano znaczący spadek liczby endogennych pęknięć nici DNA limfocytów. Ponadto stwierdzono, znaczący spadek poziomu oksydacyjnie zmodyfikowanych pirymidyn w okresie wzbogacania diety sokiem z marchwi



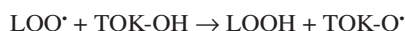
Ryc. 4. Budowa chemiczna tokoferoli i tokotrienoli (R1 i R2 – podstawniki)

[78]. Wyniki te wskazują, że spożywanie warzyw zawierających różne karotenoidy może chronić przed mutagenizacją poprzez obniżenie uszkodzeń DNA.

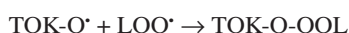
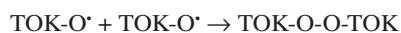
## WITAMINA E

Witamina E, będąca antyoksydantem rozpuszczalnym w tłuszczach, obejmuje 8 różnych postaci. Wszystkie te substancje są zbudowane z układu pierścieniowego 6-chromanolu i szesnastowęglowego łańcucha bocznego. W zależności od tego, czy łańcuch boczny jest nasycony, czy zawiera trzy wiązania podwójne, nazywane są one odpowiednio tokoferolami i tokotrienolami (ryc. 4). Obecność hydrofobowego łańcucha bocznego umożliwia wbudowanie tokoferoli w błony biologiczne [66].

Aktywność antyoksydacyjna tokoferoli jest dobrze poznana, zwłaszcza ich zdolność do przerywania łańcuchowej peroksydacji lipidów. Tokoferole reagują z rodnikami nadtlenkowymi tworzącymi się w błonach biologicznych i lipoproteinach wytwarzając względnie stabilne rodniki tokoferylowe. Działanie antyoksydacyjne tokoferolu zależy od grupy  $-\text{OH}$  w pozycji 6 układu chromanowego. Atom wodoru obecny w tej grupie uczestniczy w wygaszaniu tlenu singletowego oraz w hamowaniu tworzenia rodników nadtlenkowych ( $\text{LOO}^\bullet$ ):



Rodnik tokoferylowy ( $\text{TOK-O}^\bullet$ ) jest stosunkowo mało reaktywny. Może on wejść w reakcję z kolejnym wolnym rodnikiem, lub ulec redukcji pod wpływem innych związków o działaniu antyoksydacyjnym (karotenoidów, kwasu askorbinowego, glutationu, ubiquinonu) [17]. Rekombinacja rodników tokoferylowych lub addycja tego rodnika do rodnika nadtlenkowego również przyczynia się do terminacji reakcji wolnorodnikowych [8].



Szczególnie ważna jest obecność witaminy E w strukturach komórkowych, które zawierają dużą ilość wielonie-

nasyconych kwasów tłuszczowych (np. błony komórkowe, otoczki mielinowe neuronów) [88] oraz w tych, które narażone są na duże stężenia tlenu (np. błony erytrocytów czy komórek dróg oddechowych).

Niektóre z badań wskazują na udział witaminy E w ochronie przed mutagennym działaniem RFT. Przyjmowanie witaminy E w dawce 280 mg/dobę przez 20 tygodni spowodowało wzrost stężenia tej witaminy w osoczu oraz spadek poziomu oksydacyjnie zmodyfikowanych pirymidyn w DNA limfocytów krwi obwodowej [32]. Podobnie badania, w których palącym mężczyznom (w wieku około 24 lat) podawano witaminę E w dawce 200 IU/dobę (przez 4 tygodnie), wykazały ponad dwukrotny wzrost poziomu tej witaminy w osoczu oraz spadek (o 33,8%) poziomu 8-oksydG w DNA leukocytów [58]. Po wzbogacaniu diety witaminą E (1000 IU/dobę przez 12 tygodni) stwierdzono spadek poziomu 8-oksydG w DNA leukocytów w grupie osób młodych (18–35 lat), przy czym nie obserwowano tego w grupie osób starszych (65–80 lat) [85]. W eksperymencie *in vitro*, po zastosowaniu witaminy E w stężeniu 30  $\mu\text{M}$  w hodowlach komórkowych ludzkich limfoblastów, także zaobserwowano obniżenie poziomu uszkodzeń DNA [24]. Korzystny wpływ witaminy E na poziom uszkodzeń DNA sugerują również wyniki badań, w których stosowano dietę wzbogaconą wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Wykazano, że wzrost zawartości w diecie nienasyconych kwasów tłuszczowych o 15%, przy jednoczesnej małej zawartości witaminy E (5–7 mg/dobę) skutkuje podwyższeniem poziomu oksydacyjnie zmodyfikowanych pirymidyn w DNA leukocytów oraz zwiększeniem liczby pęknięć nici DNA indukowanych  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nie obserwowano natomiast wzrostu tych uszkodzeń w grupie osób przyjmujących witaminę E w dawce 80 mg/dobę [50].

