

Received: 2008.09.17
Accepted: 2009.01.14
Published: 2009.02.23

Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny

Cancer cells and oxidative stress

Dorota Ścibior-Bentkowska, Hanna Czczot

Katedra i Zakład Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) jest nieodłącznym elementem tlenowego metabolizmu komórek. Są one jego naturalnymi produktami i w stężeniach fizjologicznych odgrywają ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu wielu procesów komórkowych. Zaburzenie równowagi między wytwarzaniem RFT a wydajnością systemów antyoksydacyjnych prowadzi do stresu oksydacyjnego, co skutkuje uszkodzeniami ważnych makrocząsteczek komórkowych, tj. DNA, białek i lipidów.

Coraz więcej danych wskazuje na udział RFT w transformacji nowotworowej komórek. Stwierdzono występowanie stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych, ale mechanizmy odpowiedzialne za jego indukcję nie są do końca wyjaśnione. Wiadomo, że obejmują one m.in. stany zapalne i działanie cytokin, sygnały onkogenne, intensywny metabolizm związany z ciągłą proliferacją, mutacje w DNA mitochondrialnym i dysfunkcje w łańcuchu oddechowym.

Duże stężenie RFT w komórkach nowotworowych może prowadzić do adaptacji komórkowej, wzrostu tempa proliferacji, powstawania mutacji w DNA i niestabilności genomu, a także do oporności na pewne grupy leków stosowanych w terapii nowotworów, co wspomaga rozwój nowotworu. Zjawisko stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych może być wykorzystane w poszukiwaniu nowych strategii przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe:

komórki nowotworowe • stres oksydacyjny • reaktywne formy tlenu

Summary

Reactive oxygen species (ROS) formation are a constant element of a cell's oxygen metabolism. They are its normal products and in physiological concentrations they play important roles in a variety of cell processes. Disturbances in the balance between ROS formation and the efficiency of antioxidant mechanisms lead to oxidative stress. Oxidative stress causes damage to important macromolecules, such as DNA, proteins, and lipids. Growing evidence indicates the participation of ROS in the cancerous transformation of cells. Oxidative stress was also found in cancer cells, but the mechanisms responsible for its induction have not been definitively explained. It is known that they include inflammation and cytokine action, oncogenic signals, intensive metabolism related to constant proliferation, mutations in mitochondrial DNA, and malfunction in the respiratory chain. A high level of ROS in cancer cells may lead to a variety of biological responses, such as cell adaptation, increased proliferation rate, formation of DNA mutations and genetic instability, and resistance to some drugs used in anticancer therapy. Therefore, oxidative stress in cancer cells promotes tumor development, but it can also be useful in the search for new therapeutic strategies of cancer treatment.

Key words:

cancer cells • oxidative stress • radical oxygen species



Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=879821>

Word count: 7626

Tables: –

Figures: 1

References: 96

Adres autorki: dr hab. Hanna Czczot, prof. nadzw. WUM, Katedra i Zakład Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: hanna.czczot@wp.pl

Wykaz skrótów: **AP-1** – czynnik transkrypcyjny 1 (activator protein 1); **ASK1** – kinaza 1 sygnalizująca apoptozę (apoptosis signal-regulating kinase 1); **ATO** – trójtlenek arsenu; **ATP** – adenylozotrójfosforan; **BSO** – butioninosulfoksymina; **CAM** – białko adhezyjne (cell adhesion molecule), **CAT** – katalaza; **CuZnSOD** – cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa; **DNA** – kwas deoksyrybonukleoproteinowy; **ERK** – kinaza regulowana przez sygnał pozakomórkowy (extracellular signal-regulated kinases); **G6PD** – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa; **GSH** – zredukowany glutation; **GSHPx** – peroksydaza glutationowa; **GSHR** – reduktaza glutationowa; **GSSG** – utleniony glutation; **GST** – transferaza S-glutationowa; **4HHE** – 4-hydroksyheksenal; **4HNE** – trans-4-hydroksy-2-nonenal; **H₂O₂** – nadtlenuk wodoru; **HO₂^{*}** – rodnik wodoronadtlenkowy; **HOCl** – kwas podchloryny/kwas chlorowy (I); **iNOS** – indukowana syntaza tlenu azotu; **JNK** – C-Jun N-końcowa kinaza (c-Jun-terminal kinase); **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny kappa B (nuclear factor kappa B); **2-ME** – 2-metoksyestradiol; **MDA** – dialdehyd malonowy; **mtDNA** – mitochondrialny kwas deoksyrybonukleoproteinowy; **NAC** – N-acetylocysteina; **NADPH** – forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; **NO^{*}** – tlenek azotu; **ONOO⁻** – nadtlenuk azotyn/anion kwasu azotowego (III); **O₂^{*}** – anionorodnik ponadtlenkowy; **¹O₂^{*}** – tlen singletowy; **OH^{*}** – rodnik hydroksyloxy; **MnSOD** – manganowa dysmutaza ponadtlenkowa; **NOS** – syntaza tlenu azotu; **PCK** – kinaza białkowa C (protein kinase C); **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa; **TGF-β** – czynnik wzrostu nowotworów β (tumor growth factor β); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **TRX** – tioredoksyna; **WRA** – wolne rodniki azotowe.

Prawie każdy typ zróżnicowanych komórek może utracić zdolność do kontrolowania podziałów i nabrać cech komórek nowotworowych w procesie transformacji nowotworowej. Transformacja nowotworowa polega na kumulacji w materiale genetycznym komórek wielu uszkodzeń, które upośledzają prawidłowe mechanizmy kontroli ich proliferacji. Jest ona uwarunkowana działaniem czynników genetycznych (teoria genetyczna) i czynników środowiskowych (teoria epigenetyczna) [14]. Według teorii genetycznej transformacja zdrowych komórek w komórki nowotworowe jest związana z aktywacją protoonkogenów do onkogenów i/lub inaktywacją genów supresorowych oraz genów mutatorowych pod wpływem działania różnego rodzaju czynników. Teoria epigenetyczna zakłada, że nowotwór powstaje w wyniku nieprawidłowego różnicowania się komórek [14,17]. Obecnie uważa się, że niektóre typy nowotworów powstają za pośrednictwem mechanizmów genetycznych, a inne – epigenetycznych. Istnieje również wiele przesłanek, że oba te mechanizmy współdziałają ze sobą w złożonym procesie kancerogenezy. Dziś nie ulega już wątpliwości, że czynniki środowiskowe współuczestniczą w procesie ostatecznej „decyzji”, czy komórki z mutacjami w DNA ulegną transformacji nowotworowej.

Coraz więcej danych wskazuje, że jednym z czynników odpowiedzialnych za indukcję transformacji nowotworowej komórek są reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species – RFT). Z powodu swej znacznej reaktywności stanowią one poważne zagrożenie dla integralności i prawidłowego funkcjonowania komórek [5,39,92].

Wytwarzanie RFT jest nieodłącznym elementem aerobowego metabolizmu komórkowego. Są one jego naturalnymi produktami i w fizjologicznych stężeniach odgrywają ważną rolę w prawidłowym działaniu złożonych mechanizmów, kontrolujących podziały komórkowe i uczestniczą w przebiegu wielu ważnych procesów komórkowych. Do tego typu procesów należą m.in.: aktywacja czynników transkrypcyjnych, takich jak NF-κB czy AP-1, regulacja procesów fosforylacji białek czy poziomu wapnia w komórkach i in. Są także czynnikami obronnymi organizmu, biorącymi udział w eliminowaniu drobnoustrojów w procesie fagocytozy. Niezależnie od tych ważnych funkcji biologicznych RFT mogą być także czynnikami uszkadzającymi składniki komórkowe. Zaburzenia równowagi między wytwarzaniem RFT a wydajnością systemów antyoksydacyjnych prowadzą do stresu oksydacyjnego [48,50].

Powstawanie nowotworów jest procesem wieloetapowym, w którym wyróżnia się fazę inicjacji, promocji i progresji. Wyniki licznych badań w układach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* wskazują, że RFT są zaangażowane nie tylko na etapie inicjacji i promocji procesu kancerogenezy, ale również jego progresji [10,38,68].

CHARAKTERYSTYCZNE CECHY KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Komórki nowotworowe zazwyczaj zachowują strukturalne i funkcjonalne cechy typowe dla komórek, z których się wywodzą. Wykazują one jednak charakterystyczny zbiór cech, odróżniających je od komórek prawidłowych.

Cechy te pozwalają im na formowanie guza nowotworowego, a w końcowych stadiach jego rozwoju na tworzenie przerzutów do innych części ciała. Podczas transformacji nowotworowej komórki zachodzą wiele zmian, które przy braku odpowiednich sygnałów stymulujących i/lub w obecności sygnałów hamujących umożliwiają im wzrost i podział [14].

Do najważniejszych cech odróżniających komórki nowotworowe od komórek niezmiennych nowotworowo należą: niezależność od zewnętrznych sygnałów wzrostu, niewrażliwość na inhibitory wzrostu, ucieczka od zaprogramowanej śmierci (apoptozy), nieograniczony potencjał replikacyjny, zdolność do ciągłej angiogenezy, inwazji do sąsiednich tkanek i tworzenia przerzutów. Komórki nowotworowe charakteryzują się również licznymi zmianami w budowie (m.in. cytoszkieletu, jądra czy błon komórkowych) oraz w składzie i liczbie kanałów błonowych, receptorów czy enzymów [14,42].

Zmieniona w stosunku do prawidłowych komórek dystrybucja oraz aktywność mikrofilamentów i mikrotubul może wpływać na interakcje między komórkami nowotworowymi, ich adhezję i ruchliwość. Zmniejszenie adhezji typu komórka : komórka oraz komórka : macierz międzykomórkowa pozwala na formowanie się guzów nowotworowych o stosunkowo dużej masie. Podczas gdy w przypadku prawidłowych komórek, obserwuje się zjawisko zahamowania wzrostu w wyniku kontaktu błona : błona z sąsiadującymi komórkami, nie stwierdzono takiego zjawiska w komórkach nowotworowych. Wykazują one bowiem zdolność do kontynuowania wzrostu i podziałów nawet w otoczeniu innych komórek. Obniżenie adhezji komórkowej wpływa również na ruchliwość komórek nowotworowych, co umożliwia im poruszanie się, migrację w celu rozprzestrzeniania i tworzenia przerzutów. Inwazję do sąsiadujących tkanek umożliwiają komórkom nowotworowym swoiste enzymy, wytwarzane w celu usuwania barier, które mogłyby uniemożliwiać ich migrację i rozprzestrzenianie się [15,42].

Jedną z najważniejszych cech komórek nowotworowych jest zdolność do ciągłych podziałów. O wejściu prawidłowych komórek na ścieżkę proliferacji decydują odpowiednie zewnętrzne czynniki pobudzające mitozę. W przypadku komórek nowotworowych proliferacja może zachodzić niezależnie od tych czynników. Wytwarzają one autokrynnie własne czynniki wzrostu, co uniezależnia je od zewnętrznych czynników stymulujących podziały, a tym samym od innych komórek. Dodatkowo komórki nowotworowe mogą stymulować otaczające je komórki prawidłowe do wytwarzania zwiększonych ilości czynników wzrostu, co prowadzi do podtrzymywania stałego wzrostu guza nowotworowego. Zmniejszenie wrażliwości komórek nowotworowych na czynniki zewnętrznego pochodzenia umożliwiają zmiany w budowie i liczbie receptorów na ich powierzchni [3,11].

