

**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

# **Antioksidansi i kemoterapija**

**Antioxidants and Chemotherapy**

**Seminarski rad**

Maja Vodopija  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: prof. dr. sc. N. Oršoli

Zagreb, 2009.

# SADRŽAJ:

SADRŽAJ:.....	2
1. SLOBODNI RADIKALI.....	3
1.2 ANTIOKSIDACIJSKI OBRAMBENI SUSTAVI.....	3
1.2.1 ENZIMATSKI.....	4
1.2.2. NEENZIMATSKI.....	5
1.3. PRIRODNI ILI SINTETSKI ANTIOKSIDANSI.....	5
1.3.1 SINTETSKI ANTIOKSIDANSI.....	6
1.3.2. PRIRODNI ANTIOKSIDANSI I NJIHOVI IZVORI.....	6
1.4. OKSIDACIJASKI STRES.....	8
1.5. MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIOKSIDANSA.....	9
1.6. KEMOTERAPIJA.....	11
1.7. IMUNOTERAPIJA.....	12
1.8. SLOBODNI RADIKALI I FUNKCIJA IMUNOLOŠKIH STANICA.....	13
1.8.1 ANTIOKSIDANSI.....	13
1.8.2. VITAMIN A I IMUNOLOŠKI SUSTAV.....	14
1.8.3. BETA-KAROTEN I IMUNOLOŠKI ODGOVOR.....	14
2. ANTIOKSIDANSI U KEMOTERAPIJI.....	14
2.1. EFIKASNOST KEMOTERAPIJE.....	15
2.1.1. STANDARDNA.....	15
2.1.2. EKSPERIMENTALNA.....	15
2.1.3. EFEKT ANTIOKSIDANSA NA STANICE RAKA.....	16
2.1.4. POJEDINA NI ILI MNOGOSTRUKI ANTIOKSIDANSI.....	19
2.1.5. NORMALE STANICE / STANICE RAKA.....	20
2.1.6. DUŽINA TERAPIJE.....	24
2.1.7. NEMAJU SVI ANTIOKSIDANSI ISTI UTJECAJ NA STANICE RAKA.....	24
3. LITERATURA.....	26
4. SAŽETAK.....	30
5. SUMMARY.....	31

# 1. SLOBODNI RADIKALI

U ljudskom se organizmu unutar tkiva izme u stanica, me ustani nog prostora i unutar samih stanica formira niz intermedijernih spojeva koji su organizmu nepotrebni ili ak štetni. Me u najzna ajnije štetne me uprodukate pripadaju takozvani slobodni radikali. Pedesetih godina dvadesetog stolje a Denham Harman (za etnik teorije slobodnih radikala) pretpostavio je da je starenje posljedica pretjerane proizvodnje slobodnih radikala. Slobodni radikali su molekule ili atomi koji sadrže jedan nesporeni elektron. Taj nesporeni elektron ima tendenciju stvaranja elektronskog para stoga su slobodni radikali vrlo reaktivni, ali kratkoga vijeka. Nastaju u tijelu u normalnim uvjetima tijekom metaboli kih reakcija. Emocionalni stres, UV zra enje, toksi ne tvari, dim cigarete i drugi imbenici tako er generiraju slobodne radikale. Oni ošte uju vitalno važne strukture, poput stani nih membrana, razaraju deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) koja je osnovni sastojak jezgre svake stanice, ošte uju reparatorne enzime genetskog materijala i time stvaraju preduvjete za nastanak degenerativnih i zlo udnih oboljenja. Ako se uloga slobodnih radikala promatra u širem kontekstu, oni su glavni uzroci sveop eg tjelesnog kopnjenja i involucije, a to su procesi kojima se odlikuje fiziološko starenje. Danas se uloga slobodnih radikala sve eš e povezuje s pojavom metaboli nih i degenerativnih bolesti na srcu, krvnim žilama i plu ima, neurodegenerativnim bolestima kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, a sigurno igraju ulogu i u nastanku malignih procesa (raka).