Jednakże część z przeprowadzonych eksperymentów nie dowodzi korzystnego wpływu wzbogacania diety witaminą E w zapobieganiu uszkodzeniom komórkowego DNA. W badaniach, w których przez 6 tygodni przyjmowano witaminę E w dawce 800 IU/dobę, wykazano 2,5-krotny wzrost jej poziomu w osoczu bez korelacji z liczbą pęknięć chromatyd [43]. Nie stwierdzono też wpływu suplementacji na poziom uszkodzeń chromosomów po podawaniu mężczyznom witaminy E w dawkach 50 mg/dobę przez





8 tyg. (witamina w produktach zbożowych), a następnie 500 IU przez 8 tyg. (witamina w kapsułkach) [37]. W kolejnych badaniach, w których grupa kontrolna i grupa pacjentów z cukrzycą typu 1 przyjmowała 400 IU witaminy E przez 8 tygodni, nie stwierdzono znaczącego spadku liczby jednoniciowych pęknięć (SSB) w DNA limfocytów [4]. Również po dwumiesięcznym zażywaniu witaminy E (2 razy po 100 mg na dobę), nie odnotowano korelacji między poziomem witaminy E w osoczu a poziomem 8-oksydG w moczu [80]. W innych badaniach obserwowano nawet wyższy poziom 8-oksydG w DNA limfocytów u osób z wyższym poziomem witaminy E w osoczu [12].

#### ROLA ANTYOKSYDANTÓW W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Opublikowano wiele prac, w których wykazywano wpływ naturalnie występujących zmiataczy wolnych rodników, takich jak witaminy A, C i E na utrzymanie homeostazy komórkowej przez przerywanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych [86]. W ciągu ostatnich lat wzrasta również liczba doniesień wskazujących na udział tych witamin w regulacji transkrypcji różnych genów. Wykazano, że określony poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w komórce może determinować kilka ważnych procesów, m.in. aktywację swoistych enzymów (np. proteaz), zmianę stężenia jonów (np. wapnia), ekspresję genów, regulację proliferacji, różnicowania i śmierci komórek (apoptoza lub nekroza) [16]. Antyoksydanty mogą wpływać na te procesy komórkowe przez zmiatanie wolnych rodników tlenowych, modulację stanu redoks komórki oraz regulację wewnątrzkomórkowych dróg sygnałowych.

Wykazano, że ekspresję bardzo wielu genów reguluje witamina E (tab. 2.) [5]. Są to geny związane z wychwytem i degradacją tokoferoli (grupa 1), z wychwytem lipidów (grupa 2), geny modulujące białka zewnątrzkomórkowe (grupa 3), geny zaangażowane w proces zapalny, adhezję i agregację komórek (grupa 4) oraz w przekaźnictwo komórkowe i kontrolę cyklu komórkowego (grupa 5) [5].

Wyniki badań *in vitro* wskazują, że poprzez modulację różnych genów witamina E hamuje proliferację wielu linii komórkowych ludzkich nowotworów.  $\alpha$ -Tokoferol indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w liniach ludzkiego raka gruczołu krokowego (LNCaP i PC3) przez podniesienie poziomu białka p27, będącego inhibitorem kinaz cyklozależnych [93]. Z kolei  $\gamma$ -tokoferol ma zdolność hamowania cyklu komórkowego w fazie S, w linii komórek raka stercza (DU-145), w wyniku zmniejszenia stężenia cykliny D1 i E [44].  $\gamma$ -Tokoferol wpływa również na wzrost ekspresji genu PPAR- $\gamma$  w komórkach raka jelita grubego (SW480) [19].

Sposób w jaki tokoferole mogą modulować ekspresję genów nie jest jednak do końca pewny. Prawdopodobnie jest w to zaangażowanych kilka odmiennych mechanizmów molekularnych:

- $\alpha$ -tokoferol może zmieniać aktywność czynników transkrypcyjnych i modulować przekaźnictwo sygnału przez wpływ na aktywność niektórych enzymów, takich jak kinaza białkowa C, fosfolipaza A2, 5-lipooksygenaza, czy cyklooksigenaza 2, które mogą pośrednio wpływać na ekspresję genów;
- $\alpha$ -tokoferol może także oddziaływać na ekspresję genów przez bezpośrednią modulację aktywności czynni-

ków transkrypcyjnych np. przez receptor pregnanowy X (PXR), jądrowe receptory PPAR, czy receptory sieroco (orphan receptors) [57,97];

- $\alpha$ -tokoferol może być zaangażowany w ekspresję genów przez trzy białka związane z tokoferolem (hTAPs), które mogą pełnić rolę „molekularnych opiekunek” (molecular chaperones). Wytwarzają one specyficzne warunki do działania tokoferoli. Białka te mogą regulować dostęp tokoferolu do swoistych enzymów i czynników transkrypcyjnych lub kontrolować poziom „wolnego” tokoferolu. W badaniach *in vitro* wykazano, że białka hTAPs obniżają aktywność zrekombinowanej kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej, natomiast stymulują ją w obecności  $\alpha$ -tokoferolu, przy czym sam  $\alpha$ -tokoferol w niewielkim stopniu wpływa na aktywność tego enzymu. Prawdopodobnie  $\alpha$ -tokoferol moduluje aktywność kinazy konkurując z fosfatydyloinozytolem o wiązanie się z hTAPs [54];
- tokoferole mogą być metabolizowane do związków, które wiążą się z czynnikami transkrypcyjnymi i niektórymi enzymami lub modulują ich aktywność. Wykazano, że metabolit  $\gamma$ -tokoferolu –  $\gamma$ -karboksyetylo-hydroksychroman ( $\gamma$ -CEHC), hamuje syntezę COX-2 i prostaglandyny E (PGE2) w aktywowanych makrofagach i komórkach nabłonka [53]. Niedawno stwierdzono, że inny metabolit witaminy E – 2,2,5,7,8-pentametylo-6-chromanol (PMCoI), ma zdolność hamowania wzrostu androgenowrażliwych komórek raka stercza, ponieważ ma antyandrogeniczną aktywność [92].