Komórki nowotworowe mają również mechanizmy eliminujące odbiór sygnałów antyproliferacyjnych. Na poziomie molekularnym większość tych sygnałów jest przesyłanych do komórek przez specjalne białka pRb, p107 i p130. Hipofosforylacja białka pRb hamuje proliferację, prowadząc do zmian funkcji odpowiednich czynników transkrypcyjnych (np. E2F), które kontrolują ekspresję genów, od-

powiedzialnych za przejście komórek z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. Zakłócenie tej ścieżki w komórkach nowotworowych uniemożliwia zahamowanie proliferacji i powoduje, że stają się one niewrażliwe na czynniki antyproliferacyjne. Najlepiej udokumentowane jest działanie TGF- β , który stymuluje syntezę białek p15^{INK4B} i p21, blokujących kompleks odpowiedzialny za fosforylację białka pRb [43]. Komórki nowotworowe mogą również zmniejszać ekspresję integryn, odpowiedzialnych za odbieranie sygnałów antyproliferacyjnych oraz cząsteczek adhezyjnych, związanych z przekazywaniem sygnału do wnętrza komórek [34,42].

Komórki nowotworowe nie tylko „dążą” do nieograniczonej proliferacji, ale także do zahamowania różnicowania, które stanowi „sygnał stop” dla dzielących się komórek. W prawidłowych komórkach, po otrzymaniu przez nie sygnału do podziału następuje przejściowa ekspresja protoonkogenu *myc*. Aktywacja transkrypcji zależy nie tylko od poziomu produktu protoonkogenu *myc*, ale również od obecności odpowiednich białek Max i Mad. Czynnikiem transkrypcyjnym – Myc, aktywnie oddziałuje z DNA tylko w postaci kompleksu z białkiem Max, stymulując proliferację. Związanie białka Max przez inne białko jądrowe o nazwie Mad prowadzi do negatywnej regulacji transkrypcji. Te ściśle regulowane procesy zostają zaburzone w komórkach nowotworowych, w których nadekspresja białka Myc, może przesunąć równowagę w kierunku kompleksu Myc-Max, prowadząc do ciągłych podziałów komórkowych [31].

Cechą większości (a być może nawet wszystkich typów komórek nowotworowych) jest niewrażliwość na apoptozę. Wejście komórek na drogę apoptozy uwarunkowane jest wieloma czynnikami, a mechanizmy odpowiedzialne za jej przebieg można podzielić na sensorowe i efektorowe. Wewnątrzkomórkowe „czujniki” uruchamiają proces apoptozy w odpowiedzi na wykryte nieprawidłowości w komórce, obejmujące: uszkodzenia DNA, zaburzenia wynikające z działania produktów białkowych onkogenów, niedobory czynników niezbędnych do przeżycia czy niedotlenienie. Wiele czynników apoptotycznych gromadzi się w mitochondriach, które uwalniają cytochrom c – potencjalny katalizator apoptozy. Do mechanizmów efektorowych tego procesu należy uwalnianie wewnątrzkomórkowych proteaz zwanych kaspazami [28,37,87]. Apoptoza jest uznawana za główny mechanizm zapobiegający nowotworzeniu. Komórki nowotworowe zabezpieczają się przed apoptozą, wykorzystując różne mechanizmy. Najczęściej występującym mechanizmem są mutacje w genie supresorowym p53 i utrata proapoptotycznego działania jego produktu białkowego. Mutacje prowadzą do funkcjonalnej inaktywacji białka p53, które w prawidłowych warunkach odpowiada za wywołanie apoptozy poprzez regulację ekspresji genu *Bax* w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Białko Bax z kolei stymuluje mitochondria do uwalniania cytochromu c. W następstwie mutacji białko p53 nie działa jako sensor uszkodzeń DNA i nie dochodzi do uruchomienia mechanizmów efektorowych apoptozy. Dodatkowo w komórkach nowotworowych może dochodzić do uruchamiania innej ścieżki przekazywania sygnałów antyapoptotycznych: kinazy PI3-AKT/PK [28].

Uniezależnienie od zewnętrznych sygnałów wzrostu, niewrażliwość na inhibitory wzrostu i zdolność do unikania



apoptozy pozwala komórkom nowotworowym na samodzielny, niezależny od czynników zewnętrznych wzrost i rozwój. Wytworzyły one również mechanizmy zapewniające im nieograniczony potencjał replikacyjny, podczas gdy prawidłowe komórki są zdolne tylko do 60–70 podziałów. W przypadku większości nowotworów potencjał ten jest związany z aktywnością enzymu telomerazy, która zapewnia utrzymanie integralności chromosomów w trakcie kolejnych podziałów. W prawidłowych warunkach podczas każdego podziału komórkowego dochodzi do skracania DNA. Wynika to z niezdolności polimerazy DNA do całkowitej replikacji końca 3'DNA w fazie S cyklu komórkowego i prowadzi do wyczerpania potencjału replikacyjnego komórki po określonej liczbie podziałów. Utrzymanie stałej długości odcinków telomerowych w DNA jest charakterystyczne dla wszystkich typów komórek nowotworowych. Wynika to ze zwiększonej ekspresji enzymu telomerazy, odpowiedzialnego za dobudowanie telomerów w każdym cyklu komórkowym. Pozwala to komórkom nowotworowym na uniknięcie zjawiska starzenia się, uznawanego za drugi obok apoptozy ważny mechanizm chroniący prawidłowe komórki przed transformacją nowotworową [20].

Do rozwoju nowotworu niezbędna jest ciągła angiogeneza. Komórki nowotworowe mają zdolność do aktywacji tego procesu. Odbywa się to poprzez zmianę równowagi między czynnikami stymulującymi i hamującymi ten proces [41].

W końcowych stadiach rozwoju guza komórki nowotworowe zyskują zdolność do inwazji sąsiadujących tkanek, przemieszczania się do nawet odległych organów i tworzenia przerzutów. Inwazyjność i przerzutowanie są złożonymi procesami, w które zaangażowane są liczne białka. Należą do nich białka odpowiedzialne za zjawisko adhezji komórkowej np. CAM, integryny, a także proteazy [54].

ŹRÓDŁA RFT W KOMÓRKACH

W warunkach fizjologicznych około 1–5% O_2 w organizmie ulega przekształceniu w reaktywne formy tlenu. Stała obecność RFT w niewielkich, fizjologicznych stężeniach jest niezbędna do prawidłowego przebiegu wielu procesów życiowych. Uczestniczą one w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych, modulują ekspresję genów, aktywują transkrypcję, proliferację, apoptozę komórek, kontrolują wewnątrzkomórkową homeostazę jonów wapnia Ca^{2+} , biorą udział w indukcji procesów zapalnych oraz regulują aktywność niektórych enzymów (np. CuZnSOD) [22,33,68].

Wszystkie typy wolnych rodników tlenowych powstają w reakcjach z tlenem cząsteczkowym w wyniku jego wzbudzenia lub redukcji. Powstają one w trakcie procesów fizjologicznych, zachodzących we wszystkich strukturach komórki oraz w wyniku działania czynników zewnętrznych. Są produktem metabolizmu bardzo wielu egzogennych związków chemicznych (np. benzo/a/pirenu), w tym także leków (np. antracykliny), działania na komórki czynników fizycznych (np. promieniowania ultrafioletowego, jonizującego, ultradźwięków czy podwyższonej temperatury) [5,22].

W warunkach fizjologicznych głównym źródłem RFT są procesy oddechowe w mitochondriach, gdzie w wyniku całkowitej redukcji cząsteczki O_2 powstaje woda. Do

produktów ubocznych tego procesu należą anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenuk wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), tlen singletowy (1O_2), rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\cdot}) [5,44,51].

W większości biologicznych reakcji w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu powstaje $O_2^{\cdot-}$, który pełni główną rolę jako prekursor wszystkich pozostałych RFT.

Głównym miejscem tworzenia RFT w komórkach jest kompleks I i III łańcucha oddechowego. Najwięcej $O_2^{\cdot-}$ i innych RFT powstaje w trakcie przepływu elektronów pomiędzy kompleksem I i III, ale w warunkach hipoksji miejscem ich wytwarzania jest również kompleks II [51]. Źródłem anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach są również reakcje autoutleniania niskocząsteczkowych związków (np. adreanaliny, noradrenaliny), tetrahydropterydiny, zredukowanych nukleotydów flawinowych ($FMNH_2$, $FADH_2$), związków tiolowych (np. glutationu, cysteiny) [5,51].

Powstawanie $O_2^{\cdot-}$ towarzyszy także niektórym reakcjom enzymatycznym, katalizowanym przez enzymy z klasy oksydoreduktaz, takie jak np. oksydazy ksantynowa, aldehydowa, acylo-CoA, NAD(P)H. Wśród wymienionych enzymów szczególne znaczenie ma oksydaza ksantynowa, która utlenia hipoksantynę do ksantyny i ksantynę do kwasu moczowego oraz oksydaza NAD(P)H, obecna m.in. w błonach fagocytów. Występowanie w organizmie ognisk zapalnych stymuluje gwałtowny wzrost zużycia tlenu przez komórki fagocytyczne, zwany „wybuchem tlenowym” [74].

Anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik hydroksylowy wytwarzane są również w trakcie metabolizmu kwasu arachidonowego. W wyniku działania lipooksygenazy powstają anionorodniki ponadtlenkowe, a cyklooksygenazy – rodniki hydroksylowe [18].

Kolejnym istotnym źródłem $O_2^{\cdot-}$ i innych wolnych rodników w komórce jest mikrosomalny system transportu elektronów, odpowiedzialny za utlenianie ksenobiotyków (np. leków, pestycydów, środków konserwujących i innych) [22].

Miejscem wytwarzania $O_2^{\cdot-}$ są także peroksysony, gdzie działa oksydaza ksantynowa oraz obecny jest łańcuch transportu elektronów, w skład którego wchodzi reduktaza NADH i cytochrom b5 [51].

Wytworzony w reakcji jednoelektronowej redukcji tlenu $O_2^{\cdot-}$, ulega w wyniku tzw. dysmutacji przekształceniu do nadtlenu wodoru. Reakcja dysmutacji zachodzi spontanicznie (z małą wydajnością) lub enzymatycznie z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (ze znacznie większą szybkością). Jest ona najważniejszym źródłem H_2O_2 w komórkach organizmu [5].

Powstawanie H_2O_2 towarzyszy transportowi elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, jednak głównym miejscem jego syntezy w komórkach są peroksysony. Powstaje on również w reakcjach katalizowanych przez oksydazy (np. oksydazę L-aminokwasów), a także cyklooksygenazy i lipooksygenazy, co ma szczególne znaczenie w aktywowanych komórkach fagocytycznych w czasie „wybuchu tlenowego” [74].