Ljudski organizam posjeduje endogene antioksidativne sustave koji ga štite od šetnog utjecaja slobodnih radikala, no važan segment antioksidativne obrane ine antioksidansi koje svakodnevno treba unositi hranom u adekvatnim dozama (Kova i sur., 2009).

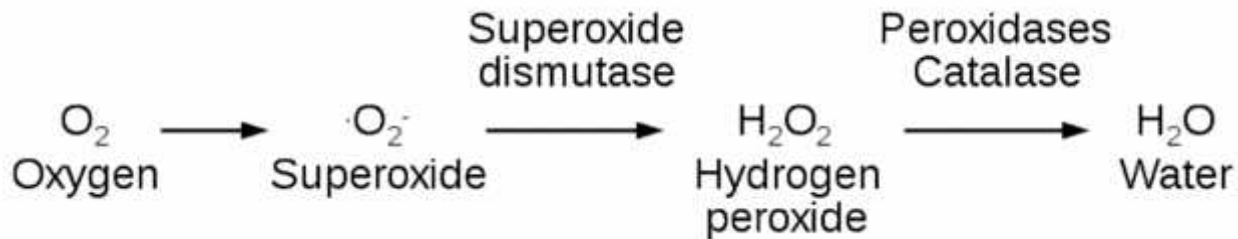
## 1.2 ANTIOKSIDACIJSKI OBRAMBENI SUSTAVI

Tvari koje djeluju na na in da štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala (primjerice, vitamin E, vitamin C, beta-karoten i selen) nazivaju se antioksidansi. Oni mogu biti enzimatske ili neenzimatske prirode.

## 1.2.1 ENZIMATSKI

Ljudski organizam raspolaže s tri najvažnija enzimska antioksidacijska obrambena sustava: superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza. Oni razgrađuju manje aktivne oblike kisikovih radikala u nenabijene neaktivne molekule te veliku grupu enzima koji obnavljaju slobodnim radikalima oštećene molekule DNA i proteina. Svi oni djeluju na način da održavaju ravnotežu prooksidans/antioksidans u organizmu, sprječavaju i tako nastanak degenerativnih oboljenja za koja se smatra da su povezana s njihovim štetnim djelovanjem. Superoksid koji je oslobođen u procesu oksidativne fosforilacije se prvo pretvara u vodikov peroksid, te se zatim dalje reducira dajući vodu. Ovakav detoksifikacijski put je rezultat aktivnosti mnogih enzima, od kojih superoksid dismutaza (SOD) katalizira prvi i najvažniji korak, a zatim dolaze katalaze i glutation peroksidaza koje kataliziraju druge korake takve reakcije (Slika 1).

U "prvu liniju obrane" enzimatskoga zaštitnog sustava ubraja se enzim SOD (superoksid dismutaza). On katalizira uklanjanje superoksidnog radikala, prvog proizvoda jednovalentne redukcije molekule kisika, ujedno i izvora spojeva reaktivnijih od njega samog. Enzim SOD katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na molekulu kisika (oksidacija) i  $H_2O_2$  (redukcija). SOD je prisutna u tri izoforme koje se međusobno razlikuju prema smještaju u stanici i vrsti metalnog iona koji sadrže u svom aktivnom centru. Izoenzim Cu, Zn-SOD se nalazi u citosolu (peroksisomi), gdje je dimer, a u aktivnom središtu sadrži ione Cu ili Zn. Mn-SOD se nalazi u matriksu mitohondrija, a svaka od četiri podjedinice tetramera sadrži jedan atom Mn. EC-SOD (vanstanični SOD), izoenzim koji štiti izvanstanični prostor od štetnog uinka superoksidnog radikala, gdje je od četiri podjedinice, a sadrži ione Cu i Zn. Ovakvom raspodjelom izoenzima unutar stanice i izvan nje omogućeno je brzo i djelotvorno uklanjanje superoksidnog radikala na mjestu njegova nastanka. CAT (katalaza) je enzim koji brzo reducira  $H_2O_2$  do  $H_2O$ . Nalazi se u citosolu stanice (peroksisomi), a osobito je aktivan u hepatocitima i eritrocitima. Enzim je gdje je od četiri podjedinice, od kojih svaka u aktivnom centru posjeduje hem skupinu. GPx (glutation peroksidaza) katalizira redukciju  $H_2O_2$  i organskih hidroperoksida u prisutnosti reduciranog oblika GSH (glutation, reducirani) koji služi kao donor vodika. Prisutna je u citosolu stanice kao i u mitohondrijima (do 40% ukupne enzimске aktivnosti), te uz katalazu značajno doprinosi uklanjanju  $H_2O_2$  (<http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763>).



