

Received: 2005.08.22  
Accepted: 2005.11.30  
Published: 2005.12.20

## Kwas protokatechowy w prewencji nowotworów\*

### Protocatechuic acid in cancer prevention

Justyna Szumiło

Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej im. prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie

#### Streszczenie

Kwas protokatechowy (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy) jest naturalnym polifenolem występującym w wielu roślinach jadalnych i leczniczych. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują, że może on znaleźć zastosowanie w profilaktyce chorób układu krążenia oraz nowotworów. Mechanizm działania kwasu protokatechowego opiera się na właściwościach przeciwutleniających, tj. hamowaniu generacji wolnych rodników, zdolności do ich zmiatania oraz zwiększania aktywności katalitycznej endogennych enzymów uczestniczących w neutralizacji wolnych rodników. Duże znaczenie ma także wpływ kwasu protokatechowego na aktywność enzymów zaangażowanych w I i II etap biotransformacji niektórych karcynogenów oraz prawdopodobnie bezpośrednie blokowanie miejsc swoistego wiązania zmetabolizowanych karcynogenów z cząsteczką DNA, co zapobiega tworzeniu adduktów, które mogą być przyczyną mutacji i transformacji nowotworowej. Jednak inne aspekty chemioprewencyjnego działania kwasu, np. wpływ na aktywność postaci indukowanych cyklooksygenazy i syntazy tlenu azotu oraz białek regulujących przebieg cyklu komórkowego są słabo poznane.

#### Słowa kluczowe:

**kwas protokatechowy • chemioprewencja • nowotworzenie • przeciwutleniacz • cytochrom P-450 • enzymy II etapu biotransformacji • proliferacja • apoptoza**

#### Summary

Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid) is a natural phenolic compound found in many edible and medicinal plants. Recent studies indicate that it could be used as a protective agent against cardiovascular diseases and neoplasms. The mechanism of its action is mostly associated with antioxidant activity, including inhibition of generation as well as scavenging of free radicals and up-regulating enzymes which participate in their neutralization. The influence on phase I and II of some carcinogens' metabolism and, perhaps, direct blocking of specific binding sites of ultimate carcinogens with DNA molecule, thus preventing adduct formation that may result in mutations and neoplastic transformation, are also important. However, the other aspects of the chemopreventive activity of protocatechuic acid including influence on the activity of inducible isoenzyme of cyclooxygenase and nitric oxide synthase or cell cycle regulating proteins are not fully evaluated.

#### Key words:

**protocatechuic acid • chemoprevention • carcinogenesis • antioxidant • cytochrome P-450 • phase II enzymes • proliferation • apoptosis**

\*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, grant nr 2 P05A 136 29.



**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/8546.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8546.pdf)

**Word count:** 3354

**Tables:** 1

**Figures:** 1

**References:** 61

**Adres autorki:** dr med. Justyna Szumilo, Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej AM w Lublinie, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin; e-mail: jszumilo@wp.pl

**Wykaz skrótów:** **AOM** – azoksymetan; **AP-1** – czynnik transkrypcyjny 1 (activator protein 1); **BBN** – *N*-butylo-*N*-(4-hydroksybutylo)-nitrozoamina; **BOP** – *N*-nitrozo-bis(2-oksypropylo)amina; **COX-2** – izoenzym indukowany cyklooksigenazy; **DEN** – dietylonitrozoamina; **DMBA** – 7,12-dimetylobenzo[ $\alpha$ ]antracen; **DP** – białka wiążące czynniki transkrypcyjne z rodziny E2F; **E2F** – czynnik transkrypcyjny E2F; **GSH** – postać zredukowana glutationu; **GSSG** – postać utleniona glutationu; **GST** – transferaza S-glutationowa; **I $\kappa$ B $\alpha$**  – białko hamujące czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B; **iNOS** – izoenzym indukowany syntazy tlenu azotu; **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (mitogen-activated protein kinases); **MC** – 3-metylocholanren; **MNNG** – *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna; **NADPH** – postać zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; **NF- $\kappa$ B** – czynnik transkrypcyjny kappa B (nuclear factor kappa B); **NNK** – 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon; **4-NQO** – tlenek 4-nitrocholinoliny; **NQO1** – oksydoreduktaza NAD(P)H: chinonowa; **PCA** – kwas protokatechowy; **PhIP** – 2-amino-1-metylo-6-feniloimidazo[4,5-*b*] pirydyna; **Rb** – produkt białkowy genu supresorowego *Retinoblastoma*; **RFA** – reaktywne formy azotu; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **t-BHP** – wodoronadtlenek *t*-butyloowy; **TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ); **TNFR1** – receptor 1 czynnika martwicy nowotworów (tumor necrosis factor receptor 1); **TPA** – 12-*O*-tetradekanoilo-13-acetylo-forbol; **UDPGT** – UDP-glukuronozylotransferaza.

Kwas protokatechowy (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, PCA; ryc.1) jest związkiem fenolowym szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Podobnie jak wiele innych prostych kwasów fenolowych jest wykrywany niemal we wszystkich roślinach. Stanowi zatem bardzo częsty składnik ludzkiej diety [24]. Występuje m.in. w otrębach i ziarnach brązowego ryżu (*Oryza sativa* L.) (trawy) [10] oraz w cebuli kuchennej (*Allium cepa* L.) (liliowate) [7], zwłaszcza w łuskach. Jest wykrywany w wielu owocach m.in. sliwy domowej (*Prunus domestica* L.) (różowate) [15], agrestu (*Ribes uva-crispa* L.) (agrestowate) [7], winorośli właściwej (*Vitis vinifera*) (winoroślowate) [21] oraz orzechach np. migdałowca zwyczajnego (*Prunus amygdalus*) (różowate) [40]. Jest on obecny w produktach pochodzenia roślinnego, np. oliwie z oliwek czy w białym winie [27,28,43]. PCA występuje także w licznych roślinach, przyprawowych np. w anyżu gwiazdkowym (*Illicium verum*) (badianowate), melisie lekarskiej (*Melissa officinalis* L.) (wargowe), rozmarynie lekarskim (*Rosmarinus officinalis* L.) (wargowe) i cynamonowcu (*Cinnamomum aromaticum*) (wawrzynowate) [7]. Stanowi jeden z biologicznie czynnych składników niektórych roślin leczniczych, w tym stosowanych w medycynie naturalnej, takich jak np. malwa sudańska (*Hibiscus sabdariffa* L.) (ślazowate) [51], miłorząb japoński (*Ginkgo biloba* L.) (miłorzębowate) [4] i dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum* L.) (dziurawcowate) [12].