H_2O_2 nie wykazuje bezpośrednio silnego działania utleniającego, ale łatwo przenika przez błony komórkowe i wraz z rodnikiem $O_2^{\cdot-}$, w obecności jonów metali przejściowych (np. Fe^{2+} , Cu^{1+}) może być źródłem nietrwałego, ale bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego OH^{\cdot} (reakcja Fentona) [73]. H_2O_2 może również łatwo wchodzić w reakcję z $O_2^{\cdot-}$ (reakcja Haber-Weissa), w której powstaje rodnik hydroksylowy. Oznacza to, że w obecności jonów metali przejściowych pojawienie się jednej postaci reaktywnych form tlenu stwarza możliwość wytworzenia w komórce pozostałych. Nadtlenek wodoru jest prekursorem nie tylko OH^{\cdot} , ale również tlenu singletowego [33].

Oprócz wymienionych reakcji źródłem dużych ilości OH^{\cdot} są zaktywowane, zdolne do fagocytozy leukocyty, które wytwarzają go w czasie „wybuchu tlenowego”, w reakcji katalizowanej przez mieloperoksydazę [5,74].

Tlen singletowy powstaje przede wszystkim w wyniku elektronowego wzbudzenia cząsteczki tlenu w stanie podstawowym. Może powstawać również w procesie peroksydacji lipidów, w reakcji $O_2^{\cdot-}$ z nadtlenkami lipidowymi [5,39].

Poza wolnymi rodnikami tlenowymi w komórce mogą powstawać również związki tlenu z azotem – tlenek azotu (NO^{\cdot}) i nadtlenoazotyn/anion kwasu azotowego (III) ($ONOO^-$). Tlenek azotu powstaje z L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (NOS). Jest wolnym rodnikiem o krótkim okresie półtrwania, który łatwo przenika przez błony komórkowe i prekursorem pozostałych wolnych rodników azotowych. Ważnym miejscem syntezy tego związku są komórki śródbłonna, makrofagi, neutrofile oraz komórki nerwowe. Pełni on wiele istotnych funkcji biologicznych w organizmie. Jest on m.in. głównym czynnikiem rozszerzającym naczynia krwionośne, hamuje adhezję leukocytów i agregację płytek krwi, pobudza wytwarzanie endoteliny oraz proliferację mięśni gładkich [5,12,40]. W dużych stężeniach tlenek azotu działa bakteriobójczo, stanowiąc silną broń przeciwbakteryjną w zaaktywowanych komórkach fagocytarnych. Łatwo wchodzi w reakcję z $O_2^{\cdot-}$, tworząc $ONOO^-$, charakteryzujący się wyjątkowo silnymi właściwościami utleniającymi. Reakcja ta ma duże znaczenie biologiczne, ponieważ prowadzi do unieczynnienia dwóch rodników – anionorodnika nadadtlenkowego i tlenu azotu. $ONOO^-$ jest mało swoistym oksydantem, a w komórkach może być źródłem toksycznego rodnika hydroksylowego [5,8].

We wnętrzu granulocytów obojętnochłonnych i monocytów, w wyniku reakcji katalizowanej przez obecną w ich ziarnistościach mieloperoksydazę powstaje kwas chlorowy (I) ($HOCl$), który z aminami tworzy toksyczne chloraminy [74].

SKUTKI STRESU OKSYDACYJNEGO

Nasilony lub długo utrzymujący się stres oksydacyjny jest bardzo szkodliwy dla komórek, ponieważ może prowadzić do trwałych zmian w strukturze ważnych biologicznie makrocząstek (DNA, białek, cukrów i innych). Zmiany te prowadzą do zaburzeń ich funkcji biologicznych, co z kolei jest przyczyną nieprawidłowości w metabolizmie komórkowym.

Oksydacyjne uszkodzenia DNA

Integralność i stabilność DNA są warunkiem prawidłowego funkcjonowania komórek. Uszkodzenia DNA mogą prowadzić do zaburzenia procesów komórkowych i rozwoju różnych schorzeń, w tym nowotworów. Uszkodzenia te powstają zarówno w procesach endogennych (błędy replikacyjne, uszkodzenia zasad w wyniku stresu oksydacyjnego), jak i w wyniku ekspozycji na czynniki zewnętrzne (ksenobiotyki, promieniowanie, leki, niewłaściwa dieta) [19].

Reakcje RFT z DNA prowadzą do powstawania wielu uszkodzeń oksydacyjnych, wśród których można wyróżnić m.in. uszkodzenia pojedynczych zasad azotowych, pęknięcia nici DNA czy tworzenie adduktów [5,19].

Za uszkodzenia oksydacyjne DNA odpowiedzialny jest przede wszystkim rodnik hydroksylowy. Anionorodnik nadadtlenkowy i H_2O_2 nie powodują bezpośrednio zmian w DNA. Jednak H_2O_2 , który łatwo przenika przez błonę jądrową jest w jądrze substratem w reakcji Fentona, w której powstaje HO^{\cdot} . Oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą powodować również WRA np. $ONOO^-$ [55,62].

W wyniku oddziaływania HO^{\cdot} z DNA dochodzi do uszkodzenia zasad azotowych, deoksyrybozy, rozerwania wiązań fosfodiesterowych, łączących nukleotydy oraz tworzenia wiązań poprzecznych DNA-białko [62].

Oddziaływanie HO^{\cdot} z resztami deoksyrybozy powoduje powstawanie pojedynczych i podwójnych pęknięć w łańcuchu DNA. Z kolei oksydacyjne uszkodzenia zasad azotowych, wywołane jego działaniem, dotyczą głównie pozycji C5 i C6 w pirymidynach oraz pozycji C8, C5 i C4 w purynach [4]. Zmodyfikowane produkty zasad azotowych 8-hydroksyguanina, dipirymidynowe addukty adeniny i guaniny, glikol tyminy są odpowiedzialne za powstawanie w DNA mutacji punktowych typu G-C \rightarrow T-A, G-C \rightarrow C-G czy C \rightarrow T [19,55]. Mogą one również podlegać dalszym przekształceniom, które prowadzą do ich degradacji i powstawania produktów o działaniu mutagennym. Powstające w wyniku działania RFT mutacje punktowe w DNA, mogą zwiększać ekspresję protoonkogenów komórkowych [4,55].

RFT mogą również wpływać na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia. Zwiększają one napływ jonów Ca^{2+} do komórki, a także wpływają na ich uwalnianie z rezerw komórkowych. Wzrost stężenia Ca^{2+} prowadzi do aktywacji zależnych od tych jonów endonukleaz, które są odpowiedzialne za degradację DNA. Stwierdzono, również, że indukcja niektórych protoonkogenów jest spowodowana bezpośrednio działaniem cytosolowych jonów Ca^{2+} [61,70,77].

Wykazano również, że wzrost stężenia jonów Ca^{2+} stymulowany działaniem RFT, jest związany z aktywacją Ca^{2+} -zależnych kinaz białkowych (w tym kinazy białkowej C), które odpowiadają za fosforylację czynników transkrypcyjnych, a tym samym wpływają na przebieg procesu transkrypcji [92].

Szczególnie narażony na oksydacyjne uszkodzenia jest mitochondrialny DNA. Wynika to z bliskiego sąsiedztwa łańcucha oddechowego, ograniczonych możliwości na-



prawczych, a także braku białek chroniących dodatkowo tę strukturę przed uszkodzeniami. Potwierdzono to w badaniach doświadczalnych na tkankach prawidłowych, w których wykazano 16-krotnie większą ilość 8-hydroksyguaniny mitochondrialnej niż w jądrowym DNA [9].

Oksydacyjne modyfikacje DNA spowodowane działaniem RFT mogą stanowić element zapoczątkowujący proces nowotworowy. Dowodem na to może być stwierdzony podwyższony poziom zmodyfikowanych zasad w tkance nowotworowej w porównaniu do otaczających nowotwór tkanek prawidłowych. Przypuszcza się również, że tego typu zmiany w DNA są czynnikiem sprzyjającym przekształceniu zmiany łagodnej w zmianę złośliwą, a także mogą prowadzić do wzrostu potencjału przerzutowania [19,38,68].

Oksydacyjne uszkodzenia białek

Utlenianie białek prowadzi do zmian w ich strukturze i zaburza ich funkcje biologiczne. Za oksydacyjne modyfikacje reszt aminokwasowych, grup prostetycznych enzymów, fragmentację czy agregację białek odpowiedzialne są przede wszystkim OH^\cdot , H_2O_2 i $\text{O}_2^{\cdot-}$. Jednak głównym mediatorem oksydacyjnych uszkodzeń białek jest rodnik hydroksylowy. Jego działanie utleniające prowadzi do powstania rodników alkilowych, alkilnadtenkowych, alkilwodonoratlenków czy w dalszych przemianach rodników alkoksylowych, których obecność sprzyja reakcjom, prowadzącym do rozrywania łańcucha polipeptydowego [23,67].

Najbardziej podatne na działanie RFT są reszty aminokwasów aromatycznych i siarkowych. Szczególną wrażliwość wykazują tyrozyna, tryptofan, cysteina i metionina [67].

Utlenianie przez RFT aminokwasów z wolną grupą aminową, amidową lub hydroksylową prowadzi do powstania pochodnych karbonylowych. Pochodne karbonylowe mają zdolność do reagowania z wolnymi grupami aminowymi reszt lizyny w tej samej lub innej części białka. Reakcja ta prowadzi do powstawania w białku wiązań krzyżowych [62].

Również WRA, a wśród nich szczególnie ONOO⁻ mogą oddziaływać z białkami i utleniać ich składniki. Narazone na jego działanie są zwłaszcza reszty cysteiny, metioniny, tyrozyny i tryptofanu. Utlenia on reszty tiolowe w cysteinie z wytworzeniem mostków disiarczkowych, a także silnie utlenia reszty metioniny do sulfotlenku. W reakcji z tyroziną ONOO⁻ tworzy 3-nitrotyrozinę i 2,5-dinitrotyrozinę, które biorą udział w powstawaniu wiązań krzyżowych. Aktywność utleniająca ONOO⁻ może prowadzić także do tworzenia grup karbonylowych i do fragmentacji białek [1,40,67].

RFT mogą indukować peroksydację białek, która powoduje powstawanie nadtenków białek i nadtenków aminokwasów [67]. RFT wykazują również utleniające działanie w stosunku do niebiałkowych składników w białkach. Mogą one utleniać np. węglowodany czy jony metali zawarte w białkach, co często prowadzi do zaburzenia funkcji biologicznych białka. Wykazano, że pod wpływem RFT dochodzi do utraty aktywności enzymatycznej, m.in. takich enzymów jak dehydrogenaza glicerolaldehidofosforanowa czy dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa [16,81].

Zmienione oksydacyjnie białka mogą wykazywać również tendencję do tworzenia agregatów. Powstające w wyniku modyfikacji oksydacyjnych agregaty są odporne na degradację, co przy zmniejszonej wydajności działania mechanizmów naprawczych sprzyja gromadzeniu się zmienionych białek w komórkach i prowadzi do stopniowej utraty ich biochemicznych i fizjologicznych funkcji [1,81].

Przy dużej ilości RFT, a zmniejszonej skuteczności działania układów antyoksydacyjnych i proteolitycznych, dochodzi do akumulacji utlenionych produktów białkowych. Zmodyfikowane oksydacyjnie białka wykryto w licznych tkankach i wykazano, że stres oksydacyjny i modyfikacja białek, zachodząca pod wpływem RFT, odgrywają rolę w patogenezie wielu schorzeń, w tym choroby nowotworowej [7].