Na poziomie posttranslacyjnym witamina E wpływa na drogi sygnałowe poprzez hamowanie aktywności enzymów np.: kinazy białkowej C (PKC), fosfolipazy A2 [100], cyklooksygenazy-2 (COX-2) [1]. Wykazano, że inhibicja aktywności PKC indukowana przez witaminę E ( $\alpha$ -tokoferol) prowadzi do zatrzymania wzrostu komórek mięśni gładkich. Późniejsze eksperymenty potwierdziły zaangażowanie  $\alpha$ -tokoferolu w hamowanie aktywności PKC w innych typach komórek, m.in. monocytach, makrofagach, neutrofilach, fibroblastach [84,100]. Badania aktywności PKC na poziomie komórkowym wykazują, że właściwości hamujące  $\alpha$ -tokoferolu nie wynikają z interakcji białko enzymatyczne-tokoferol oraz wpływu  $\alpha$ -tokoferolu na ekspresję PKC. Hamowanie następuje w wyniku defosforylacji enzymu poprzez fosfatazę  $PP_2A$ , której aktywność jest regulowana przez  $\alpha$ -tokoferol. Fosfataza  $PP_2A$  jest elementem składowym kompleksu białkowego PKC i to ona jest celem  $\alpha$ -tokoferolu [100]. Wykazano, że tokoferole przez hamowanie aktywności PKC wpływają na obniżenie proliferacji komórkowej różnych nowotworów [15,44,84].

Fosfolipaza A2 i cyklooksygenaza 2 są enzymami uczestniczącymi w syntezie mediatorów procesu zapalnego. PLA2 katalizuje hydrolizę fosfolipidów błon komórkowych do kwasu arachidonowego będącego substratem do syntezy eikozanoidów. Hamowanie PLA2 przez witaminę E prowadzi do obniżenia dostępności kwasu arachidonowego, a w konsekwencji do zmniejszenia liczby czynników zapalnych [100]. Krystalizacja  $\alpha$ -tokoferolu i fosfolipazy A2 pokazała bezpośrednie wiązanie  $\alpha$ -tokoferolu do enzymu [23]. Cyklooksygenaza 2 jest enzymem biorącym udział w syntezie tromboksanów, prostacyklin i prostaglandyn, m.in. PGE2 stymulującej proliferację komórkową. Wyniki wielu badań wskazują na wzrost ekspresji COX-2 oraz wzmo-

Tabela 2. Geny regulowane przez tokoferol [5]

Gen	Droga	Linia komórkowa	Efekt
<b>Grupa 1</b>			
$\alpha$ -TTP		wątroba	$\uparrow$ $\alpha$ T, $\delta$ T
Cytochrom P-450	PXR/RXR	HepG2	$\uparrow$ $\beta$ T, $\gamma$ T, $\delta$ T
<b>Grupa 2</b>			
Receptor CD36		komórki mięśni gładkich, monocyty/makrofagi	$\downarrow$ $\alpha$ T
Receptor SR-BI		monocyty/makrofagi	$\downarrow$ $\alpha$ T
Receptor SR-AI/II		monocyty/makrofagi	$\downarrow$ $\alpha$ T
<b>Grupa 3</b>			
Tropomiozyna		komórki mięśni gładkich	$\uparrow$ $\alpha$ T
Kolagen a 1(1)	ARE	komórki gwiaździste wątroby	$\downarrow$ $\alpha$ T
MMP-1	PKC	fibroblasty	$\downarrow$ $\alpha$ T
MMP-19	PKC	THP-HL-60	$\downarrow$ $\alpha$ T
<b>Grupa 4</b>			
E-selektyna	NF- $\kappa$ B	komórki ludzkiego śródbłónka	$\downarrow$ $\alpha$ T
ICAM-1		keratynocyty, neutrofile, monocyty, komórki śródbłónka	$\downarrow$ $\alpha$ T
VCAM-1		monocyty THP-1	$\downarrow$ $\alpha$ T
Integryny		ludzkie komórki erytroleukemii	$\downarrow$ $\alpha$ T
Glikoproteina IIb	PKC		$\downarrow$ $\alpha$ T
CTGF	TGF- $\beta$ -RE	komórki mięśni gładkich, fibroblasty	$\uparrow$ $\alpha$ T
IL-2		mysie limfocyty T	$\uparrow$ $\alpha$ T
IL-4	NF- $\kappa$ B, AP1	ludzkie limfocyty T	$\downarrow$ $\alpha$ T
IL-1 $\beta$	NF- $\kappa$ B	monocyty THP-1, neutrofile	$\downarrow$ $\alpha$ T
<b>Grupa 5</b>			
Cyklina D1		DU-145	$\downarrow$ $\alpha$ T, $\gamma$ T
Cyklina E		DU-145	$\downarrow$ $\alpha$ T, $\gamma$ T,
Bcl2-L1		wątroba	$\uparrow$ $\alpha$ T
P27		LNCaP, PC-3	$\uparrow$ $\alpha$ T
CD95L	NF- $\kappa$ B, AP1	limfocyty T	$\downarrow$ $\alpha$ T
PPAR $\gamma$		SW480	$\downarrow$ $\alpha$ T, $\gamma$ T,