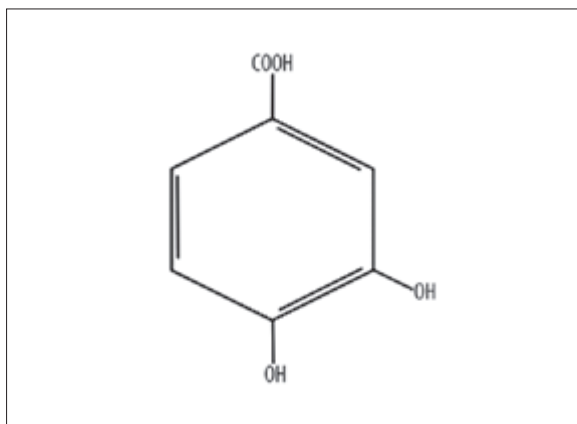
W latach dziewięćdziesiątych XX w., w oparciu o wyniki badań nad chemicznie indukowaną karcynogenezą u zwierząt doświadczalnych wykazano chemioprewencyjne właściwości PCA [31,48].

## MECHANIZMY DZIAŁANIA PCA

### Wpływ PCA na równowagę redoks w komórkach

Chemioprewencyjne działanie PCA w znacznej mierze jest wynikiem przeciwutleniających własności tej substancji. Reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu (RFA), powstające na skutek ekspozycji na chemiczne karcynogeny środowiskowe i promieniowanie ultrafioletowe lub w przebiegu fizjologicznych procesów metabolicznych mogą uszkadzać lub modyfikować makrocząsteczki, tj. kwasy nukleinowe, białka strukturalne i enzymatyczne oraz lipidy błonowe. Może to prowadzić m.in. do powstania mutacji oraz zaburzeń na szlakach sygnałowych w komórce, a w konsekwencji do rozwoju nowotworu. Wykazano, że RFT i RFA mogą wpływać na każdy etap karcynogenezy, od fazy inicjacji do fazy promocji/progresji [17].

Działanie antyoksydacyjne PCA jest dobrze udokumentowane. Badania *in vitro* na bezkomórkowych systemach generacji RFT wykazały, że PCA hamuje zarówno powstawanie wolnych rodników, w tym wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego, a także jest zmiataczem wolnych rodników [16,25,26,27,41,55,56,57,59,60]. Hamowanie powstawania rodników jest związane ze zdolnością kwasu do tworzenia kompleksów z jonami metali przejściowych Cu(II) i Fe(II) lub obniżaniem aktywności enzymów katalizujących reakcje, w przebiegu których powstają takie rodniki, jak np. oksydazy ksantynowej (EC 1.2.3.2) [23,25,56,60]. Neutralizacja wolnych rodników jest natomiast wynikiem ich reakcji z grupami hydroksylowymi kwasu. Na wspomnianych modelach *in vitro* PCA zapo-



Ryc. 1. Wzór strukturalny kwasu protokatechowego

biegał oksydacyjnym uszkodzeniom DNA oraz peroksydacji lipidów [25,26,43,56,60].

Przeciwtleniające działanie PCA obserwowano również w badaniach *in vitro* na hodowlach komórkowych w warunkach stresu oksydacyjnego [28,51,53,57]. PCA hamował generację anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru przez szczurze komórki przypominające makrofagi J774 A.1, utleniające lipoproteiny o małej gęstości [28]. Normalizował także stężenie glutationu zredukowanego (GSH), będącego wraz ze swoją postacią utlenioną (GSSG) najważniejszym wewnątrzkomórkowym buforem redoks oraz przywracał aktywność związanych z nim enzymów – peroksydazy (EC 1.11.1.9) i reduktazy glutationowej (EC 1.6.4.2). PCA zwiększał również poziom mRNA tych enzymów oraz syntazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej (EC 6.3.2.2). Pierwszy z enzymów katalizuje reakcję między GSH a nadtlenukiem wodoru, w wyniku której powstaje GSSG i woda, drugi odtwarza GSH kosztem utlenienia NADPH. Syntaza  $\gamma$ -glutamylcysteinowa katalizuje natomiast pierwszy etap syntezy glutationu w cyklu  $\gamma$ -glutamylowym [38].

PCA w stężeniach odpowiednio 0,02–0,1 mg/ml oraz 50–100 mg/kg m.c. zapobiegał także niepożądanym konsekwencjom stresu oksydacyjnego w hodowli pierwotnej szczurzych hepatocytów oraz w wątrobie szczurów ekspozowanych *in vivo* na wodoronadtlenek t-butyłowy (t-BHP) [23,53]. Wykazano, że PCA obniżał cytotoksyczność t-BHP i podnosił poziom GSH. Hamował również peroksydację lipidów, procesy naprawy DNA – indukowane przez oksydacyjne uszkodzenia kwasu nukleinowego oraz zapobiegał depolaryzacji błon mitochondrialnych. Stwierdzono ponadto, że PCA powodował obniżenie fosforylacji reszt tyrozynowych białek hepatocytów, co sugeruje wpływ na mechanizmy przekazywania sygnału w komórce [23]. Wiadomo, że RFT oraz jeden z produktów peroksydacji lipidów – 4-hydrokso-2-nonenal – mogą regulować fosforylację białek sygnałowych przez pobudzanie aktywności kinazy tyrozynowej [54].

PCA wpływał także na procesy zachodzące w skórze myszy szczepu CD-1, poddanych miejscowemu działaniu innego induktora stresu oksydacyjnego – 12-O-tetradekanoilo-13-acetylo-forbolu (TPA) [51]. Wykazano, że PCA w dawkach 5-20  $\mu$ M zmniejszał nasilenie zapalenia towarzyszącego podaniu TPA, hamował wytwarzanie nad-

tlenu wodoru oraz obniżał aktywność mieloperoksydazy (EC 1.11.1.7) w skórze zwierząt. Mieleloperoksydaza obecna w neutrofilach jest odpowiedzialna za utlenianie m.in. niektórych karcynogenów z udziałem nadtlenu wodoru, co odgrywa istotną rolę w ich biotransformacji.