**Slika 1.** Detoksifikacijski put\*

\*Preuzeto sa [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Antioxidant\\_pathway.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Antioxidant_pathway.svg)

### 1.2.2. NEENZIMATSKI

Tu skupinu antioksidansa ine brojne jednostavne ili složene molekule koje pretvaraju nezasi ene, vrlo aktivne molekule slobodnih radikala u nove, kemijski zasi ene, inaktivne oblike koji nisu opasni za normalnu aktivnost organizma; koji djeluju kao “ ista i” slobodnih radikala- tokoferol,  $\alpha$ -radikala (askorbinska kiselina, bilirubin, urati, estrogen, flavonoidi, likopen, glukoza, koenzim Q, albumin, transferin).

**Da bi se zaštitio organizam od visokoreaktivnih molekula, tijekom evolucije je razvijeno nekoliko razli itih mehanizama antioksidativne obrane:** pomo u antioksidansa (flavonoida odnosno polifenola, tokoferola, askorbata, glutaciona) nastajanjem kelata izme u metalnih iona i proteina te pomo u enzima (superoksid dizmutaze, katalaze, glutation peroksidaze). Pregled antioksidanasa prema izvoru i mehanizmu djelovanja pokazuje Tablica 1 (Kova i sur., 2009).

### 1.3. PRIRODNI ILI SINTETSKI ANTIOKSIDANSI

Pojam "sintetski" odnosi se na tvari koje su stvorene kemijskim putem, dok "prirodni" zna i da su dobiveni prirodnim putem iz razli itih biljnih ili životinjskih izvora. Najkorisniji su oni antioksidansi koji su topivi u mastima i uljima, bez boje, okusa i mirisa, netoksi ni i djelotvorni u malim koncentracijama.

**Tablica 1.** Vrste antioksidanasa prema izvoru i mehanizmu djelovanja

Prema izvoru	Prema mehanizmu djelovanja
<b>EGZOGENI ILI VANJSKI</b>	
S-karoten	
Vitamin E (Tokoferoli)	Antioksidansi-donori H atoma
Vitamin C (Askorbinska kiselina)	
Polifenoli spojevi	Kelatori metalnih iona
<b>ENDOGENI ILI UNUTARNJI</b>	
Glutation peroksidaza (GP)	Enzimi
Katalaza	Hvata i kisikovih radikala
Superoksid dizmutaza (SOD)	

### 1.3.1 SINTETSKI ANTIOKSIDANSI

Po svojoj kemijskoj prirodi antioksidansi su uglavnom aromatski spojevi fenolne prirode. U grupu sintetskih antioksidansa ubrajaju se BHT-E321 (butilhidroksi toluen), BHA-E320 (butilhidroksi anizol), PG-E 310 (propil galat) te TBHQ (tercijarni butilhidrokvion).