$\alpha$ T –  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ T –  $\beta$ -tokoferol,  $\gamma$ T –  $\gamma$ -tokoferol,  $\delta$ T –  $\delta$ -tokoferol;  
 $\uparrow$  – wzrost ekspresji genu;  $\downarrow$  – spadek ekspresji genu

zone wytwarzanie prostaglandyn w nowotworach pochodzenia nabłonkowego, szczególnie w raku jelita grubego [35,68]. Wzrost COX-2 wiązany jest także ze zwiększonym ryzykiem angiogenezy i metastazy [59]. Wykazano, że aktywność COX-2 jest bezpośrednio hamowana przez  $\alpha$ -tokoferol, przy czym nie jest to rezultatem zmiany ekspresji białka lub dostępności substratu [51,52,68]. W badaniach *in vitro* wykazano, że  $\alpha$ -tokoferol aktywuje PP<sub>2</sub>A w mysich komórkach mikrogleju BV-2, przez co wycisza aktywowaną lipopolisacharydami (LPS) drogę sygnałową PKC/ERK/NF- $\kappa$ B, a w rezultacie powoduje obniżenie syntezy COX-2. Badania te wskazują, że  $\alpha$ -tokoferol mógłby spowalniać drogi związane z ostrym lub chronicznym stanem zapalnym w ośrodkowym układzie nerwowym [34].

Witamina A może również modulować transkrypcję genów za pośrednictwem dwóch klas jądrowych receptorów retinoidów: RAR (retinoic acid receptors) i RXR (retinoid X receptors). Receptory te należą do czynników transkrypcyjnych, których aktywność jest regulowana przez wiązanie ligandu. RAR ma zdolność wiązania zarówno kwasu 9-cis-retinowego jak i trans-retinowego, a RXR wykazuje powinowactwo tylko do kwasu 9-cis retinowego. Receptory te tworzą heterodimery RAR/RXR lub homodimery RXR/RXR, które nawet w niezligandowanej postaci wiążą się ze swoistymi sekwencjami regulatorowymi – RARE (retinoic acid response element) w regionach promotorowych genów [64]. RXR jest również zdolny do tworzenia heterodimerów z innymi receptorami jądrowymi, takimi jak: receptory hormonu tarczycy, receptory witaminy D, receptory PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), receptory z niepoznanymi dotąd ligandami, określane mianem receptorów sierocych [89]. Receptory RAR i RXR oddziałując na miejsca promotorowe niektórych genów, mogą mieć istotny wpływ na hamowanie rozwoju nowotworów. W komórkach różnych typów nowotworów wykazano obniżenie ekspresji lub aktywności tych receptorów [91].

Również karotenoidy regulują ekspresję różnych genów m.in. genu koneksyny 43 (Cx43), białka budującego koneksyny. Koneksyny to kompleksy białkowe tworzące złącza komunikacyjne między komórkami, tzw. GJC (gap junction communication) [10]. W komórkach nowotworowych istnieje niedobór tego rodzaju połączeń, umożliwiających komunikację międzykomórkową. Powoduje to zakłócenia w przekazywaniu informacji, a to może prowadzić do nadmiernego rozrostu i namnażania się komórek. Karotenoidy zwiększając poziom koneksyny 43 wzmacniają komunikację międzykomórkową, przez co mogą ograniczać transformację nowotworową [94,99]. Karotenoidy mogą też obniżać aktywność receptorów IGF (insulin-like growth factor), które regulują wielkość i strukturę komórek, wpływając na proces formowania guza nowotworowego [63]. Wykazano, że  $\alpha$ -karoten może hamować transkrypcję genu *N-myc*, zatrzymując komórki neuroblastomy w fazie G0.  $\beta$ -karoten natomiast może stymulować transkrypcję genu oksygenazy hemowej 1 (HO-1) pełniącej rolę antyoksydantu [25]. Palozza i wsp. natomiast wykazali, że  $\beta$ -karoten w dużych stężeniach indukuje apoptozę komórek nowotworowych przez blokowanie ekspresji genu *bcl-2*, który wykazuje nadekspresję w wielu typach ludzkich nowotworów [75].

Wyniki wielu eksperymentów dowodzą, że witaminy oddziałują na czynniki transkrypcyjne, takie jak AP-1, NF- $\kappa$ B



czy p53, których aktywność i siła wiązania się z DNA jest w dużym stopniu uzależniona od zmian wewnątrzkomórkowego potencjału redoks [5,31,64].

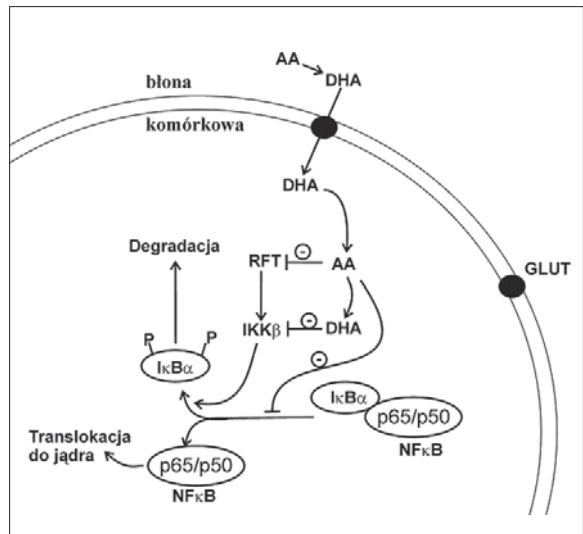
NFκB jest czynnikiem mogącym wpływać na ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek [11]. Jest on homo- lub heterodimerem składającym się z białek należących do rodziny Rel: p65 (Rel A), c-Rel, Rel B, p50, p52. W niepobudzonych komórkach NF-κB pozostaje w cytoplazmie związany z podjednostką inhibitorową IκB. Wskutek działania czynników oksydacyjnych (UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dochodzi do aktywacji kinaz IKKα i IKKβ zaangażowanych w fosforylację dwu reszt serynowych podjednostki IκBα. Jest to sygnał do ubikwitynylacji i degradacji tej podjednostki przez proteasom 26S [11,87]. Antyoksydanty, takie jak α-tokoferol czy N-acetylocysteina [2] hamują translokację NF-κB do jądra i obniżają aktywność tego czynnika.