Wartym podkreślenia jest to, że w badaniach nad uszkodzeniami oksydacyjnymi błony śluzowej okrężnicy u szczurów, PCA nie wpływał ani na poziom zmodyfikowanej zasady – 8-OH-2'-deoksyguanozyny w DNA, ani na ekspresję enzymów związanych z glutationem, tj. peroksydazy glutationowej, syntazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej oraz transferazy S-glutationowej (EC 3.1.2.7) [6].

Jednakże PCA, podobnie jak wiele innych znanych przeciwutleniaczy np. kwas askorbinowy czy  $\alpha$ -tokoferol, może w pewnych warunkach wykazywać działanie prooksydacyjne [42]. Wyniki badań wskazują, że PCA w małych stężeniach działa anti-, natomiast w dużych prooksydacyjnie [1,35,36,37]. Na liniach immortalizowanych ludzkich komórek nabłonkowych działają S-G oraz komórek raka ślinianki HSG1 wykazano, że PCA w dużych stężeniach (>10 mM) indukował stres oksydacyjny, o czym świadczyło nasilenie peroksydacji lipidów w obecności jonów Fe(II) oraz obniżenie poziomu GSH. PCA w stężeniu 2,5 nM nasilał także toksyczne działanie t-BHP [1]. Podobne obserwacje poczyniono w niektórych badaniach *in vivo*. PCA w dawce toksycznej (*i.p.* 500 mg/kg m.c.) obniżał stężenie GSH w wątrobie i nerce myszy szczepu ICR [36]. Zależny od dawki wpływ PCA został potwierdzony w zmianach zachodzących w skórze myszy po miejscowej ekspozycji na TPA [35,37]. W kilku niezależnych doświadczeniach wykazano, że PCA podany w dawkach 1600 i 20000 nM na 0,5 lub 3 godziny przed aplikacją TPA, nasilał stres oksydacyjny i stan zapalny w skórze zwierząt. Zwiększał również poziom produktów peroksydacji lipidów, wytwarzanie  $H_2O_2$ , aktywność mieloperoksydazy, obniżał zaś stężenie GSH. Zastosowany natomiast przed TPA w dawce 16 nM lub jednocześnie z TPA, ale w dużych dawkach wywierał działanie protekcyjne. Wyniki powyższych badań *in vivo* oraz *in vitro* na hodowli komórek ludzkiej białaczki promielocytarnej HL-60 sugerują, że działanie dużych dawek może być związane z utlenianiem PCA przez tyrozinazę (EC 1.14.16.2), co prowadzi do powstania bardziej reaktywnych pochodnych – prawdopodobnie chinonowych, które mogą reagować z grupami nukleofilowymi glutationu i białek. Następstwem tego jest ubytek GSH i zaburzenia komórkowych układów detoksykacyjnych, a także modyfikacje białek, które mogą indukować miejscową reakcję immunologiczną nasilającą skutki stresu oksydacyjnego.

### Wpływ PCA na metabolizm karcynogenów

Chemioprewencyjne działanie PCA może być także związane z jego wpływem na metabolizm karcynogenów. W procesie tym uczestniczą dwie grupy enzymów. Enzymy I etapu biotransformacji należą głównie do nadrodziny cytochromu P-450 i katalizują m.in. reakcje hydroksylacji. W toku tej przemiany może dochodzić do aktywacji metabolicznej prokarcynogenów, a powstałe elektrofilowe metabolity przejściowe mogą reagować z zasadami DNA i tworzyć addukty. Natomiast enzymy II etapu detoksykacji katalizują sprzężanie karcynogenów z kwasem glukuronowym, siarkowym lub z glutationem, czy też przyłączają inne grupy po-



larne w miejsce hydroksylowych. Zwiększa to rozpuszczalność tych związków w wodzie i ułatwia wydalanie. Jednak reakcje te mogą prowadzić także do aktywacji niektórych karcynogenów. Do grupy tej są zaliczane m.in. transferaza S-glutationowa (GST), UDP-glukuronozylotransferaza (UDPGT; EC 2.4.1.17) i oksydoreduktaza NAD(P)H: chinonowa (NQO1; EC 1.6.99.2) [5]. Wykazano, że PCA ma wpływ na enzymy uczestniczące zarówno w I, jak i II etapie biotransformacji karcynogenów [3,11,18,45,46].

W badaniach *in vitro* na mikrosomach hepatocytów myszy PCA hamował aktywność katalityczną niektórych izoenzymów cytochromu P-450, szczególnie CYP1A2, a w mniejszym stopniu – CYP1A1 oraz CYP2B indukowaną przez fenobarbital sodu lub 5,6-benzoflawnon [3]. W badaniach *in vivo* wykazano, że jednorazowe podanie PCA szczurom wywiera silniejszy wpływ na aktywność enzymów I i II fazy niż podawanie subchroniczne. PCA zastosowany jednorazowo u szczurów w dawce 250 lub 500 mg/kg m.c., obniżał aktywność CYP1A1, CYP1A2 i CYP2B w wątrobie, a jedynie CYP2B w mikrosomach, uzyskanych z homogenatów nerki. PCA podany na godzinę przed aplikacją *o*-toluidyny, aminy aromatycznej metabolizowanej przez CYP1A1, powodował zwiększenie aktywności CYP1A1 i CYP1A2 w wątrobie, a zwiększenie aktywności wyłącznie CYP1A1 w nerce zwierząt. PCA zwiększał także obniżoną po podaniu *o*-toluidyny, aktywność GST [46]. Natomiast PCA podawany w dawce 50 mg/kg m.c. przez 2 tygodnie szczurom eksponowanym na 3-metylocholanren (MC), powodował zmniejszenie aktywności oraz obniżenie stężenia białek CYP1A1, CYP1A2 i CYP2E1, a zwiększenie aktywności GST i NQO1 w wątrobie zwierząt [18]. PCA obniżał także aktywność konstytutywną oraz indukowaną przez MC izoenzymu CYP2E1 w nerce szczurów. Podanie samego PCA nie wpływało na zmianę aktywności izoenzymów cytochromu P-450, natomiast powodowało zmniejszenie aktywności badanych enzymów detoksykacyjnych, tj. GST, UDPGT i NQO1 w wątrobie zwierząt.