### 1.3.2. PRIRODNI ANTIOKSIDANSI I NJIHOVI IZVORI

Ne mora zna iti da su spojevi s antioksidacijskim svojstvima dobiveni iz prirodnih izvora nužno sigurni po zdravlje ovjeka. Svaki novootkriveni spoj koji pokazuje antioksidacijska svojstva mora podlijegati strogim toksikološkim testovima prije nego što se dozvoli njegova uporaba. Iscrpci iz prirodnog biljnog materijala (vo a, povr a, aromatskog i za inskog bilja) uglavnom su bogat izvor tokoferola (vitamina E), vitamina C, karotenoida te flavonoida (grupe polifenolnih spojeva s izraženim antioksidacijskim potencijalima). Vo e i povr e poznati su kao bogat izvor vitamina C i karotenoida. Za ini poput klin i a, cimeta, kadulje, ružmarina i origana pokazuju visoka antioksidacijska svojstva, najviše zbog prisustva fenolne grupe spojeva. U novije vrijeme se

sve više istih i značaj iscrpka koja koji je izuzetno bogat flavonoidima. **Tokoferoli** se javljaju u biljnim uljima, a **a-tokoferol** prepoznat je kao glavni "ista" slobodnih radikala (esto poznat i kao vitamin E). **Vitamin E** je najzastupljeniji u mastima topiv antioksidans u organizmu. Uključen je u strukturu različitih lipoproteinskih estica, gdje je zadužen za zaštitu LDL-a (lipoprotein male gustoće) od oksidacije, čime sprječava nastanak ateroskleroze. **Vitamin C** je najvažniji u vodi topivi antioksidans u organizmu koji štiti lipoproteine od oksidacije hvatajući i slobodne radikale. U posljednje se vrijeme mnogo raspravlja o mogućnosti njegovog štetnog djelovanja, jer je poznato da se u prisutnosti slobodnih iona željeza ponašati kao prooksidans stvaraju i nepoželjan feroksidni oblik iona željeza ( $Fe^{2+}$ ) koji je glavni katalizator procesa oksidacije. Usprkos tome, vitamin C ima brojne biološke funkcije u organizmu i mnoga su istraživanja potvrdila da upravo on predstavlja prvu liniju antioksidacijske obrane u plazmi od različitih oblika slobodnih radikala i što je pomalo iznenađujuće, štiti LDL od oksidacije čak bolje od vitamina E. Uglavnom se nalazi u voću i povrću.

**Karotenoidi** su grupa spojeva prilično rasprostranjenih u prirodi koje nalazimo u biljkama, voću i povrću. Poznato ih je do sada preko 600, od kojih se najviše spominje **beta-karoten (provitamin vitamina A)** prepoznat kao antikancerogen. On je najzastupljeniji karotenoid u serumu i najviše ga ima u mrkvi, narandama, žutom voću i zelenom lisnatom povrću. Važan je za normalnu funkciju makrofaga i limfocita (stanica obrambenog sustava organizma) te u sprječavanju oštećenja uzrokovanih djelovanjem sunčevog svjetla kao i prevenciji raka kože.

**Flavonoidi** su u prirodi prisutni polifenolni spojevi koji su svrstani prema svojoj kemijskoj strukturi. Otkriveno ih je preko 8.000 i većina se nalazi u voću, povrću te napitcima poput čaja, piva, vina, kave i voćnih sokova. Kada je otkriveno njihovo korisno djelovanje na zdravlje (ovjeka) (antialergijsko, protuupalno, antioksidacijsko), zavladao je veliko zanimanje za ovom kompleksnom grupom spojeva. Kapacitet njihovog antioksidacijskog potencijala uvjetovan je prije svega njihovom molekularnom strukturom.

**Selen** je esencijalni element koji se nalazi u tijelu u malim količinama. Djeluje blisko s vitaminom E u određenim metaboličkim procesima i poticanju normalnog rasta tijela i plodnosti. Selen je prirodni antioksidans i smatra se da čuva elastičnost tkiva odgađajući i oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina. Selen je važan dio tjelesnih antioksidativnih enzima koji štite stanice od štetnih i inaktivnih slobodnih radikala koji nastaju tijekom normalnog metabolizma kisika.