Wykazano, że witamina C, zarówno w postaci utlenionej, jak i zredukowanej, może wpływać na aktywność czynnika NF-κB. Askorbinian jako antyoksydant zmiata wolne rodniki, przez co blokuje uruchamianą przez RFT aktywację kinazy IKKβ, jednocześnie ulegając utlenieniu do dehydroaskorbinianu. Carcamo i wsp. w badaniach *in vitro* wykazali natomiast, że kwas dehydroaskorbinowy bezpośrednio hamuje aktywność kinazy IKKβ, niezbędnej do aktywacji czynnika NF-κB [20]. W innych badaniach *in vitro* [47] na komórkach HL-60 (linia ludzkich komórek ostrej białaczki) wykazano, że kwas L-askorbinowy hamuje degradację inhibitora IκBα i translokację podjednostki p65 do jądra komórkowego, jednak bezpośrednio nie wpływa na wiązanie czynnika NF-κB do DNA. Ponadto stwierdzono, że kwas askorbinowy powoduje obniżenie ekspresji COX-2, której promotor ma miejsce wiązania dla NF-κB. Badania te sugerują, że przeciwnowotworowa aktywność witaminy C może być związana z hamowaniem aktywności NF-κB i ekspresji COX-2 [47].

Wyniki badań dotyczące wpływu witaminy A na NF-κB są rozbieżne. Niektóre badania wskazują, że karotenoidy mogą stymulować aktywność tego czynnika transkrypcyjnego [76]. W innych eksperymentach natomiast wykazano zdolność pochodnych witaminy A do stymulowania receptorów RXR, które mogą hamować tworzenie się kompleksu NF-κB/DNA [67].

AP-1 jest kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym wrażliwym na stan redoks komórki. Jego aktywność jest indukowana np. przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> czy UV. AP-1 reguluje ekspresję genów związanych ze wzrostem i różnicowaniem komórek. AP-1 jest homo- lub heterodimerem złożonym z białek Jun (c-Jun, JunB, JunD) i Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2), przy czym podjednostki Fra-1 i Fra-2 nie mają aktywności transkrypcyjnej [90]. Czynniki AP-1 jest aktywowany przez fosforylację podjednostek, co zwiększa siłę wiązania tego czynnika do DNA. Za fosforylację odpowiadają kinazy białkowe, m.in. N-końcowa kinaza c-Jun (JNK) [55].

Istnieją dane literaturowe wskazujące na udział witaminy C w regulacji tego czynnika. W badaniach, w których keratynocyty inkubowano z dużymi dawkami witaminy C, a następnie naświetlano promieniami UVB zaobserwowano wzrost ekspresji *fra-1*. Obecność białka Fra-1 w kom-



Ryc. 5. Schemat wpływu witaminy C na aktywność czynnika NFκB (zmodyfikowano wg: [20])

pleksie AP-1 powoduje utratę jego aktywności. Wykazano ponadto, że witamina C hamuje aktywność JNK, a w konsekwencji fosforylację c-Jun [22].

W wypadku witaminy A i karotenoidów zaobserwowano, że mogą mieć stymulujący wpływ na poziom AP-1. W doświadczeniu na fretkach eksponowanych na działanie dymu tytoniowego stwierdzono, że bardzo duże dawki β-karotenu zwiększają ekspresję genów *c-jun* i *c-fos* [95]. Natomiast Borrás i wsp. [14] w badaniach na szczurach wykazali, że spożywanie pokarmu pozbawionego witaminy A obniża ekspresję *c-jun*, w wyniku czego zmniejsza się poziom AP-1 stymulującego komórkę do proliferacji. Zauważono ponadto wzrost stężenia białka p53 odgrywającego główną rolę w apoptozie i hamowaniu przejścia do fazy S cyklu komórkowego. c-Jun wstrzymuje bowiem transkrypcję genu *p53* wiążąc się do jednego z miejsc promotorowych. Obserwowano również podwyższone stężenie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, inhibitora kinaz cyklinozależnych, które utrzymuje komórkę w fazie G1. U zwierząt z deficytem witaminy A obserwowano więc zatrzymanie cyklu komórkowego. Natomiast u szczurów, którym przez 5 dni podawano witaminę A w bardzo dużych dawkach, wykazano obniżenie poziomu p53 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, przy jednoczesnej nadekspresji *c-jun* i wzroście poziomu cykliny D1 stymulującej komórkę do przejścia z fazy G1 do fazy S [14]. Badania te mogą sugerować, że farmakologiczne wzbogacanie diety dużymi dawkami witaminy A może zwiększać ryzyko onkogenezy.

## PODSUMOWANIE

Udział witamin antyoksydacyjnych w procesie powstawania nowotworu może być związany nie tylko z ich bezpośrednim uczestnictwem w reakcjach wolnorodnikowych, ale również z wpływem na przekazywanie sygnałów komórkowych, aktywność enzymów czy ekspresję genów uczestniczących np. w procesach apoptozy i naprawy DNA.