PCA podany miejscowo na skórę myszy w dawkach 8 i 16  $\mu$ M zmniejszał aktywność hydroksylazy węglowodorów aromatycznych (aktywność tę wykazuje głównie CYP1A1), a zwiększał GST, UDPGT i NQO1 [11]. Ponadto, zastosowanie PCA przed miejscową niezależną aplikacją dwóch karcynogenów – benzo[ $\alpha$ ]pirenu i 7,12-dimetylobenzo[ $\alpha$ ]antracenu (DMBA) – powodowało zahamowanie tworzenia wiązań kowalencyjnych między epoksydami benzo[ $\alpha$ ]pirenodiolu oraz DMBA, a DNA w naskórku zwierząt wraz ze zmniejszeniem liczby niektórych typów adduktów [45]. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach *in vitro* z użyciem mikrosomów hepatocytów pochodzących od szczurów poddanych działaniu MC.

Wyniki badań wskazują, że PCA nie tylko wpływa na aktywność enzymów zaangażowanych w metabolizm karcynogenów, ale także neutralizuje reaktywne metabolity pośrednie uniemożliwiając tym samym ich wiązanie z DNA. Prawdopodobnie łączenie się kwasu z zasadami DNA blokuje miejsca wiązania karcynogenów z DNA i zapobiega powstawaniu mutacji i inicjacji procesu nowotworowego [11]. Odmienny wpływ PCA na aktywność enzymów uczestniczących w biotransformacji w badanych narządach może częściowo tłumaczyć różnice w skuteczności fenolu w prewencji nowotworów w badaniach nad chemicznie indukowaną karcynogenezą u zwierząt doświadczalnych.

## Inne mechanizmy przeciwnowotworowego działania PCA

Działanie antyproliferacyjne PCA wykazywano na kilku liniach komórkowych m.in. immortalizowanych ludzkich komórkach gruczołu piersiowego HBL 100 oraz na komórkach ludzkiego raka gruczołu piersiowego T47D, gruczolakoraka żołądka MKN45, gruczolakoraka płuca PC14 i białaczki promielocytarnej HL-60 [10,13,14,19,52]. Hamowanie proliferacji komórek nabłonkowych m.in. jamy ustnej, okrężnicy i pęcherza moczowego obserwowano także na kilku modelach karcynogenezy indukowanej przez związki chemiczne u zwierząt doświadczalnych [9,39,47,50].

Działanie antyproliferacyjne PCA może być pochodną jego własności antyoksydacyjnych. Wykazano, że niektóre RFT, takie jak np. nadtlenek wodoru pełnią funkcję wtórnych przekaźników sygnału w komórce. Mogą one aktywować czynniki transkrypcyjne, takie jak NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) lub AP-1 (activator protein 1) i w ten sposób wpływać na ekspresję genów uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy [17].

Inny możliwy mechanizm antyproliferacyjnego działania PCA to wpływ na metabolizm poliamin – putrescyny, sperminy i spermidyny. Związki te ingerując w mechanizmy przekazywania sygnału w komórkach odgrywają istotną rolę w procesie ich wzrostu i różnicowania. Wykazano, że nasilają one aktywność kinazy tyrozynowej (EC 2.7.1.112), indukują kaskadę kinaz MAPK (mitogen-activated protein kinase; EC 2.7.1.37) oraz stymulują transkrypcję niektórych onkogenów np. *c-Myc*, *c-jun* lub *c-fos*. Produkty białkowe tych onkogenów pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych i mogą pobudzać proliferację komórek. Podstawowym enzymem w biosyntezie poliamin jest dekarboksylaza ornitynowa (EC 4.1.1.17), która katalizuje przemianę ornityny w putrescynę. Zwiększona aktywność enzymu obserwowano w wielu zmianach przednowotworowych i nowotworach [2]. Na niektórych modelach chemicznie indukowanej karcynogenezy u gryzoni zaobserwowano, że PCA obniżał aktywność enzymatyczną dekarboksylazy ornitynowej w narządach docelowych oraz stężenie poliamin w surowicy krwi [14,44,47,49,50].

W najnowszych badaniach stwierdzono, że PCA wpływa bezpośrednio na proces replikacji DNA. Stagos i wsp. [43] wykazali, że PCA jest silnym inhibitorem topoiizomerazy I, enzymu odpowiedzialnego za katalizowanie reakcji przecinania oraz łączenia polinukleotydowych łańcuchów DNA.

PCA wpływa także na eliminację komórek w wyniku apoptozy. Na linii ludzkiej białaczki promielocytarnej HL-60, PCA zwiększał odsetek komórek w fazie G1 cyklu i indukował apoptozę. Zwiększał także poziom nieufosforylowanego białka Rb (retinoblastoma) oraz ekspresję proapoptotycznego białka Bax. Zmniejszał natomiast poziom białka Rb o dużym stopniu fosforylacji oraz ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 [52]. Warto podkreślić, że białko Rb pełni ważną funkcję w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy. Pod koniec fazy G1, po fosforylacji białka przez kompleksy cyklina D-kinaza zależna od cykliny 4/6 i cykliny E-kinaza zależna od cykliny 2, uwolnione zostają czynniki transkrypcyjne z rodziny E2F, które po przyłączeniu białek DP wiążą się z obszarami promotorowymi genów docelowych, stymulując ich transkryp-



cję i przejście komórki w kolejną fazę cyklu. Natomiast słabo ufosforylowane białko Rb wiąże czynniki E2F, co zapobiega transkrypcji genów i zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1 [33]. Niezależnie od zatrzymania cyklu, białko Rb bezpośrednio hamuje przekazywanie sygnałów śmierci w komórce [58]. Jak podają autorzy, obserwowane po 9 godzinach od podania PCA obniżenie poziomu obu postaci białka, może być związane z nacięciem ich łańcuchów poliaminokwasowych przez kaspazy i degradacją, co w rezultacie pobudza apoptozę [52]. Ostatnie badania wykazują jednak, że niektóre spośród białek Rb o zmniejszonej cząsteczce mogą hamować apoptozę [20].