**Astaksantin** pripada skupini karotenoida, molekula koje se u prirodi stvaraju u biljkama i njihovim mikroskopskim srodnicima – mikroalgama. Astaksantin u inkovito štiti membrane stanica, a njegova antioksidativna aktivnost dokazana je brojnim studijama. Spominje se ak i višestruko snažnije djelovanje astaksantina od vitamina E i beta-karotena. Znanstvena literatura govori u prilog astaksantinu i isti e zaštitni u inak pa prevenciju ošte enja izazvanih UV-zra enjem, protuupalno i snažno antioksidativno djelovanje.

**Koenzim Q10** je snažan antioksidans koji štiti organizam od slobodnih radikala i pomaže u o uvanju vitamina E, glavnog antioksidansa stani nih membrana i kolesterola u krvi. Kao koenzim, ovaj nutrijent pomaže mitohondrijima u kompleksnom procesu transformacije hrane u ATP, energiju koja pokre e tijelo.

**Resveratrol** je fitokemikalija koja se sintetizira u grož u kao odgovor na mikrobnu infekciju ili stres, a akumulira se u opni (kožici) grož a. Ova molekula nalazi se u vinu, a budu i da je koncentracija resveratrola proporcionalna trajanju maceracije, znatno je viši udio resveratrola u crnim vinima. In vitro istraživanja dokazala su snažnu antioksidativnu aktivnost resveratrola i u inak na smanjenje oksidacije LDL kolesterola, što može zaštititi od ateroskleroze.

**Epigalokatehin-3-galat (EGCG)** je plifenol koji se smatra najmo nijom aktivnom supstancom u zelenom aju, vrsta ketehina. Katehini iz aja posjeduju niz farmakloških u inaka; antioksidativno, antimutageno, antikancerogeno i protuupalno djelovanje.

**N-acetil cistein (NAC)** je izmjenjen oblik aminokiseline cistein, koja se sintetizira u tijelu i unosi hranom. Unos NAC-a mogu je jedino putem suplemenata, a strategija unošenja ove molekule temelji se na osiguravanju elemenata za sintezu jednog od najvažnijih tjelesnih antioksidansa – glutationa.

## 1.4. OKSIDACIJASKI STRES

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u stani nim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Rije je o stanju prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri emu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogu nosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz ošte enje stanica.

Oksidacijsko ošte enje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasi enih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što kona no rezultira promjenama u



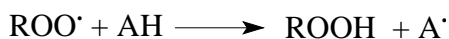
strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi bolesti srca i krvnih žila i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize, procesa starenja.

U procjeni povoljnih i nepovoljnih u inak oksidacijskog stresa na patobiokemijski mehanizam brojnih bolesti, u istraživanjima se koriste tri temeljna pristupa: a) izravno mjerenje količine nastalih reaktivnih kisikovih radikala (postupak izbora - EPR spektroskopija); b) mjerenje proizvoda nastalih djelovanjem reaktivnih kisikovih spojeva (8-hidroksigvanin, proizvodi lipidne peroksidacije) i c) mjerenje koncentracije/aktivnosti pojedinačnih antioksidansa i ukupnog antioksidativnog statusa. Indirektan pristup određivanja pojedinačnih ili ukupnih antioksidansa, iako još uvijek u istraživanjima, je najzastupljeniji. Obzirom na veliki broj poznatih antioksidansa u organizmu, klasificiraju se u pravilu kao preventivni (primjerice, ceruloplazmin, albumini, transferin, feritin i dr.), "hvatači" (uglavnom enzimi i male molekule kao glutation, vitamin C, E) i "repair systems" antioksidansi (primjerice DNA polimeraza I, DNA ligaza i dr.). Različiti mehanizmi djelovanja općenito uključuju: odjeljivanje osjetljivih makromolekula, uklanjanje reaktivnih kisikovih spojeva djelovanjem antioksidativnih enzima, sekvencijalno prijelaznih metala, "hvatanje" slobodnih radikala, sustav popravljanja i inicijaciju apoptoze. Iako još nisu našli primjenu u dijagnostici, antioksidativni enzimi superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza predmet su brojnih istraživanja sa zanimljivim rezultatima. Ovi se enzimi mogu istraživati praćenjem njihove ekspresije na molekularnoj razini, imunokemijskim tehnikama te određivanjem katalitičke aktivnosti spektrofotometrijskim tehnikama (<http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763>).