Peroksydacja lipidów

Jednym z ważniejszych procesów biologicznych, związanych z działaniem RFT jest peroksydacja lipidów. Kaskadowy proces utleniania obecnych w lipidach nienasyconych kwasów tłuszczowych, w którym powstają nadtenki tych związków zapewnia również ciągłą dostawę wolnych rodników, inicjujących kolejne reakcje peroksydacji. Peroksydacji ulegają przede wszystkim reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzące w skład fosfolipidów, które są podstawowym składnikiem budulcowym błon biologicznych [61].

Peroksydacja lipidów jest procesem wieloetapowym, który nieodłącznie towarzyszy reakcjom metabolizmu organizmów aerobowych. Może on przebiegać zarówno nieenzymatycznie, jak i w wyniku reakcji enzymatycznych (np. podczas powstawania biologicznie aktywnych związków, takich jak eikozanoidy: prostaglandyny, tromboksany i leukotrieny). Końcowym produktem peroksydacji lipidów są rodniki alkilowe i nadtenkowe, które podlegają dalszym przemianom. Do końcowych produktów procesu peroksydacji lipidów należą także węglowodory m.in. z grupy alkanów i alkenów. Nagromadzenie tych związków prowadzi do zmiany struktury błon komórkowych i ich płynności, a to wpływa na zachowanie integralności komórek [61,75].

Końcowe produkty peroksydacji lipidów, do których należą m.in. dialdehyd malonowy (MDA), trans-4-hydrokso-2-nonenal (4HNE), 4-hydroksoheksenal (4HHE), wykazują mutagenne i kancerogenne działanie, a także mogą wpływać regulacyjnie na tempo proliferacji komórki. Spośród wymienionych produktów peroksydacji lipidów dużą toksycznością charakteryzuje się 4HNE, natomiast najbardziej mutagenny jest MDA [27].

PRZYCZYNY ZWIĘKSZONEGO WYTWARZANIA RFT W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Mimo że występowanie stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych potwierdzono w badaniach *in vitro* i *in vivo*, to mechanizmy odpowiedzialne za jego indukcję nie są do końca poznane i wyjaśnione. W świetle aktualnego stanu wiedzy do potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększone powstawanie RFT w komórkach nowotworowych należą: stany zapalne i działanie cytokin,

zaburzenia w przekazywaniu sygnałów onkogennych, aktywny metabolizm związany z ciągłą proliferacją, mutacje w mitochondrialnym DNA (mtDNA) i związane z tym dysfunkcje [63,68,72,92].

Przewlekłe stany zapalne np. wątroby, jelita grubego czy infekcja *Helicobacter pylori* w żołądku mogą prowadzić do powstawania i rozwoju nowotworów [50]. Stan zapalny jest reakcją obronną komórek organizmu na czynniki patogenne i uszkodzające komórki (np. chroniczne, bakteryjne i wirusowe infekcje, reakcje autoimmunologiczne, szok termiczny, promieniowanie np. UV oraz ciała obce np. azbest) [18]. Patogeny lub fragmenty uszkodzonych komórek organizmu aktywują fagocyty (monocyty, neutrofile, eozynofile, granulocyty obojętnochłonne), które w ognisku uszkodzenia wydzielają prozapalne cytokiny (np. IL-1, -6, -8, TNF- α , IFN- γ i in.). W błonach zaaktywowanych fagocytów wzrasta również aktywność enzymów (np. oksydazy NAD(P)H, mieloperoksydazy, peroksydazy eozynofilowej, cyklooksygenazy czy iNOS), w wyniku ich działania dochodzi do „wybuchu tlenowego”. Zwiększonemu zużyciu tlenu przez fagocyty towarzyszy uwalnianie dużych ilości RFT, które nie tylko niszczą patogeny i tkanki objęte procesem zapalnym oraz tkanki otaczające, ale również mogą indukować w komórkach zmiany, prowadzące do transformacji nowotworowej. W miarę rozwoju zapalenia dochodzi do zaburzenia istniejącej równowagi między reakcjami prozapalnymi a przeciwzapalnymi mechanizmami obronnymi, co pociąga za sobą często nieodwracalne zmiany w komórkowej równowadze redoks i może skutkować zwiększoną niestabilnością genetyczną [5,18].

Podczas przekazywania sygnałów onkogennych wzrasta poziom RFT w komórce. Dzieje się tak podczas zaburzeń w wielu szlakach sygnalizacyjnych (np. RAS-Raf, kaskadzie kinaz MAP czy kinazy białkowej PKA).

Aktywny onkogen c-myc zwiększa generację RFT, co prowadzi do uszkodzenia DNA i osłabienia lub zahamowania funkcji biologicznych p53. Wykazano również, że allel RAS2 (val19), który powoduje konstytutywną aktywację ścieżki cAMP-PKA, prowadzi do wzrostu wytwarzania RFT, a tym samym sprzyja powstawaniu oksydacyjnych uszkodzeń w makrocząsteczkach komórkowych, co prowadzi do procesu nowotworowego przez promowanie niekontrolowanego wzrostu, nabycie przez komórki zdolności do inwazji, tworzenia przerzutów, nasilenie procesów angiogenezy oraz blokowanie apoptozy. Powyższy mechanizm wskazuje na indukowaną onkogenami niestabilność genetyczną w komórkach nowotworowych [47,91].

Aktywacja w fibroblastach onkogenów *scn* i *ras* sprawia, że ich produkty białkowe (np. czynnik *rac*) aktywują błonową NADPH oksydazę, co prowadzi do zwiększonego wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego, który wydaje się ważnym czynnikiem w procesie proliferacji. W wyniku onkogennej mutacji, następują zmiany w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych, a to powoduje transformację nowotworową [79].

Inny możliwy mechanizm, dzięki któremu dochodzi w komórkach nowotworowych do powstawania zwiększonych ilości RFT jest związany z zaburzeniami w funkcjonowaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Wiadomo,

że mtDNA koduje 13 składników kompleksów enzymatycznych łańcucha oddechowego. Ponieważ nie zawiera on intronów jest wysoce prawdopodobne, że mutacje mtDNA będą wpływać na funkcje kodowanych przez nie białek, a tym samym prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego. Wykazano, że mtDNA jest bardziej podatny na uszkodzenia niż DNA jądrowy. Mutacje mtDNA są często obserwowane w komórkach nowotworowych [9,30].

Ponieważ mitochondrialny łańcuch oddechowy jest głównym miejscem wytwarzania RFT, to dysfunkcje spowodowane mutacjami mtDNA jeszcze bardziej nasilają ten proces. Wydaje się więc, że istnieje korelacja pomiędzy mutacjami w mtDNA, a wzrostem stężenia RFT w komórkach nowotworowych [9,69].

Aktywne metabolicznie komórki nowotworowe w celu utrzymania swoich biochemicznych funkcji wymagają ciągłego dostarczania dużych ilości ATP (stąd nasilona w nich glikoliza), co wymaga intensywnego działania łańcucha oddechowego. Sprzyja to jednak wytwarzaniu zwiększonych ilości RFT i powstawaniu uszkodzeń oksydacyjnych mtDNA, prowadzących ostatecznie do deficytu ATP [47,69].

Wewnątrzkomórkowy poziom RFT jest zależny od równowagi pomiędzy ich wytwarzaniem a eliminowaniem. Do akumulowania dużych ilości RFT w komórkach może również prowadzić zmniejszenie ekspresji czy obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Wykazane w pewnych typach komórek nowotworowych obniżenie aktywności dysmutazy nadadtlenkowej (zwłaszcza MnSOD) powoduje zmniejszenie ich zdolności do usuwania anionorodnika nadadtlenkowego, prekursora pozostałych RFT i nasilenie stresu oksydacyjnego [52, 86].

MECHANIZMY CHRONIĄCE KOMÓRKI PRZED TOKSYCZNYM DZIAŁANIEM RFT

Komórki organizmów żywych mają wiele mechanizmów obronnych, umożliwiających prawidłowe funkcjonowanie w obecności nadmiaru RFT. Usuwanie nadmiaru toksycznych dla komórek RFT, chroni je przed strukturalnym i funkcjonalnym zniszczeniem. System antyoksydacyjny komórek obejmuje wiele składników, które ze sobą współdziałają. Niedobór każdego z nich może powodować obniżenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego komórki. Działanie systemu ochronnego w komórkach polega na: niedopuszczeniu do powstawania i oddziaływania RFT ze składnikami komórki (pierwsza linia obrony), przerywaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych (druga linia obrony) i usuwaniu skutków reakcji RFT z makrocząsteczkami komórkowymi (trzecia linia obrony) [29,32].

Elementem pierwszej linii obrony są przede wszystkim białka wiążące jony metali przejściowych (głównie żelazo, miedź) – sekwestr metali. Drugą linię obrony stanowią enzymy antyoksydacyjne oraz endo- i egzogenne niskocząsteczkowe antyoksydanty. Są one odpowiedzialne za neutralizację nadmiaru RFT zarówno w cytoplazmie jak i mitochondriach oraz w innych przedziałach komórki [39,78].

W skład enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego wchodzi: izoenzymy dysmutazy nadadtlenkowej (SOD);



E.C. 1.5.1.1), katalaza (CAT; E.C.1.11.1.6), peroksydazy glutationowe (GSHPx; E.C. 1.11.1.9), transferaza glutationowa (GST; E.C. 2.5.1.18) oraz reduktaza glutationowa (GSHR; E.C. 1.6.4.2.) i dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD; E.C. 1.1.1.49).

Komórki zmienione nowotworowo w porównaniu z komórkami prawidłowymi wykazują zmieniony poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych. W komórkach wielu typów nowotworów stwierdzono zmniejszoną aktywność CuZnSOD i MnSOD oraz CAT. W badaniach *in vitro* i *in vivo* zaobserwowano, że obniżenie aktywności obu izoenzymów SOD, przy jednoczesnym podwyższeniu poziomu anionorodnika ponadtlenkowego jest bardzo charakterystyczne dla wielu typów komórek nowotworowych. Brak lub obniżoną aktywność MnSOD obserwowano w różnych nowotworach wątroby, gruczolakach, nowotworze płuc i innych. Zaobserwowane zmiany aktywności tego enzymu zależały nie tylko od typu nowotworu, ale również i stadium jego rozwoju [5,52,85].

Natomiast enzymy GSH-zależne (GSPx, GSHR, GST czy G6PD), w zależności od typu nowotworu charakteryzują się zmienną aktywnością. W ludzkich tkankach nowotworowych obserwowano wzrost ich aktywności [85].

Mała aktywność SOD i CAT w komórkach nowotworowych powoduje gromadzenie w nich RFT, natomiast wysoki poziom aktywności enzymów GSH-zależnych znosi ich toksyczne działanie. Podwyższenie aktywności GSHPx w komórkach nowotworowych przy jednoczesnym obniżonym poziomie CAT wskazują na ich kompensacyjne działanie w unieczynnianiu nadtlenu wodoru. Istnieją sugestie, że wyselekcjonowane spośród komórek prawidłowych, komórki z małą aktywnością SOD i CAT oraz podwyższonym poziomem aktywności GST i przy zmiennej aktywności GSHPx i GSHR tworzą ostatecznie guz nowotworowy [5,85].

Współdziałanie enzymów antyoksydacyjnych w prawidłowych komórkach jest skuteczne, jeśli ich ekspresja i aktywność są w ściśle określonych proporcjach. Zmiany poziomu ekspresji i aktywności poszczególnych enzymów zakłócają równowagę, co może być przyczyną nie tylko powstawania, ale i rozwoju nowotworów [5,29,46,52,85].