Istnieją doniesienia, że PCA przeciwdziała apoptozie inicjowanej za pośrednictwem receptorów śmierci. Na liniach ludzkich komórek śródbłonka żyły pępkowej oraz chłoniaka T-komórkowego Jurkat, PCA hamował apoptozę indukowaną przez TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) [61]. Zwiększał także aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, co było konsekwencją nasilenia degradacji białka hamującego I $\kappa$ B $\alpha$  w układzie proteosomalnym. Białko to tworzy w cytosolu kompleks z NF- $\kappa$ B, uniemożliwiający jego translokację do jądra komórkowego. Po fosforylacji I $\kappa$ B $\alpha$  przez swoistą kinazę (EC 2.7.1) uwolniony NF- $\kappa$ B przemieszcza się do jądra i łączy z elementem  $\kappa$ B w obszarach promotorowych genów docelowych w tym działających antyapoptotycznie.

PCA hamował także apoptozę hepatocytów indukowaną przez TNF- $\alpha$  w badaniach *in vivo* nad doświadczalną posocznicą u gryzoni [22,32,59]. W przebiegu posocznicy wywołanej podaniem lipopolisacharydu bakteryjnego dochodzi do uwolnienia wolnych rodników oraz licznych cytokin – mediatorów zapalenia, co prowadzi w konsekwencji do uszkodzenia wielu narządów. Wykładnikiem morfologicznym uszkodzenia wątroby w przebiegu wstrząsu endotoksycznego jest apoptoza hepatocytów, którą wyzwała wiązanie prozapalnej cytokiny TNF- $\alpha$  z receptorem śmierci TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1; p55). Ester izopropylowy PCA obniżał poziom TNF- $\alpha$ , zwiększał natomiast poziom przeciwdziałającej zapaleniu interleukiny 10 [59]. Procesowi temu towarzyszyła także zwiększona ekspresja postaci indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS; EC 1.14.13.39) w hepatocytach, nasilone wytwarzanie tlenu azotu oraz zwiększenie stężenia związków azotowych we krwi. Wykazano, że PCA i jego pochodne np. ester izopropylowy PCA przeciwdziałają tym zjawiskom [22,58].

#### **Wpływ PCA na rozwój nowotworów indukowanych przez karcynogeny chemiczne**

Chemioprewencyjne działanie PCA było oceniane na kilku modelach chemicznie indukowanej karcynogenezy u zwierząt laboratoryjnych (tabela 1). Otrzymane wyniki wskazują, że PCA w dawkach 200–2000 ppm skutecznie hamował rozwój większości nowotworów, szczególnie układu trawiennego, i to zarówno przy podawaniu substancji w fazie indukcji, jak i promocji/progresji karcynogenezy.

PCA wykazał skuteczność w prewencji nowotworów jamy ustnej na kilku modelach doświadczalnych. Zastosowany w fazie indukcji lub promocji/progresji karcynogenezy u szczura, zmniejszał częstość oraz liczbę zmian przednowotworowych (rozrost i dysplazja) oraz nowotworów

(brodawczaki i raki płaskonabłonkowe), wywołanych przez 1-tlenek 4-nitrochinoliny (4-NQO) [47]. Na zmodyfikowanym modelu doświadczalnym, pozwalającym na uzyskanie większego odsetka raków w stadium zaawansowanym, z użyciem tego samego karcynogenu, PCA podany w fazie progresji zmniejszał częstość występowania zmian przedrakowych oraz raków naciekających sąsiednie narządy lub z przerzutami do płuc [44]. U chomików PCA podany w fazie promocji/progresji karcynogenezy indukowanej przez 7,12-dimetylobenz[ $\alpha$ ]antracen istotnie zmniejszał wielkość guzów nowotworowych rozwijających się w kieszonce policzkowej oraz powierzchnię zajmowaną przez zmiany przedrakowe, tj. ogniska nabłonka płaskiego z cechami dysplazji, szczególnie małego i średniego stopnia [39].

Na modelu karcynogenezy w jelicie szczura indukowanej przez azoksymetan (AOM), PCA podany w czasie indukcji lub promocji/progresji zmniejszał liczbę ognisk nieprawidłowych krypt (aberrant crypt foci), będących uznaną zmianą przedrakową [17]. Wpływał ponadto na zmniejszenie częstości i liczby nowotworów jelita (gruczolaków i raków gruczolowych) [50].

PCA podawany w fazie promocji/progresji karcynogenezy chomikom narażonym na *N*-nitrozo-bis(2-oksypropylo)aminę (BOP) powodował istotne zmniejszenie częstości występowania dużych (>3 cm) oraz naciekających przyległe narządy nowotworów trzustki [34].

PCA wpływał również na nowotworzenie w wątrobie szczura indukowane przez dietylonitrozoaminę (DEN) [49]. Podawany w fazie indukcji lub promocji/progresji karcynogenezy zmniejsza częstość występowania zmian przednowotworowych pod postacią ognisk nieprawidłowych hepatocytów (altered hepatocellular foci), charakteryzujących się m.in. brakiem akumulacji żelaza i dodatnim odczynem immunohistochemicznym na izoformę łożyskową GST. Zmniejszał także częstość występowania oraz liczbę nowotworów z hepatocytów, zarówno gruczolaków, jak i raków.

Zmniejszenie częstości występowania zmian przedrakowych (rozrost i dysplazja) oraz nowotworów pęcherza moczowego (brodawczaki i raki z nabłonka przejściowego, rzadziej raki płaskonabłonkowe) po zastosowaniu PCA w fazie indukcji lub promocji/progresji potwierdzono również u szczurów po indukcji *N*-butylo-*N*-(4-hydroksybutylo)nitrozoaminą (BBN) [9].