Z tego krótkiego przeglądu literatury wynika, że farmakologiczne uzupełnianie niedoborów witamin antyoksy-



dacyjnych zwykle skutkuje podniesieniem poziomu tych związków w osoczu, ale nie zawsze wpływa na obniżenie poziomu oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych w DNA. Powszechnie wiadomym jest, że niedobór witamin jest szkodliwy dla organizmu, jednak ich nadmiar może również prowadzić do niepożądanych skutków. Znacznie bardziej jednoznacznych wyników dostarczyły badania, w których oceniano wpływ regularnego spożywania produktów bogatych w witaminy i inne związki o działaniu antyoksydacyjnym. Zmniejszenie poziomu uszkodzeń DNA obserwowano w przypadku spożywania soku z marchwi [78] i owoców kiwi [26], a zwiększoną odporność leukocytów na działanie nadtlenu wodoru po spo-

żywaniu przecieru pomidorowego [79] i homogenizowanych owocach kiwi [27].

W profilaktyce i wspomaganiu leczenia nowotworów powinna więc znaleźć zastosowanie dieta bogata w owoce i warzywa zawierające nie tylko naturalne witaminy, ale wiele innych skutecznych antyoksydantów, takich jak np.: flawonoidy czy antocyjany.

#### PODZIĘKOWANIA

Panu prof. dr hab. Ryszardowi Olińskiemu dziękujemy za opiekę i cenne uwagi podczas pisania tej pracy.

#### PIŚMIENICTWO

- [1] Abate A., Yang G., Dennery P.A., Oberle S., Schroder H.: Synergistic inhibition of cyclooxygenase-2 expression by vitamin E and aspirin. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 29: 1135–1142
- [2] Allen R.G., Tresini M.: Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 28: 463–499
- [3] Ames B.N., Wakimoto P.: Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 694–704
- [4] Astley S., Langrish-Smith A., Southon S., Sampson M.: Vitamin E supplementation and oxidative damage to DNA and plasma LDL in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1626–1631
- [5] Azzi A., Gysin R., Kempna P., Munteanu A., Villacorta L., Visarius T., Zingg J.M.: Regulation of gene expression by alpha-tocopherol. *Biol. Chem.*, 2004; 385: 585–591
- [6] Barber T., Borrás E., Torres L., García C., Cabezuolo F., Lloret A., Pallardo F.V., Vina J.R.: Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 29: 1–7
- [7] Baron J.A., Cole B.F., Mott L., Haile R., Grau M., Church T.R., Beck G.J., Greenberg E.R.: Neoplastic and antineoplastic effects of beta-carotene on colorectal adenoma recurrence: results of a randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003; 95: 717–722
- [8] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003
- [9] Benhar M., Engelberg D., Levitzki A.: ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep.*, 2002; 3: 420–425
- [10] Bertram J.S., Vine A.L.: Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1740: 170–178
- [11] Bharti A.C., Aggarwal B.B.: Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 64: 883–888
- [12] Bianchini F., Elmstahl S., Martinez-Garcia C., van Kappel A.L., Douki T., Cadet J., Ohshima H., Riboli E., Kaaks R.: Oxidative DNA damage in human lymphocytes: correlations with plasma levels of alpha-tocopherol and carotenoids. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 321–324
- [13] Borek C.: Dietary antioxidants and human cancer. *Integr. Cancer Ther.*, 2004; 3: 333–341
- [14] Borrás E., Zaragoza R., Morante M., García C., Gimeno A., Lopez-Rodas G., Barber T., Miralles V.J., Vina J.R., Torres L.: *In vivo* studies of altered expression patterns of p53 and proliferative control genes in chronic vitamin A deficiency and hypervitaminosis. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 1493–1501
- [15] Breyer I., Azzi A.: Differential inhibition by alpha- and beta-tocopherol of human erythroleukemia cell adhesion: role of integrins. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30: 1381–1389
- [16] Brune B.: The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2005; 7: 497–507
- [17] Burton G.W.: Vitamin E: molecular and biological function. *Proc. Nutr. Soc.*, 1994; 53: 251–262
- [18] Campbell J.K., Canene-Adams K., Lindshield B.L., Boileau T.W., Clinton S.K., Erdman J.W. Jr.: Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. *J. Nutr.*, 2004; 134: 3486S–3492S
- [19] Campbell S.E., Stone W.L., Whaley S.G., Qui M., Krishnan K.: Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer*, 2003; 3: 25
- [20] Carcamo J.M., Pedraza A., Borquez-Ojeda O., Zhang B., Sanchez R., Golde D.W.: Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits IkappaBalpha kinase beta. *Mol. Cell Biol.*, 2004; 24: 6645–6652
- [21] Catani M.V., Costanzo A., Savini I., Levrero M., de Laurenzi V., Wang J.Y., Melino G., Avigliano L.: Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochem. J.*, 2002; 364: 441–447
- [22] Catani M.V., Rossi A., Costanzo A., Sabatini S., Levrero M., Melino G., Avigliano L.: Induction of gene expression via activator protein-1 in the ascorbate protection against UV-induced damage. *Biochem. J.*, 2001; 356: 77–85
- [23] Chandra V., Jasti J., Kaur P., Betzel C., Srinivasan A., Singh T.P.: First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 2002; 320: 215–222
- [24] Claycombe K.J., Meydani S.N.: Vitamin E and genome stability. *Mutat. Res.*, 2001; 475: 37–44
- [25] Collins A.R.: Carotenoids and genomic stability. *Mutat. Res.*, 2001; 475: 21–28
- [26] Collins A.R., Harrington V., Drew J., Melvin R.: Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 511–515
- [27] Collins B.H., Horska A., Hotten P.M., Riddoch C., Collins A.R.: Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and *in vitro*. *Nutr. Cancer*, 2001; 39: 148–153
- [28] Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroğlu M., Lunec J.: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 2003; 17: 1195–1214
- [29] Cooke M.S., Evans M.D., Podmore I.D., Herbert K.E., Mistry N., Mistry P., Hickenbotham P.T., Hussieni A., Griffiths H.R., Lunec J.: Novel repair action of vitamin C upon *in vivo* oxidative DNA damage. *FEBS Lett.*, 1998; 439: 363–367
- [30] Cooke M.S., Mistry N., Ahmad J., Waller H., Langford L., Bevan R.J., Evans M.D., Jones G.D., Herbert K.E., Griffiths H.R., Lunec J.: Deoxycytidine glyoxal: lesion induction and evidence of repair following vitamin C supplementation *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 34: 218–225
- [31] Duarte T.L., Lunec J.: Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic. Res.*, 2005; 39: 671–686
- [32] Duthie S.J., Ma A., Ross M.A., Collins A.R.: Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.*, 1996; 56: 1291–1295
- [33] Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G.: The carotenoids as anti-oxidants – a review. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1997; 41: 189–200
- [34] Egger T., Hammer A., Wintersperger A., Goti D., Malle E., Sattler W.: Modulation of microglial superoxide production by alpha-tocopherol *in vitro*: attenuation of p67(phox) translocation by a protein phosphatase-dependent pathway. *J. Neurochem.*, 2001; 79: 1169–1182