Mimo intensywne badania nie ma jednoznacznych danych czy istnieje zależność pomiędzy poziomem aktywności poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych a typem nowotworu czy stadiami jego rozwoju. Nie ma też ostatecznych dowodów, że obserwowane zmiany są przyczyną, czy skutkiem kancerogenezy.

Działanie enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego zarówno w komórkach prawidłowych i nowotworowych jest wspomagane przez endo- i egzogenne niskocząsteczkowe antyoksydanty, do których należą tiole, glutation (GSH), cysteina, tioredoksyna (TRX), kwas askorbowy/kwas askorbinowy, kwas moczowy, α -tokoferol, retinol i jego pochodne oraz ubichinon, bilirubina, ceruloplazmina, transferyna, albuminy, karotenoidy, flawonoidy [5,29]. Nieenzymatyczny system antyoksydacyjny, do którego zalicza się głównie związki drobnocząsteczkowe, mimo odrębnej lokalizacji (faza wodna i faza lipidowa), tworzą

system połączeń tzw. sieci antyoksydacyjnej, pozwalający im skutecznie współdziałać. Nieenzymatyczne antyoksydanty, chroniące komórki przed skutkami stresu oksydacyjnego, są stosunkowo mało efektywne w porównaniu z działaniem enzymów antyoksydacyjnych. Dopiero razem z enzymami stanowią skuteczną linię obrony przed stresem oksydacyjnym [29].

Trzecią linię obrony przed toksycznym działaniem RFT stanowią enzymatyczne systemy naprawcze odpowiedzialne za likwidację skutków ich działania na DNA. Jeśli mimo działania enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych, stres oksydacyjny spowoduje uszkodzenia w tej strategicznej dla komórki makrocząsteczce, dochodzi do aktywacji enzymów o funkcjach naprawczych. Do enzymów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń w jądrowym i w mniejszym stopniu mitochondrialnym DNA zaliczamy m.in.: ligazy (reperujące pęknięcia nici DNA), glikozylazy (odcinające uszkodzone zasady azotowe) i enzymatyczny system SOS, który w przypadku powstania zbyt wielu uszkodzeń dokonuje szybkiej, ale niedokładnej naprawy DNA [5,77].

NASTĘPSTWA STRESU OKSYDACYJNEGO W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

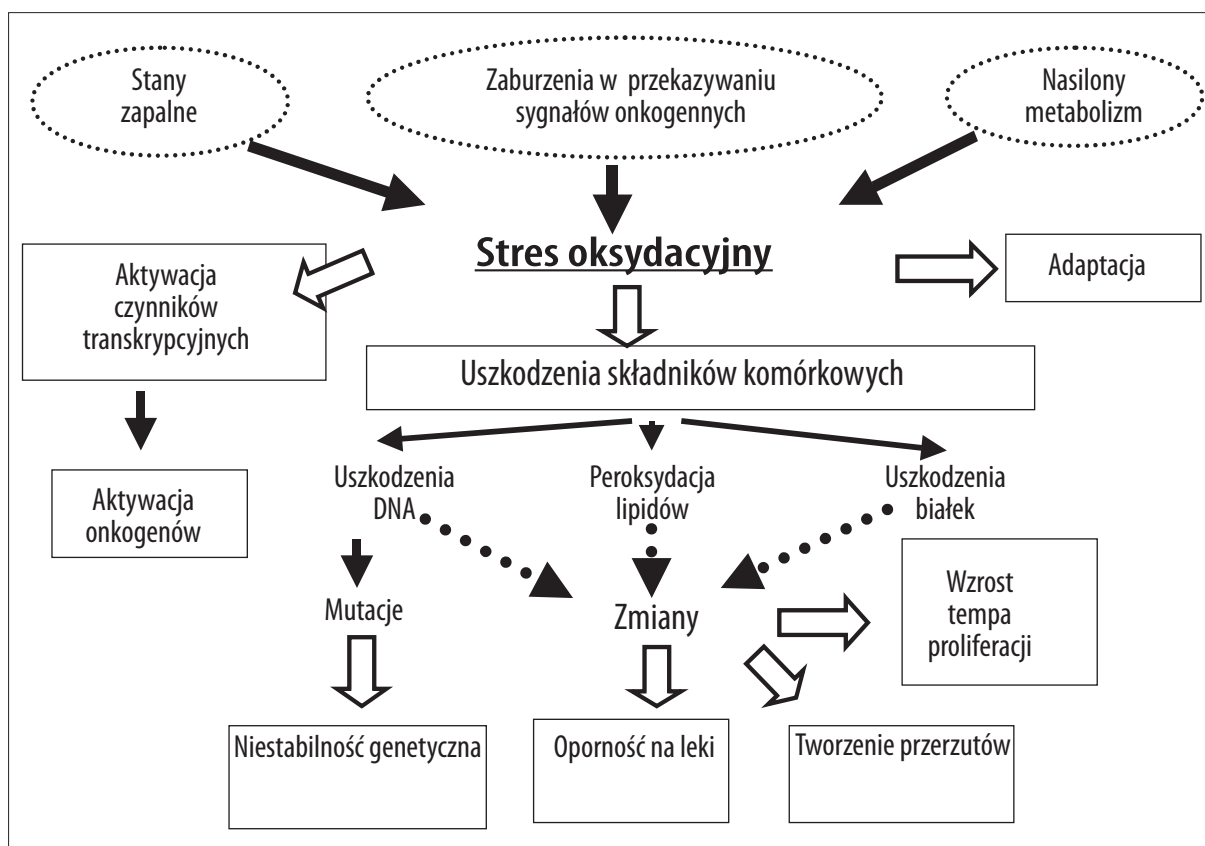
Ostatnio wzrasta liczba dowodów sugerujących, że komórki nowotworowe są narażone na zwiększony stres oksydacyjny w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Należą do nich m. in.: zwiększone wytwarzanie RFT i akumulacja produktów ich działania w komórkach nowotworowych, obecność tych produktów w osoczu krwi i moczu chorych na nowotwory, czy podwyższona ekspresja niektórych enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Zwiększone wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego wykazano np. w mitochondriach komórek raka wątroby w porównaniu z komórkami niezmiennymi nowotworowo, mimo że mechanizm powstawania tego rodnika wydaje się taki sam w obu typach komórek. Obserwacje te wskazują, że czynniki onkogenne w komórkach nowotworowych mogą prowadzić do stymulowania wytwarzania zwiększonych ilości anionorodnika ponadtlenkowego. Dobrze udokumentowano zdolność onkogenów, takich jak c-myc i ras do indukcji wytwarzania RFT [47,91].

Wzrost stężenia RFT w komórkach nowotworowych prowadzi u nich do indukcji różnych odpowiedzi biologicznych, obejmujących krótkotrwałe zatrzymanie wzrostu i adaptację komórek, wzrostu tempa proliferacji, całkowite zatrzymanie wzrostu i starzenie, apoptozę i nekrozę [12,22,64].

Następstwem zwiększonych ilości RFT w komórkach nowotworowych jest stymulacja podziałów komórkowych, powstawanie mutacji, prowadzące do niestabilności genomu czy zmiany we wrażliwości komórkowej na leki przeciwnowotworowe.

Zdolność do adaptacji

Komórki w warunkach stresu oksydacyjnego są zdolne do wytworzenia różnych mechanizmów adaptacyjnych, które chronią je przed skutkami działania RFT. Komórkowe me-



Ryc. 1. Przyczyny i skutki stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych

mechanizmy obronne obejmują systemy buforujące równowagę redoks i enzymatyczny system antyoksydacyjny wspomagany przez niskocząsteczkowe endo- i egzogenne antyoksydanty (np. GSH, witaminy A, E i C). Najpowszechniej występującym systemem, który odpowiada za utrzymanie równowagi redoks w komórce jest system glutationowy (GSH/GSSG), wspomagany działaniem enzymów GSH-zależnych (GSHPx, GST i GSHR czy G6PD) [78]. Innym potencjalnym mechanizmem, dzięki któremu komórka broni się przed toksycznym działaniem RFT jest system tioredoksyny (TRX) [5,59]. Mobilizacja systemów buforujących redoks może być uważana za pierwszą linię komórkowej adaptacji do stresu oksydacyjnego. Zwiększenie ekspresji enzymów antyoksydacyjnych i w konsekwencji podwyższenie ich aktywności stanowi dodatkowy i ważny mechanizm, który umożliwia skuteczną ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym. Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych czy podwyższenie stężeń antyoksydantów umożliwia komórkom przeżycie w warunkach ich narażenia na działanie RFT [64].

W warunkach długotrwałego stresu oksydacyjnego w komórkach dochodzi do zużycia mechanizmów adaptacyjnych i wyczerpania zdolności buforowania. Procesy adaptacyjne w komórkach mają bowiem ograniczoną zdolność przystosowywania ich do stresu oksydacyjnego. Zadziałanie na takie komórki zewnętrznym dużym stężeniem RFT może prowadzić do nasilenia stresu oksydacyjnego do takiego poziomu, który spowoduje ich śmierć. Obserwacje te mogą mieć potencjalne zastosowanie terapeutyczne w terapii przeciwnowotworowej [12,22].

Uszkodzenia składników komórkowych

Nasilony stres oksydacyjny może powodować liczne oksydacyjne uszkodzenia ważnych składników komórkowych np. DNA, białek i lipidów błonowych. Charakterystycznymi objawami stresu oksydacyjnego jest upośledzenie funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego, co prowadzi do deficytu ATP w komórkach [12]. Zmiany oksydacyjne w białkach mogą zaburzać równowagę redoks niezbędną do prawidłowego funkcjonowania wielu enzymów, zawierających jony metali np. cytochromu c i jego oksydazy, GSHPx i CAT. Oksydacyjne uszkodzenia GSHPx i CAT zmniejszają zdolność eliminowania nadtlenu wodoru, co dodatkowo nasila stres oksydacyjny w komórce. Z kolei proces nitrozytacji białek może wpływać na funkcję cząsteczek sygnalizacyjnych m.in. NF-κB, AP-1 i p53 [60,63].

W następstwie peroksydacji lipidów dochodzi do obniżenia płynności błon i zwiększenia ich przepuszczalności. W związku z tym, że największe ilości anionorodnika ponadtlenkowego generowane są w łańcuchu oddechowym, najbardziej narażona na uszkodzenia jest błona mitochondrialna. W wyniku tych uszkodzeń dochodzi do uwalniania cytochromu c i aktywacji kaskady apoptotycznej. Wykazano, że zwiększone stężenie RFT w komórkach prowadzi do inicjacji procesu apoptozy [72].

Zaobserwowano, że w limfocytach T hodowanych w warunkach, w których akumulują się znaczne ilości RFT, dochodzi do aktywacji ekspresji Bcl-2. Oddziałuje on z me-



diatorem śmierci komórki (BIM) i indukowaną syntazą tlenu azotu (iNOS), co prowadzi do apoptozy komórek. Wykazano, że droga ta jest hamowana przez antyoksydanty [76]. Znaczne zmiany oksydacyjne w ważnych makrocząsteczkach komórkowych, spowodowane wysokim stężeniem RFT, mogą ostatecznie prowadzić do nekrozy komórki [45].