PCA wpływał także na rozwój nowotworów płaskonabłonkowych skóry w klasycznym dwustopniowym modelu karcynogenezy z zastosowaniem DMBA jako induktora i TPA jako promotora. Wykazano, że podany miejscowo w małych dawkach (<20  $\mu$ M) na 5 minut przed aplikacją TPA w fazie promocji/progresji karcynogenezy zmniejszał częstość i liczbę zmian u myszy [51]. W innym doświadczeniu przeprowadzonym na tym samym modelu, działanie PCA zależało od użytej dawki oraz czasu jaki upłynął między podaniem kwasu a aplikacją TPA. PCA zastosowany na 40 minut przed TPA w dawce 160 a szczególnie 16 nM, zmniejszał częstość i liczbę zmian nowotworowych, podczas gdy w dawce 1600 nM zwiększał obydwa parametry. Podanie PCA w dużej dawce – 20000 nM na 5 minut przed TPA zmniejszało liczbę



Tabela 1. Ocena działania chemioprewencyjnego kwasu protokatechowego (PCA) na różnych modelach karcynogenezy indukowanej przez związki chemiczne u gryzoni

Gatunek/ szczep zwierzęcia	Karcynogen	Kwas protokatechowy		Narząd docelowy	Skuteczność działania prewencyjnego	Piśmiennictwo
		dawka/sposób podania	schemat podawania			
Szczur F344	1- tlenek 4-nitrochinoliny (4-NQO)	500; 1000; 2000 ppm / p.o.	4-NQO+PCA 4-NQO→PCA	jama ustna	tak	[47]
Szczur F344	1- tlenek 4-nitrochinoliny (4-NQO)	2000 ppm / p.o.	4-NQO→4-NQO+ PCA	jama ustna	tak	[44]
Złoty chomik syryjski	7,12- dimetylobenz[ <i>a</i> ]antracen (DMBA)	200 ppm / p.o.	DMBA→PCA	kieszonka policzkowa	tak	[39]
Szczur F344	N-metylo-N'-nitro-N- nitrozoguanidyna (MNNG)	1500 ppm / p.o.	MNNG→PCA	przedżołądek	nie	[8]
Szczur F344	azoksymetan (AOM)	1000; 2000 ppm / p.o.	AOM+PCA→PCA	jelito	tak	[14]
Szczur F344	azoksymetan (AOM)	250; 500; 1000 ppm / p.o.	AOM+PCA AOM→PCA	jelito	tak	[50]
Złoty chomik syryjski	N-nitrozo-bis(2- oksypropylo)amina (BOP)	500; 1000 ppm / p.o.	BOP→PCA	trzustka	tak	[34]
Szczur F344	dietylonitrozoamina (DEN)	500; 1000 ppm / p.o.	DEN+PCA DEN→PCA	wątroba	tak	[49]
Mysz A/J	4-(metylonitrozoamino)- 1-(3-pirydylo)-1-butanon (NNK)	1000 ppm / p.o.	NNK+PCA NNK→PCA	płuco	osłabienie lub nasilenie rozwoju zmian nowotworowych w zależności od schematu podawania PCA – różnice nieistotne statystycznie	[29]
Szczur F344	N-butylo-N-(4- hydroksybutylo) nitrozoamina (BBN)	500; 1000; 2000 ppm / p.o.	BBN+PCA BBN→PCA	pęcherz moczowy	tak	[9]
Mysz CD-1	7,12- dimetylobenzo[ <i>a</i> ]antracen (DMBA)→12-O- tetradekanoilo-13-acetylo- forbol (TPA)	5; 10; 20 μM / miejscowo na skórę 5 min przed TPA	DMBA→TPA+PCA	skóra	tak	[51]
Mysz ICR	7,12- dimetylobenzo[ <i>a</i> ]antracen (DMBA)→12-O- tetradekanoilo-13-acetylo- forbol (TPA)	16; 160; 1600; 20000 nM / miejscowo na skórę 0; 40 min lub 3 godz przed TPA	DMBA→TPA+PCA	skóra	osłabienie lub nasilenie rozwoju zmian nowotworowych w zależności od dawki i schematu podawania PCA – różnice statystycznie istotne	[37]
Szczur F344	2-amino-1-metylo-6- fenyylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pirydyna (PhIP)	2000 ppm / p.o.	PhIP+PCA→PCA	gruczoł piersiowy	nie	[30]

guzów, natomiast podanie na 3 godziny przed TPA istotnie zwiększało liczbę nowotworów skóry u myszy [37].

Istnieją również dane negujące chemioprewencyjną aktywność PCA. W doświadczalnych nowotworach płuca u myszy wywołanych przez 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon (NNK) stwierdzono zwiększenie częstości i liczby gruczolaków w grupie zwierząt otrzymujących PCA w dawce 1000 ppm w fazie promocji/progresji, ale różnice nie były istotne statystycznie. PCA w tej samej dawce, aczkolwiek podawany jednocześnie z karcynogenem nieznacznie hamował rozwój guzów [29]. PCA w dawce 2000 ppm był również nieskuteczny w prewencji nowotworów rozwijających się w przedłożadku [8] i gruczole piersiowym [30] szczura po podaniu odpowiednio *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny (MNNG) i 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-*b*] pirydyny (PhIP).

## PODSUMOWANIE

Kwas protokatechowy był od dawna stosowany w medycynie naturalnej, stanowi bowiem jedną z biologicznie aktywnych substancji wyizolowanych z wielu popularnych roślin leczniczych rosnących w różnych rejonach świata [4,7,12,19,51,56]. Badania prowadzone w ciągu ostatnich kilkunastu lat wskazują, że może on znaleźć zastosowanie także w medycynie konwencjonalnej, jako środek w zapobieganiu chorobom układu krążenia oraz nowotworom [27,28,31,48,43]. Mechanizm działania prewencyjnego kwasu protokatechowego opiera się na jego własnościach przeciwutleniających, tj. hamowaniu generacji wolnych rodników, zdolności do ich zmiatania oraz zwiększania aktywności katalitycznej endogennych enzymów uczestniczących w neutralizacji wolnych rodników. Duże znaczenie ma także wpływ PCA na aktywność enzy-

mów zaangażowanych w I i II etap biotransformacji karcynogenów oraz prawdopodobnie bezpośrednio blokowanie miejsc swoistego wiązania zmetabolizowanych karcynogenów z cząsteczką DNA, co zapobiega tworzeniu potencjalnie niebezpiecznych adduktów. Jednak inne aspekty chemioprewencyjnego działania kwasu, np. wpływ na aktywność postaci indukowanych cyklooksygenazy (COX-2) i syntazy tlenku azotu (iNOS) oraz białek regulujących przebieg cyklu komórkowego są, jak dotąd, słabo poznane.