- [35] Eisinger A.L., Prescott S.M., Jones D.A., Stafforini D.M.: The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2007; 82: 147–154
- [36] Evans M.D., Dizdaroğlu M., Cooke M.S.: Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.*, 2004; 567: 1–61
- [37] Fenech M., Dreosti L., Aitken C.: Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*, 1997; 18: 359–364
- [38] Foksinski M., Gackowski D., Rozalski R., Siomek A., Guz J., Szpila A., Dziaman T., Olinski R.: Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. *Eur. J. Nutr.*, 2007; 46: 174–180
- [39] Foksinski M., Kotzbach R., Szymanski W., Olinski R.: The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 29: 597–601
- [40] Fraga C.G., Motchnik P.A., Shigenaga M.K., Helbock H.J., Jacob R.A., Ames B.N.: Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 11003–11006
- [41] Gackowski D., Banaszkiwicz Z., Rozalski R., Jawien A., Olinski R.: Persistent oxidative stress in colorectal carcinoma patients. *Int. J. Cancer*, 2002; 101: 395–397
- [42] Garg A., Aggarwal B.B.: Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*, 2002; 16: 1053–1068
- [43] Goodman M.T., Hernandez B., Wilkens L.R., Lee J., Le Marchand L., Liu L.Q., Franke A.A., Kucuk O., Hsu T.C.: Effects of beta-carotene and alpha-tocopherol on bleomycin-induced chromosomal damage. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7: 113–117
- [44] Gysin R., Azzi A., Visarius T.: Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J.*, 2002; 16: 1952–1954
- [45] Halliwell B.: Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem. Sci.*, 1999; 24: 255–259
- [46] Halliwell B.: Vitamin C and genomic stability. *Mutat. Res.*, 2001; 475: 29–35
- [47] Han S.S., Kim K., Hahn E.R., Lee S.J., Surh Y.J., Park H.K., Kim W.S., Jung C.W., Lee M.H., Park K., Yang J.H., Yoon S.S., Riordan N.H., Riordan H.D., Kimler B.F., Park C.H., Lee J.H., Park S.: L-ascorbic acid represses constitutive activation of NF-kappaB and COX-2 expression in human acute myeloid leukemia, HL-60. *J. Cell Biochem.*, 2004; 93: 257–270
- [48] Heber D.: Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *J. Postgrad. Med.*, 2004; 50: 145–149
- [49] Jaruga P., Jaruga B., Gackowski D., Olczak A., Halota W., Pawlowska M., Olinski R.: Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV-infected patients. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 32: 414–420
- [50] Jenkinson A.M., Collins A.R., Duthie S.J., Wahle K.W., Duthie G.G.: The effect of increased intakes of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on DNA damage in human lymphocytes. *FASEB J.*, 1999; 13: 2138–2142
- [51] Jiang Q., Ames B.N.: Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J.*, 2003; 17: 816–822
- [52] Jiang Q., Christen S., Shigenaga M.K., Ames B.N.: Gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; 74: 714–722
- [53] Jiang Q., Elson-Schwab I., Courtemanche C., Ames B.N.: Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 11494–11499
- [54] Kempna P., Zingg J.M., Ricciarelli R., Hierl M., Saxena S., Azzi A.: Cloning of novel human SEC14p-like proteins: ligand binding and functional properties. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 34: 1458–1472
- [55] Klaunig J.E., Kamendulis L.M.: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004; 44: 239–267
- [56] Krinsky N.I., Johnson E.J.: Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 2005; 26: 459–516
- [57] Landes N., Pfluger P., Kluth D., Birringer M., Ruhl R., Bol G.F., Glatt H., Brigelius-Flohe R.: Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 65: 269–273
- [58] Lee B.M., Lee S.K., Kim H.S.: Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett.*, 1998; 132: 219–227
- [59] Li G., Yang T., Yan J.: Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 299: 886–890
- [60] Lunec J., Holloway K.A., Cooke M.S., Faux S., Griffiths H.R., Evans M.D.: Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair *in vivo*? *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 875–885
- [61] Mares-Perlman J.A., Millen A.E., Fieck T.L., Hankinson S.E.: The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. *Overview. J. Nutr.*, 2002; 132: 518S–524S
- [62] Mayne S.T.: Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.*, 1996; 10: 690–701
- [63] McCullough M.L., Giovannucci E.L.: Diet and cancer prevention. *Oncogene*, 2004; 23: 6349–6364
- [64] Mehta K.: Retinoids as regulators of gene transcription. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2003; 17: 1–12
- [65] Milde-Langosch K.: The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur. J. Cancer*, 2005; 41: 2449–2461
- [66] Moszczyński P., Pyć R.: *Biochemia witamin. Część II: Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999
- [67] Na S.Y., Kang B.Y., Chung S.W., Han S.J., Ma X., Trinchieri G., Im S.Y., Lee J.W., Kim T.S.: Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7674–7680
- [68] O'Leary K.A., Pascual-Teresa S., Needs P.W., Bao Y.P., O'Brien N.M., Williamson G.: Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.*, 2004; 551: 245–254
- [69] Olinski R., Gackowski D., Foksinski M., Rozalski R., Roszkowski K., Jaruga P.: Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 192–200
- [70] Olinski R., Gackowski D., Rozalski R., Foksinski M., Bialkowski K.: Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat. Res.*, 2003; 531: 177–190
- [71] Omenn G.S., Goodman G., Thornquist M., Grizzle J., Rosenstock L., Barnhart S., Balmes J., Cherniack M.G., Cullen M.R., Glass A.: The beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers. *Cancer Res.*, 1994; 54: 2038s–2043s
- [72] Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M.: Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2003; 22: 18–35
- [73] Palace V.P., Khaper N., Qin Q., Singal P.K.: Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 26: 746–761
- [74] Palacios A., Piergiacomi V.A., Catala A.: Inhibition of lipid peroxidation of microsomes and mitochondria by cytosolic proteins from rat liver: effect of vitamin A. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1999; 69: 61–63
- [75] Palozza P., Calviello G., Serini S., Maggiano N., Lanza P., Ranelli F.O., Bartoli G.M.: Beta-carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30: 1000–1007
- [76] Palozza P., Serini S., Torsello A., Di Nicuolo F., Piccioni E., Ubaldi V., Pioli C., Wolf F.L., Calviello G.: Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. *J. Nutr.*, 2003; 133: 381–388
- [77] Podmore I.D., Griffiths H.R., Herbert K.E., Mistry N., Mistry P., Lunec J.: Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 1998; 392: 559
- [78] Pool-Zobel B.L., Bub A., Muller H., Wollowski I., Rechkemmer G.: Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 1997; 18: 1847–1850
- [79] Porrini M., Riso P.: Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *J. Nutr.*, 2000; 130: 189–192
- [80] Prieme H., Loft S., Nyyssonen K., Salonen J.T., Poulsen H.E.: No effect of supplementation with vitamin E, ascorbic acid, or coenzyme Q10 on oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997; 65: 503–507
- [81] Prottigente A.R., England T.G., Rice-Evans C.A., Halliwell B.: Iron supplementation and oxidative damage to DNA in healthy individuals with high plasma ascorbate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 288: 245–251