Niestabilność genetyczna

Uszkodzenia DNA spowodowane działaniem RFT należą do najczęściej występujących uszkodzeń tej makrocząsteczki. Uszkodzenia mtDNA wywołują dysfunkcję łańcucha oddechowego, czego następstwem jest dalsze zwiększenie ilości RFT w komórce. Ich działanie prowadzi do powstawania kolejnych mutacji w DNA i niestabilności genetycznej komórek. W prawidłowych komórkach stabilność genomu jest utrzymywana dzięki równowadze pomiędzy uszkodzeniami DNA a złożonymi mechanizmami naprawczymi, odpowiedzialnymi za ich eliminowanie [37,51].

Duże stężenie RFT powoduje, że wzrasta liczba oksydacyjnych uszkodzeń DNA, które nie ulegają naprawie i kumulują się w komórkach. Ekspozycja komórek organizmu na czynniki wywołujące nasilony, długotrwały stres oksydacyjny przyczynia się do gromadzenia uszkodzeń w DNA, które ostatecznie mogą prowadzić do inicjacji procesu nowotworowego [56,89].

Pierwszy etap kancerogenezy – inicjacja (poprzedzona preinicjacja) jest związany z wytworzeniem trwałych zmian w materiale genetycznym komórki, wskutek działania chemicznych, biologicznych i fizycznych czynników mutagennych lub kancerogennych. Na tym etapie powstawania nowotworów szczególną rolę przypisuje się działaniu RFT [55].

W wielu typach komórek nowotworowych wykazano obecność w DNA swoistych modyfikacji oksydacyjnych zasad azotowych, związanych z działaniem RFT. Są one odpowiedzialne za indukcję mutacji punktowych w genach (protoonkogenach i antyonkogenach), odpowiedzialnych za wzrost, podział, różnicowanie i dojrzewanie komórek czy adhezję międzykomórkową. Jedną z najczęściej występujących modyfikacji oksydacyjnych zasad azotowych w DNA jest 8-OH-guanina, której obecność może powodować mutację typu transwersji G-C → T-A. Tęgo typu mutacja jest często wykrywana w onkogenie *RAS* i stanowi jeden z możliwych mechanizmów inicjacji transformacji nowotworowej przez RFT [6,61].

Aktywacja onkogenów i inaktywacja genów supresorowych, jako wynik mutacji punktowych spowodowanych działaniem RFT, prowadzi nie tylko do inicjacji procesu kancerogenezy, ale może również sprzyjać progresji nowotworowej.

Stan redoks w komórce może również bezpośrednio oddziaływać na czynniki transkrypcyjne, związane z transkrypcją genów odpowiedzialnych za proliferację lub śmierć komórki. W przypadku komórek ssaków wykazano, że RFT działają bezpośrednio na aktywność należącego do rodziny onkogenów *REL* – czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Wiele genów, w tym geny związane ze wzrostem

i proliferacją komórek, pozostaje pod kontrolą białek rodziny Rel [83,88].

Wzrost tempa proliferacji

Wiadomo, że RFT (H_2O_2 i $O_2^{\cdot -}$) mogą pełnić funkcję wtórnych przekaźników w ścieżkach sygnalizacyjnych komórek. W wielu badaniach wykazano, że stan redoks komórki wpływa regulacyjnie na proliferację, apoptozę, ekspresję różnych cytokin, cząsteczek adhezyjnych i ich receptorów oraz angiogenezę. Ostateczne skutki działania stresu oksydacyjnego na komórkę są uwarunkowane stopniem uszkodzeń i zmian jakie w niej zaszły. W wyniku działania RFT komórka może zyskać zdolność do transformacji nowotworowej lub utracić swoje funkcje biologiczne i wejść na drogę prowadzącą do jej śmierci [38,50].

Istnieje wiele dowodów, wskazujących na udział RFT w promocii proliferacji komórek, które wcześniej przeszły etap inicjacji pod wpływem działania czynników mutagennych. Wykazano, że wysoki poziom stresu oksydacyjnego działa toksycznie na komórki i hamuje proliferację, natomiast umiarkowany wzrost stężenia pewnych RFT (np. H_2O_2) może prowadzić do nasilenia wzrostu komórkowego i proliferacji, a tym samym przyczyniać się do rozwoju nowotworu [10,79]. Szczególnie ważną rolę w regulacji proliferacji i apoptozy komórek odgrywa H_2O_2 . W zależności od jego stężenia komórka może się dzielić lub podlegać apoptozie, a w szczególnych warunkach nekrozie. W warunkach fizjologicznych stężenie H_2O_2 w komórce jest niskie i mieści się w granicach 5–50 nM [2,5].

Stopniowy wzrost jego ilości w komórce, ale do poziomu nieprzekraczającego 0,7 μ M, uruchamia w niej mechanizmy, które prowadzą do proliferacji. Jeśli stężenie H_2O_2 w komórce przekroczy ten poziom i osiągnie wartość 1–3 μ M, dochodzi do indukcji apoptozy. Z kolei przekroczenie stężenia 3 μ M jest dla komórki toksyczne i prowadzi do nekrozy [2].

Mechanizmy odpowiedzialne za nasilenie proliferacji komórkowej obejmują prawdopodobnie bezpośrednio oddziaływanie RFT ze swoistymi receptorami i modulowanie aktywności ważnych czynników sygnałowych, takich jak kinazy białkowe czy czynniki transkrypcyjne. Aktywacja tych czynników prowadzi do zmiany ich aktywności, czego konsekwencją jest ciągła proliferacja komórek [56,88].

Wykazano, że RFT modulują zdolność tioredoksyny (TRX) do hamowania aktywności ASK1 (kinaza 1 sygnalizująca apoptozę, należąca do rodziny MAP3K). Jest ona zaangażowana w ścieżki sygnałowe pomiędzy receptorem TNF a aktywowanymi stresem oksydacyjnym kinazami białkowymi (SAPK czy JNK). Utlenienie TRX powoduje oddysocjowanie TRX od ASK1, następstwem czego jest aktywacja SAPK/JNK z udziałem TRAF2 [59]. Ścieżka sygnałowa MAPK jest głównym mechanizmem regulacyjnym, zaangażowanym w liczne procesy komórkowe, w tym proliferację komórek. Za modulację wzrostu i przeżycia komórek odpowiedzialne są również, modyfikacje oksydacyjne wrażliwych na zmiany stanu redoks czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- κ B i HIF-1 α oraz pośrednich cząsteczek sygnałowych, takich jak PKC, ERK czy JNK [64].

Wykazano, że utlenienie reszt cysteiny w białku p53 wpływa negatywnie na jego zdolność do wiązania z domeną regulacyjną DNA, co skutkuje zmianami w regulacji ekspresji określonych genów. Wydaje się więc, że RFT poprzez wpływ na działanie regulacyjne p53 w cyklu komórkowym uczestniczą w stymulacji niekontrolowanych podziałów komórkowych [84,95].

RFT są również odpowiedzialne za wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w komórkach. Jest to możliwe dzięki mobilizacji rezerw wewnątrzkomórkowych i napływie Ca^{2+} z zewnątrz. RFT-zależne zmiany stężenia jonów Ca^{2+} w komórce mogą wpływać regulacyjnie na transkrypcję genów zaangażowanych we wzrost i proliferację komórek [70]. Odbywa się to za pośrednictwem złożonych kaskad fosforylacji i aktywacji odpowiednich czynników transkrypcyjnych [26].

Ścisły związek pomiędzy poziomem RFT i promocją procesu kancerogenezy może tłumaczyć, dlaczego duża tolerancja na stres oksydacyjny zainicjowanych w procesie kancerogenezy komórek, jest bardzo często związana z podwyższoną aktywnością niektórych enzymów antyoksydacyjnych [25,71,80,86]. Przy wzmożonej proliferacji komórek jest bowiem istotne utrzymanie w nich takiego stężenia RFT, które nie będzie dla nich toksyczne i będzie stymulować podziały komórkowe [68].

Tworzenie przerzutów

Końcowym etapem w rozwoju raka jest nabycie przez komórki właściwości zezłośliwienia, które obejmują przyspieszony wzrost, ucieczkę spod nadzoru układu immunologicznego, inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów. Większość tych właściwości jest związana z pojawieniem się w materiale genetycznym dodatkowych uszkodzeń. Wiele badań wykonanych na modelach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* wskazuje, że zwiększone stężenie RFT w komórkach nowotworowych powoduje trwały stan stresu oksydacyjnego, który zwiększa niestabilność materiału genetycznego. Wiąże się to z kolejnymi mutacjami w genach biorących udział w regulacji mechanizmów kontrolujących podziały, wzrost i różnicowanie komórek, biorących udział w szlaku prowadzącym do apoptozy, w naprawie uszkodzeń DNA oraz uczestniczących w procesie angiogenezy i tworzeniu przerzutów nowotworowych [26, 68].

STRES OKSYDACYJNY A TERAPIA PRZECIWNOWOTWOROWA

Nadmierna synteza RFT w komórkach nowotworowych powoduje, że są one uzależnione od działania enzymów antyoksydacyjnych, które umożliwiają im przeżycie w warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego. Długotrwały stres oksydacyjny, spowodowany ciągłym działaniem sygnałów onkogennych i aktywnym metabolizmem komórek nowotworowych, wymaga pełnej mobilizacji enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów antyoksydacyjnych komórek.

Zdolność RFT do indukcji licznych uszkodzeń komórkowych i w efekcie do śmierci komórki stwarza możliwości wykorzystania zjawiska wytwarzania RFT w leczeniu, do eliminowania komórek nowotworowych. Uważa się, że długotrwały stres oksydacyjny oraz wystawienie komórek nowotworowych na działanie leków generujących RFT może

wyczerpywać ich mechanizmy antyoksydacyjne i po przekroczeniu „progowego” stężenia wolnych rodników w komórkach, prowadzić do apoptozy [57]. Na tej podstawie można przypuszczać, że komórki nowotworowe, charakteryzujące się podwyższonym wewnętrznym stężeniem RFT, powinny być bardziej niż prawidłowe komórki wrażliwe na leki antynowotworowe, których działanie polega na zwiększeniu stresu oksydacyjnego czy obniżaniu zdolności komórek do obrony antyoksydacyjnej.

Wiedza na temat udziału RFT i roli obrony antyoksydacyjnej w powstawaniu i rozwoju nowotworów została wykorzystana do opracowania nowych strategii ich leczenia. Polegają one przede wszystkim na:

- bezpośrednim działaniu czynników wytwarzających RFT (np. leki, promieniowanie);
- inhibicji enzymów antyoksydacyjnych;
- zmniejszeniu potencjału redoks w komórkach nowotworowych [58,65,66].

Powyższe strategie wywodzą się ze zrozumienia biologii nowotworu oraz danych doświadczalnych dotyczących skuteczności różnych metod leczniczych (chirurgia, chemioterapia, radioterapia, immunoterapia czy hormonoterapia). Ich głównym celem jest skuteczne zwalczanie komórek nowotworowych, bez działań niepożądanych.

Pierwsza strategia jest oparta na działaniu wielu leków stosowanych w chemioterapii, a także radioterapii wykorzystującej promieniowanie jonizujące, którym towarzyszy wytwarzanie dużych ilości RFT w komórkach nowotworowych, co prowadzi do nieodwracalnych w nich uszkodzeń oraz wyczerpywania zdolności antyoksydacyjnych i innych mechanizmów obronnych [58].