Pewne zastrzeżenia co do bezpieczeństwa stosowania kwasu protokatechowego u ludzi budzą pojedyncze doniesienia o nasilaniu przez tę substancję stresu oksydacyjnego oraz zwiększaniu liczby niektórych typów nowotworów u zwierząt doświadczalnych [1,35,36,37]. Jednakże oba zjawiska obserwowano stosując jedynie bardzo duże dawki. Dzielne spożycie kwasu protokatechowego nie zostało co prawda dokładnie określone, ale biorąc pod uwagę to, że jego zawartość w produktach spożywczych rzadko osiąga wartość 2–10 µg/g, to jest ono prawdopodobnie znacznie poniżej 1 mg/kg m.c. Przyjmowane z dietą dawki PCA są więc przynajmniej 100–500 razy mniejsze niż te, które wywoływały działania niepożądane opisane w kilku pracach [7,21,36]. Wspomnieć jednak należy, że PCA może być jednym z aktywnych metabolitów roślinnych związków fenolowych o bardziej złożonej budowie strukturalnej, np. antocyjanów, a więc jego stężenie w organizmie może być wyższe niż wynikałoby to z zawartości samego kwasu w spożywanych produktach [53]. Dlatego przy ewentualnym opracowaniu strategii chemioprewencji z udziałem kwasu protokatechowego u ludzi należy uwzględnić zarówno jego zawartość w codziennej diecie, jak również spożycie innych naturalnych lub syntetycznych związków przeciwutleniających, które same mogą w pewnych warunkach nasilać niepożądane działania kwasu protokatechowego.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Babich H., Sedletcaia A., Kenigsberg B.: *In vitro* cytotoxicity of protocatechuic acid to cultured human cells from oral tissue: involvement in oxidative stress. *Pharmacol. Toxicol.*, 2002; 91: 245–253
- [2] Bachrach U., Wang Y.C., Tabib A.: Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol. Sci.*, 2001; 16: 106–109
- [3] Baer-Dubowska W., Szaefer H., Krajka-Kuzniak V.: Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*, 1998; 28: 735–743
- [4] Ellnain-Wojtaszek M.: Phenolic acids from *Ginkgo biloba* L. Part II. Quantitative analysis of free and liberated by hydrolysis phenolic acids. *Acta Pol. Pharm.*, 1997; 54: 229–232
- [5] Guengerich F.P.: Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 345–351
- [6] Guglielmi F., Luceri C., Giovannelli L., Dolara P., Lodovici M.: Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. *Br. J. Nutr.*, 2003; 89: 581–587
- [7] Herrmann K.: Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1989; 28: 315–347
- [8] Hirose M., Kawabe M., Shibata M., Takahashi S., Okazaki S., Ito N.: Influence of caffeic acid and *o*-dihydroxybenzene derivatives on *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-initiated forestomach carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1992; 13: 1825–1828
- [9] Hirose Y., Tanaka T., Kawamori T., Ohnishi M., Makita H., Mori H., Satoh K., Hara A.: Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*, 1995; 16: 2337–2342
- [10] Hudson E.A., Dinh P.A., Kokubun T., Simmonds M.S., Gescher A.: Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000; 9: 1163–1170
- [11] Ignatowicz E., Balana B., Vulimiri S.V., Szaefer H., Baer-Dubowska W.: The effect of plant phenolics on the formation of 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene-DNA adducts and TPA-stimulated polymorphonuclear neutrophils chemiluminescence *in vitro*. *Toxicology*, 2003; 189: 199–209
- [12] Jurgenliemk G., Nahrstedt A.: Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.*, 2002; 68: 88–91
- [13] Kampa M., Alexaki V.I., Notas G., Nifli A.P., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtzooglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E.: Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.*, 2004; 6: R63–R74
- [14] Kawamori T., Tanaka T., Kojima T., Suzui M., Ohnishi M., Mori H.: Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1994; 85: 686–691
- [15] Kayano S., Kikuzaki H., Fukutsuka N., Mitani T., Nakatani N.: Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 3708–3712
- [16] Kikuzaki H., Kawai Y., Nakatani N.: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging active compounds from greater cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2001; 47: 167–171
- [17] Klauinig J.E., Kamendulis L.M.: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004; 44: 239–267
- [18] Krajka-Kuzniak V., Szaefer H., Baer-Dubowska W.: Modulation of 3-methylcholanthrene-induced rat hepatic and renal cytochrome P450 and phase II enzymes by plant phenols: protocatechuic and tannic acids. *Toxicol. Lett.*, 2004; 152: 117–126
- [19] Lee I.R., Yang M.Y.: Phenolic compounds from *Duchesnea chrysantha* and their cytotoxic activities in human cancer cell. *Arch. Pharm. Res.*, 1994; 17: 476–479