- [82] Proeggente A.R., Rehman A., Halliwell B., Rice-Evans C.A.: Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect *in vivo*? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 277: 535–540
- [83] Rehman A., Collis C.S., Yang M., Kelly M., Diplock A.T., Halliwell B., Rice-Evans C.: The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 246: 293–298
- [84] Ricciarelli R., Zingg J.M., Azzi A.: Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *FASEB J.*, 2001; 15: 2314–2325
- [85] Satchek J.M., Milbury P.E., Cannon J.G., Roubenoff R., Blumberg J.B.: Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 34: 1575–1588
- [86] Schneider C.: Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005; 49: 7–30
- [87] Schoonbroodt S., Piette J.: Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60: 1075–1083
- [88] Sen C.K., Khanna S., Roy S.: Tocotrienol: the natural vitamin E to defend the nervous system? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004; 1031: 127–142
- [89] Sharoni Y., Danilenko M., Dubi N., Ben Dor A., Levy J.: Carotenoids and transcription. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004; 430: 89–96
- [90] Shen G., Jeong W.S., Hu R., Kong A.N.: Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2005; 7: 1648–1663
- [91] Soprano K.J., Soprano D.R.: Retinoic acid receptors and cancer. *J. Nutr.*, 2002; 132: 3809S–3813S
- [92] Thompson T.A., Wilding G.: Androgen antagonist activity by the antioxidant moiety of vitamin E, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol in human prostate carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2003; 2: 797–803
- [93] Venkateswaran V., Fleshner N.E., Klotz L.H.: Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. *J. Urol.*, 2002; 168: 1578–1582
- [94] Vine A.L., Leung Y.M., Bertram J.S.: Transcriptional regulation of connexin 43 expression by retinoids and carotenoids: similarities and differences. *Mol. Carcinog.*, 2005; 43: 75–85
- [95] Wang X.D., Liu C., Bronson R.T., Smith D.E., Krinsky N.I., Russell M.: Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999; 91: 60–66
- [96] Wilson J.X.: Regulation of vitamin C transport. *Annu. Rev. Nutr.*, 2005; 25: 105–125
- [97] Yamauchi J., Iwamoto T., Kida S., Masushige S., Yamada K., Esashi T.: Tocopherol-associated protein is a ligand-dependent transcriptional activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 285: 295–299
- [98] Young A.J., Lowe G.: Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001; 385: 20–27
- [99] Zhang L.X., Cooney R.V., Bertram J.S.: Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res.*, 1992; 52: 5707–5712
- [100] Zingg J.M., Azzi A.: Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11: 1113–1133