W prawidłowych komórkach występuje niskie stężenie RFT i dzięki temu mają one większą zdolność do obrony przed stresem oksydacyjnym niż komórki nowotworowe. W związku z tym można w tej strategii wykorzystać związki, które pośrednio lub bezpośrednio generują RFT i wykazują selektywność terapeutyczną, prowadząc preferencyjnie do śmierci komórek nowotworowych [53,66,68,82].

Do związków tego typu należy wiele leków przeciwnowotworowych (np. antracykliny, bleomycyna, cisplatyna, trójtlenek arsenu) [65,72]. Antracykliny, takie jak daunorubicyna (nazwa międzynarodowa: Daunorubicin), mają zdolność do oddziaływania w obecności zredukowanego NADPH z reduktazą cytochromu P-450, co powoduje wytwarzanie rodników semichinonowych, które z kolei reagując z tlenem wytwarzają inne rodniki. Wytwarzane w ten sposób RFT mogą aktywować sfingomielinazę, a tym samym prowadzić do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia ceramidu, aktywacji ścieżki JNK/SAPK i ostatecznie apoptozy [36]. Inny lek z grupy antracyklin – doksorubicyna (nazwa międzynarodowa: Doxorubicin) – nasila wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru, co może stymulować uszkodzenia w mitochondriach i prowadzić do aktywacji p53-zależnej ścieżki apoptozy [90]. Wykazano również, że wytwarzanie zwiększonych ilości RFT odgrywa znaczącą rolę w stymulowaniu apoptozy przez cisplatynę, bleomycynę. Ten sam efekt działania obserwowano dla różnego typu promieniowania (np. UV) [13,72].



Jednym z głównych skutków działania trójtlenku arsenu (ATO) jest również wytwarzanie zwiększonych ilości RFT, co prowadzi do utraty przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej. Wykazano, że może on uszkadzać składniki mitochondrialnego łańcucha oddechowego, powodując zwiększenie ilości anionorodnika ponadtlenkowego w komórce, prawdopodobnie w wyniku wycieku elektronów z I i III kompleksu łańcucha oddechowego. Cytotoksyczność ATO podwyższa selektywnie w komórkach nowotworowych naturalna antrachinonowa pochodna (Emodin), która zwiększa wytwarzanie RFT i dodatkowo wzmacnia RFT-zależną inhibicję ścieżek sygnalizacyjnych, związanych z przeżyciem komórek [53].

Obiecującą metodą leczenia niektórych typów nowotworów (np. głowy i szyi, przelyku, żołądka, szyjki macicy czy pęcherza moczowego), w której wytwarzane są RFT jest terapia fotodynamiczna. Zastosowanie w niej selektywnego leku fotoczułującego (np. Metvix, Photofrin, Foscan), światła laserowego i tlenu prowadzi do złożonych reakcji fotochemicznych, którym towarzyszy powstawanie w komórkach nowotworowych RFT, odpowiedzialnych za uszkodzenia w nich struktur wewnątrzkomórkowych i indukcję apoptozy. Przeciwnowotworowe działanie terapii fotodynamicznej polega przede wszystkim na bezpośrednim niszczeniu komórek nowotworowych i naczyń odżywiających guz [35].

Niestety, zastosowane w terapii czynniki (leki czy promieniowanie) mogą generować RFT również w komórkach prawidłowych otaczających guz, co stanowi bardzo często efekt niepożądany w leczeniu nowotworów.

Druga strategia terapeutyczna zakłada stosowanie inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych w celu wywołania w komórkach nowotworowych apoptozy [57].

Bardzo ważną rolę w ochronie komórek organizmu przed działaniem RFT odgrywają enzymy antyoksydacyjne, do których należą SOD, CAT, GSHPx, GST, GSHR i G6PH. Zahamowanie ich aktywności wydaje się decydującym czynnikiem, zmniejszającym zdolność komórek do obrony przed zwiększonym stężeniem RFT [49,58].

Ponieważ komórki nowotworowe charakteryzują się wytwarzaniem dużych ilości RFT to ich przeżycie jest zależne od aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Wynika z tego, że nie tylko ekspozycja komórek nowotworowych na działanie dużych zewnętrznych stężeń RFT, ale również zahamowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych może spowodować w nich większe uszkodzenia oksydacyjne niż w komórkach prawidłowych i wywołać apoptozę. Hipoteza ta została poparta wynikami badań, w których wykazano, że komórki nowotworowe chorych z leukemią i rakiem jajnika są bardziej wrażliwe na hamowanie aktywności SOD przez 2-metoksyestradiolu (2-ME) niż komórki prawidłowe, i że ich wrażliwość na 2-ME jest skorelowana z wysokim poziomem stresu oksydacyjnego. Również skuteczność terapii fotodynamicznej wzrastała po zahamowaniu aktywności SOD [35,45,66,96].

Mechanizm działania 2-ME polega u chorych z leukemią na hamowaniu aktywności SOD, co powoduje gromadzenie w komórkach znacznych ilości anionorodnika po-

nadtlenkowego. Skutkiem tej akumulacji są: uszkodzenie błon mitochondrialnych, uwalnianie z nich cytochromu c i aktywacja apoptozy w komórkach nowotworowych [49]. Interesujące i ważne jest to, że 2-ME ma minimalne działanie cytotoksyczne na prawidłowe leukocyty, charakteryzujące się mniejszym wewnątrzkomórkowym stężeniem RFT. Stopień indukcji apoptozy przez 2-ME w komórkach nowotworowych w leukemii był silnie skorelowany zarówno z początkowym stężeniem anionorodnika ponadtlenkowego, jak i stopniem wzrostu jego stężenia indukowanego przez ten związek [96]. Wiele z przebadanych pod kątem zdolności do hamowania aktywności SOD analogów 2-ME wykazało taką zdolność o potencjale zbliżonym do 2-ME. Obecnie 2-ME i jego analogi są używane w leczeniu niektórych typów nowotworów [35,94]. Z kolei dietyloditiokarbaminian (nazwa międzynarodowa: Dietyloditiocarbamate – DETCA), wykazuje zdolność do hamowania aktywności CuZnSOD poprzez chelatowanie jonów miedzi, występujących w centrum katalitycznym enzymu [93].

Kolejna strategia walki z nowotworami zakłada obniżenie w komórkach nowotworowych potencjału redoks. Jest to możliwe m.in. dzięki zastosowaniu leków bezpośrednio wpływających na system GSH/GSSG, gdzie GSH stanowi wewnątrzkomórkowy „bufor tiolowy” chroniący komórki przed licznymi chemioterapeutykami, np. ATO i cisplatiną [24].

Związek taki jak butioninosulfoksymina (nazwa międzynarodowa: L-buthionine-S,R-sulfoximine – BSO), który hamuje syntezę α -glutamylcysteiny, obniża wewnątrzkomórkowe stężenie GSH i wzmacnia działanie proapoptyczne ATO w komórkach nowotworowych NB4. Z kolei zastosowanie antyoksydantu N-acetylocysteiny (NAC) zabezpiecza GSH i chroni te komórki przed indukowaną przez ATO apoptozą [24].

Kwas askorbowy uważany za związek o silnej aktywności antyoksydacyjnej może ulegać autoutlenianiu, które prowadzi do podwyższania stężenia nadtlenu wodoru w komórce i obniżenia poziomu zredukowanego GSH. Wykazano, że kwas askorbowy działa synergistycznie z ATO w stosunku do linii komórkowych HL-60, a także komórek nowotworowych pochodzących od chorych z leukemią czy rakiem sutka. Prawidłowe komórki wykazują mniejszą wrażliwość na synergistyczne działanie tych związków, co może być również związane z wyższą w nich aktywnością katalazy [21]. Enzymy, takie jak reduktaza glutationowa, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, γ -glutamylotranspeptydaza i syntetaza glutationowa odgrywają dużą rolę w uzupełnianiu siły redukcyjnej GSH/GSSG komórki. Zahamowanie ich aktywności obniża jej działanie w komórkach nowotworowych [5,85].

Ponieważ ostateczny poziom RFT w komórkach zależy zarówno od ich wytwarzania jak i od mechanizmów odpowiedzialnych za ich usuwanie, dlatego uzasadnione wydaje się stosowanie w terapii przeciwnowotworowej leków generujących RFT w połączeniu z inhibitorami enzymów antyoksydacyjnych. Połączenie strategii pozwala na uzyskanie toksycznego dla komórek nowotworowych poziomu stresu oksydacyjnego. Przykładem takiego działania może być zastosowanie kombinacji generującego wolne rodniki tlenowe ATO i inhibitora dysmutazy ponadtlenko-

wej 2-ME w leczeniu leukemii. Zastosowanie tych leków w takiej kombinacji pozwala na eliminację oporności na działanie 2-ME obserwowanej w przypadku komórek charakteryzujących się niewielkim wewnętrznym stężeniem anionorodnika ponatlenkowego [96].

Zastosowanie inhibitorów syntezy GSH np. BSO z jednoczesnym podaniem leków generujących RFT również podwyższa znacznie stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych. Dodatkowo obniżenie poziomu GSH w komórkach nowotworowych, może zapoczątkować proces różnicowania, co może znacząco zwiększać ich podatność na działanie podwyższonych stężeń RFT [82].

Terapia przeciwnowotworowa polega nie tylko na zastosowaniu różnych strategii czy metod leczenia, ale również na profilaktyce. Ze względu na udowodnienie, że RFT powodują uszkodzenia komórek organizmu i uczestniczą w patogenezie nowotworów coraz większą uwagę powinno się przywiązywać do prawidłowej diety i profilaktycznego stosowania antyoksydantów. Wiele badań epidemiologicznych wskazuje na odwrotną zależność między konsumpcją warzyw i owoców a częstością zachorowania na nowotwory. Dieta bogata w owoce i warzywa dostarcza do organizmu wiele związków o aktywności antyoksydacyjnej m.in. witamin, głównie A, E i C oraz fitozwiązków (np. flawonoidów).