- [20] Lemaire C., Godefroy N., Costina-Parvu I., Rincheval V., Renaud F., Trotot P., Bouleau S., Mignotte B., Vayssiere J.L.: Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. *Oncogene*, 2005; 24: 3297–3308
- [21] Li P., Wang X.Q., Wang H.Z., Wu Y.N.: High performance liquid chromatographic determination of phenolic acids in fruits and vegetables. *Biomed. Environ. Sci.*, 1993; 6: 389–398
- [22] Lin W.L., Hsieh Y.J., Chou F.P., Wang C.J., Cheng M.T., Tseng T.H.: Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Arch. Toxicol.*, 2003; 77: 42–47
- [23] Liu C.L., Wang J.M., Chu C.Y., Cheng M.T., Tseng T.H.: *In vivo* protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 2002; 40: 635–641
- [24] Liu R.H.: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.*, 2004; 134 (12 Suppl.): 3479S–3485S
- [25] Lodovici M., Guglielmi F., Meoni M., Dolara P.: Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.*, 2001; 39: 1205–1210
- [26] Makris D.P., Rossiter J.T.: Comparison of quercetin and a non-ortho-hydroxy flavonol as antioxidants by competing *in vitro* oxidation reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 2001; 49: 3370–3377
- [27] Masella R., Vari R., D'Archivio M., Di Benedetto R., Matarrese P., Malorni W., Scaccocchio B., Giovannini C.: Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J. Nutr.*, 2004; 134: 785–791
- [28] Masella R., Cantafora A., Modesti D., Cardilli A., Gennaro L., Bocca A., Coni E.: Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Rep.*, 1999; 4: 113–121
- [29] Mori H., Matsunaga K., Tanakamaru Y., Kawabata K., Yamada Y., Sugie S., Nishikawa A.: Effects of protocatechuic acid, *s*-methylmethanethiosulfonate or 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)ethenyl)-2(5H)-furanone(KYN-54) on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.*, 1999; 135: 123–127
- [30] Mori H., Sugie S., Rahman W., Suzui N.: Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.*, 1999; 143: 195–198
- [31] Mori H., Tanaka T., Sugie S., Yoshimi N., Kawamori T., Hirose Y., Ohnishi M.: Chemoprevention by naturally occurring and synthetic agents in oral, liver, and large bowel carcinogenesis. *J. Cell Biochem.*, 1997; 27(Suppl.): 35–41
- [32] Morikawa A., Kato Y., Sugiyama T., Koide N., Chakravorty D., Yoshida T., Yokochi T.: Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in D-galactosamine-sensitized mice as an experimental endotoxic shock model. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 1018–1024
- [33] Mundle S.D., Saberwal G.: Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation. *FASEB J.*, 2003; 17: 569–574
- [34] Nakamura H., Nishikawa A., Furukawa F., Kasahara K., Miyuchi M., Son H.Y., Hirose M.: Inhibitory effects of protocatechuic acid on the post-initiation phase of hamster pancreatic carcinogenesis induced by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Anticancer Res.*, 2000; 20(5B): 3423–3427
- [35] Nakamura Y., Torikai K., Ohigashi H.: A catechol antioxidant protocatechuic acid potentiates inflammatory leukocyte-derived oxidative stress in mouse skin via a tyrosinase bioactivation pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30: 967–978
- [36] Nakamura Y., Torikai K., Ohigashi H.: Toxic dose of a simple phenolic antioxidant, protocatechuic acid, attenuates the glutathione level in ICR mouse liver and kidney. *J. Agric. Food Chem.*, 2001; 49: 5674–5678
- [37] Nakamura Y., Torikai K., Ohto Y., Murakami A., Tanaka T., Ohigashi H.: A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and time-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 1899–1907
- [38] Njalsson R., Norgren S.: Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. *Acta Paediatr.*, 2005; 94: 132–137.
- [39] Ohnishi M., Yoshimi N., Kawamori T., Ino N., Hirose Y., Tanaka T., Yamahara J., Miyata H., Mori H.: Inhibitory effects of dietary protocatechuic acid and costunolide on 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1997; 88: 111–119
- [40] Sang S., Lapsley K., Jeong W.S., Lachance P.A., Ho C.T., Rosen R.T.: Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus Batsch*). *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 2459–2463
- [41] Sroka Z., Cisowski W.: Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, 2003; 41: 753–758
- [42] Sroka Z., Gamian A., Cisowski W.: Niskoczęsteczkowe związki przeciwniejające pochodzenia naturalnego. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 34–41
- [43] Stagos D., Kazantzoglou G., Magiatis P., Mitaku S., Anagnostopoulos K., Kouretas D.: Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int. J. Mol. Med.*, 2005; 15: 1013–1022
- [44] Suzuki R., Kohno H., Sugie S., Tanaka T.: Dietary protocatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2003; 4: 319–326
- [45] Szaefer H., Cichocki M., Brauze D., Baer-Dubowska W.: Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutr. Cancer*, 2004; 48: 70–77
- [46] Szaefer H., Jodynis-Liebert J., Cichocki M., Matuszewska A., Baer-Dubowska W.: Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by *o*-toluidine. *Toxicology*, 2003; 186: 67–77
- [47] Tanaka T., Kawamori T., Ohnishi M., Okamoto K., Mori H., Hara A.: Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phases. *Cancer Res.*, 1994; 54: 2359–2356
- [48] Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Mori H.: Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer*, 1995; 75: 1433–1439
- [49] Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Yoshimi N., Mori H.: Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Res.*, 1993; 53: 2775–2779
- [50] Tanaka T., Kojima T., Suzui M., Mori H.: Chemoprevention of colonic carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effect on tumor development and biomarkers expression of colon tumorigenesis. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3908–3913
- [51] Tseng T.H., Hsu J.D., Lo M.H., Chu C.Y., Chou F.P., Huang C.L., Wang C.J.: Inhibitory effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett.*, 1998; 126: 199–207
- [52] Tseng T.H., Kao T.W., Chu C.Y., Chou F.P., Lin W.L., Wang C.J.: Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60: 307–315
- [53] Tsuda T., Horio F., Osawa T.: Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett.*, 1999; 449: 179–182
- [54] Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T.: Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 2234–2242
- [55] Ueda J., Saito N., Shimazu Y., Ozawa T.: A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996; 333: 377–384
- [56] Valentova K., Cvak L., Muck A., Ulrichova J., Simanek V.: Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *Eur. J. Nutr.*, 2003; 42: 61–66
- [57] Wang J.Y.: Nucleo-cytoplasmic communication in apoptotic response to genotoxic and inflammatory stress. *Cell Res.*, 2005; 15: 43–48
- [58] Yan J.J., Jung J.S., Hong Y.J., Moon Y.S., Suh H.W., Kim Y.H., Yun-Choi H.S., Song D.K.: Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: inhibition of TNF-alpha and nitric oxide production and augmentation of IL-10. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004; 27: 2024–2027
- [59] Yen G.C., Hsieh C.L.: Reactive oxygen species scavenging activity of *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and its active compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48: 3431–3436
- [60] Yoshino M., Murakami K.: Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem.*, 1998; 257: 40–44
- [61] Zhou-Stache J., Buettner R., Artmann G., Mittermayer C., Bosserhoff A.K.: Inhibition of TNF-alpha induced cell death in human umbilical vein endothelial cells and Jurkat cells by protocatechuic acid. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 2002; 40: 698–703