PIŚMIENICTWO

- [1] Alvarez B., Radi R.: Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*, 2003; 25: 295–311
- [2] Antunes F., Cadenas E.: Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H_2O_2 : submicromolar levels of H_2O_2 induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30: 1008–1018
- [3] Ashkenazi A., Dixit V.M.: Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999; 11: 255–260
- [4] Aust A.E., Eveleigh J.F.: Mechanisms of DNA oxidation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999; 222: 246–252
- [5] Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN (wydanie drugie zmienione), Warszawa 2003
- [6] Bartsch H., Nair J.: Exocyclic, DNA adducts as secondary markers of oxidative stress: applications in human cancer etiology and risk assessment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2001; 500: 675–686
- [7] Beal M.F.: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 32: 797–803
- [8] Beckman J.S., Koppenol W.H.: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996; 271: C1424–C1437
- [9] Beckman K.B., Ames B.N.: Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat. Res.*, 1999; 424: 51–58
- [10] Behrend L., Henderson G., Zwacka R.M.: Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003; 31: 1441–1444
- [11] Bishop J.M., Weinberg R.A.: *Molecular Oncology*. Scientific American, Inc, New York, 1996
- [12] Brown G.C., Borutaite V.: Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life*, 2001; 52: 189–195
- [13] Chan W.H., Yu J.S.: Inhibition of UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermal carcinoma A431 cells by genistein. *J. Cell. Biochem.*, 2000; 78: 73–84
- [14] Chorąży M.: Molekularne aspekty kancerogenezy. *Nowotwory*, 1997; 47: 251–264
- [15] Christofori G., Semb H.: The role of cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.*, 1999; 24: 73–76
- [16] Ciolono H.P., Levine R.L.: Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997; 22: 1277–1282
- [17] Cisowski J.: Wpływ stanu redoks komórki na aktywację czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów. *Post. Biol. Kom.*, 2001; 28(Suppl.16): 43–59
- [18] Conner E.M., Grisham M.B.: Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 1996; 12: 274–277
- [19] Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J.: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 2003; 17: 1195–1214
- [20] Counter C.M., Hahn W.C., Wei W., Caddle S.D., Beijersbergen R.L., Lansdorf P.M., Sedivy J.M., Weinberg R.A.: Dissociation among *in vitro* telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14723–14728
- [21] Dai J., Weinberg R.S., Waxman S., Jing Y.: Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood*, 1999; 93: 268–277
- [22] Das K.C., White C.W.: Redox system of the cell: possible links and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 9617–9618
- [23] Davies M.J.: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 305: 761–770
- [24] Davison K., Cote S., Mader S., Miller W.H.: Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines. *Leukemia*, 2003; 17: 931–940
- [25] Devi G.S., Prasad M.H., Saraswathi I., Raghu D., Rao D.N., Reddy P.P.: Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin. Chim. Acta*, 2000; 293: 53–62
- [26] Dreher D., Junod A.F.: Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, 1995; 162: 147–153
- [27] Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991; 11: 81–128
- [28] Evan G., Littlewood T.: A matter of life and cell death. *Science*, 1998; 281: 1317–1322
- [29] Fang Y.Z., Yang S., Wu G.: Free radical, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 2002; 18: 872–878



- [30] Fliss M.S., Usadel H., Caballero O.L., Wu L., Buta M.R., Eleff S.M., Jen J., Sidransky D.: Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*, 2002; 287: 2017–2019
- [31] Foley K.P., Eisenman R.N.: Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mx1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1423: M37–M47
- [32] Frączek M., Kurpisz M.: The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 523–534
- [33] Fridovich I.: Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 18515–18517
- [34] Giancotti F.G., Ruoslahti E.: Integrin signalling. *Science*, 1999; 285: 1028–1032
- [35] Golab J., Nowis D., Skrzycki M., Czczot H., Baranczyk-Kuzma A., Wilczynski G.M., Makowski M., Mroz P., Kozar K., Kaminski R., Jalili A., Kopec M., Grzela T., Jakobisiak M.: Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 407–414
- [36] Gollapudi S., Ghoneum M.: MGN-3/Biobran, modified arabinosyl from rice bran, sensitizes human breast cancer cells to chemotherapeutic agent, daunorubicin. *Cancer Detect. Prev.*, 2008; 32: 1–6
- [37] Green D.R., Reed J.C.: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998; 281: 1309–1312
- [38] Guyton K.Z., Kensler T.W.: Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 1993; 49: 523–544
- [39] Halliwell B., Gutteridge J.M.: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990; 280: 1–8
- [40] Halliwell B., Zhao K., Whiteman M.: Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic. Res.*, 1990; 31: 651–669
- [41] Hanahan D., Folkman J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996; 86: 353–364
- [42] Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57–70
- [43] Hannon G.J., Beach D.: P15^{INK4b} is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994; 371: 257–261
- [44] Henrotin Y.E., Bruckner P., Pujol J.P.: The role of reactive oxygen species in homeostasis and degeneration of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003; 11: 747–755
- [45] Higuchi Y.: Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 1527–1535
- [46] Hileman E.A., Achanta G., Huang P.: Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2001; 5: 679–710
- [47] Hlavata L., Aguilaniu H., Pichova A., Nystrom T.: The oncogenic RAS2^{val19} mutation locks respiration, independently of PKA, in a mode prone to generate ROS. *EMBO J.*, 2003; 22: 3337–3345
- [48] Hsu T.C., Young M.R., Cmarik J., Colburn N.H.: Activator protein1 (AP-1)-and nuclear factor κB (NF-κB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 2000; 28: 1338–1348
- [49] Huang P., Feng L., Oldham E.A., Keating M.J., Plunkett W.: Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 2001; 407: 390–395
- [50] Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C.: Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 276–285
- [51] Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K.: Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.*, 2003; 10: 2495–2505
- [52] Jaruga P., Zastawny T.H., Skokowski J., Dizdaroglu M., Oliński R.: Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett.*, 1994; 341: 59–64
- [53] Jing Y., Dai J., Chalmers-Redman R.M., Tatton W.G., Waxman S.: Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukaemia cells apoptosis via a hydrogen peroxide- dependent pathway. *Blood*, 1999; 94: 2102–2111
- [54] Johnsen M., Lund L.R., Romer J., Almholt K., Dano K.: Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998; 10: 667–671
- [55] Kasai H.: Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 450–456
- [56] Klaunig J.E., Kamendulis L.M.: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004; 44: 239–267
- [57] Kong Q., Beel J.A., Lillehei K.O.: A threshold concept for cancer therapy. *Med. Hypotheses*, 2000; 55: 29–35
- [58] Kong Q., Lillehei K.O.: Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med. Hypotheses*, 1998; 51: 405–409
- [59] Liu H., Nishitoh H., Ichijo H., Kyriakis J.M.: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibition thioredoxin. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 2198–2208
- [60] Mallis R.J., Buss J.E., Thomas J.A.: Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem. J.*, 2001; 355: 145–153
- [61] Marnett L.J.: Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 2002; 181-182: 219–222
- [62] Marnett L.J., Riggins J.N., West J.D.: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 583–593
- [63] Martin K.R., Barrett J.C.: Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signalling versus high-dose toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2002; 21: 71–75
- [64] Martindale J.L., Holbrook N.J.: Cellular response to oxidative stress: signalling for suicide and survival. *J. Cell Physiol.*, 2002; 192: 1–15
- [65] Miller W.H. Jr.: Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist*, 2002; 7(Suppl.1): 14–19
- [66] Mooberry S.L.: Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. *Drug Resist. Updat.*, 2003; 6: 355–361
- [67] Naskalski J.W., Bartosz G.: Oxidative modifications of protein structures. *Adv. Clin. Chem.*, 2000; 35: 161–253
- [68] Nicco C., Laurent A., Chereau C., Weill B., Batteux F.: Differential modulation of normal and tumour cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed. Pharmacother.*, 2005; 59: 169–174
- [69] Olinski R., Zastawny T., Budzbon J., Skokowski J., Zegarski W., Dizdaroglu M.: DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.*, 1992; 309: 193–198
- [70] Parekh A.B., Penner R.: Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.*, 1997; 77: 901–930
- [71] Patel B.P., Rawal U.M., Shah P.M., Prajapati J.A., Rawal R.M., Dave T.K., Patel P.S.: Study of tobacco habits and alterations in enzymatic antioxidant in oral cancer. *Oncology*, 2005; 68: 511–519
- [72] Pelicano H., Carney D., Huang P.: ROS stress in cancer cells and the therapeutic implications. *Drug Resist. Updates*, 2004; 7: 97–110
- [73] Platenik J., Stopka P., Vejrazka M., Stipek S.: Quinolinic acid-iron (II) complexes: slow autooxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction. *Free Rad. Res.*, 2001; 34: 445–459
- [74] Poli G.: Introduction-serial review: reactive oxygen and nitrogen in inflammation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 301–302
- [75] Porter N.A., Caldwell S.E., Mills K.A.: Mechanisms of free-radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 1995; 30: 277–290
- [76] Sade H., Sarin A.: Reactive oxygen species regulate quiescent T-cell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. *Cell Death. Differ.*, 2004; 11: 416–423
- [77] Sancar A.: Mechanisms of DNA excision repair. *Science*, 1994; 266: 1954–1956
- [78] Schafer F.Q., Buettner G.R.: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30: 1191–1212
- [79] Schimmel M., Bauer G.: Prapoptotic and redox state-related signalling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. *Oncogene*, 2002; 21: 5886–5896
- [80] Skrzydlewska E., Kozusko B., Sulkowska M., Bogdan Z., Kozłowski M., Snarska J., Puchalski Z., Sulkowski S., Skrzydlewski Z.: Antioxidant status in esophageal, stomach and colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 2003; 50: 126–131
- [81] Sohal R.S.: Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 37–44
- [82] Sordet O., Rebe C., Leroy I., Bruey J.M., Garrido C., Miguet C., Lizard G., Plenchette Corcos L., Solary E.: Mitochondria – targeting drugs arsenic trioxide and lonidamine bypass the resistance of TPA-differentiated leukemic cells to apoptosis. *Blood*, 2001; 97: 3931–3940
- [83] Storz P., Doppler H., Toker A.: Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell Biol.*, 2005; 25: 8520–8530

- [84] Sun X.Z., Vinci C., Makmura L., Han S., Tran D., Nguyen J., Hamann M., Grazziani S., Sheppard S., Gutova M., Zhou F., Thomas J., Momand J.: Formation of disulfide bond in p53 correlates with inhibition of DNA binding and tetramerization. *Antioxid. Redox Signal.*, 2003; 5: 655–665
- [85] Sun Y.: Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 1990; 8: 583–599
- [86] Tas F., Hansel H., Belce A., Ilvan S., Argon A., Camlica H., Topuz E.: Oxidative stress in breast cancer. *Med. Oncol.*, 2005; 22: 11–15
- [87] Thornberry N.A., Lazebnik Y.: Caspases: enemies within. *Science*, 1998; 281: 1312–1316
- [88] Toledano M.B., Leonard W.J.: Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 4328–4332
- [89] Trzeciak A.: Uszkodzenia DNA w komórkach ssaków. *Post. Biol. Kom.*, 2001; 3: 407–429
- [90] Tsang W.P., Chau S.P., Kong S.K., Fung K.P., Kwok T.T.: Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci.*, 2003; 73: 2047–2058
- [91] Vafa O., Wade M., Kern S., Beeche M., Pandita T.K., Hampton G.M., Wahl G.M.: c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell*, 2002; 9: 1031–1044
- [92] Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J.: Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.*, 2004; 266: 37–56
- [93] Wambi-Kiesse C.O., Katusic Z.S.: Inhibition of copper/zinc superoxide dismutase impairs NO-mediated endothelium-dependent relaxations. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: H1043–H1048
- [94] Wood L., Leese M.R., Leblond B., Woo L.W., Ganeshapillai D., Purohit A., Reed M.J., Potter B.V., Packham G.: Inhibition of superoxide dismutase by 2-methoxyoestradiol analogues and oestrogen derivatives: structure-activity relationships. *Anticancer Drug Des.*, 2001; 16: 209–215
- [95] Wu H.H., Thomas J.A., Momand J.: p53 protein oxidation in cultured cells in response to pyrrolidine dithiocarbamate: a novel method for relating the amount of p53 oxidation *in vivo* to the regulation of p53-responsive genes. *Biochem. J.*, 2000; 351: 87–93
- [96] Zhou Y., Hileman E.O., Plunkett W., Keating M.J., Huang P.: Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood*, 2003; 101: 4098–4104

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