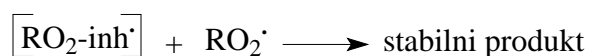
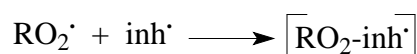
## **1.5. MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIOKSIDANSA**

Objavljeno je nekoliko radova vezanih uz kinetiku i djelovanje antioksidanasa. Antioksidansi usporavaju autooksidaciju masti tako da inhibiraju nastajanje slobodnih radikala u inicijacijskom stupnju ili ometaju propagaciju u kojoj nastaju lanci slobodnih radikala. Inicijacija slobodnih radikala se može usporiti pomoću u tvari koje cijepaju perokside, metalnih keliraju ih agensa i inhibitora singlet kisika. Budući da je vrlo teško ukloniti tragove peroksida ili metalnih inicijatora većina se istraživanja bazirala na uporabu akceptora slobodnih radikala.

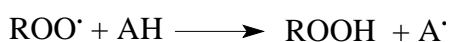
Prvo detaljno istraživanje o kinetici i mehanizmu djelovanja antioksidanasa izveo je Bolland 1947. godine. On je koristio model sustav autooksidacijskog etil-linoleata uz hidrokinon kao inhibitor. Pretpostavljao je da se antioksidansi inhibiraju i lanu reakciju djeluju i kao donori vodika ili kao akceptori slobodnih radikala te zaključio da akceptori slobodnih radikala (AH) primarno reagiraju sa ROO<sup>·</sup> a ne sa R<sup>·</sup> radikalom.



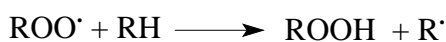
Autori su pretpostavili da se reakcija odvija u dva stupnja. Razni autori su predlagali različite verzije antioksidacijskog mehanizma. Između ostalog je predloženo da intermedijer - slobodni radikal, AH<sup>·</sup> stvara stabilan proizvod reagirajući sa RO<sub>2</sub><sup>·</sup> radikalom ili da kompleks između RO<sub>2</sub><sup>·</sup> radikala i inhibitora daljnjom reakcijom sa RO<sub>2</sub><sup>·</sup> slobodnim radikalom daje stabilni proizvod.



Od svih predloženih mehanizama najznanija je Bollandov mehanizam. Mehanizam je predložen kao kompetitivski mehanizam između "reakcije inhibicije",

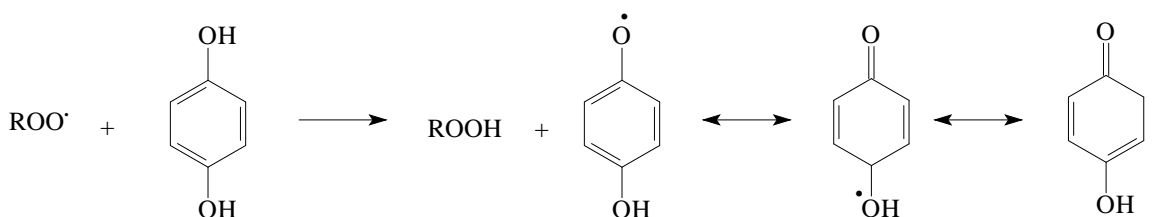


i reakcije propagacije,



Djelovanje antioksidanasa je povezano s mnogo čimbenika pa tako i sa energijom aktivacije, konstantom brzine, oksido-redukcijskim potencijalom te svojstvima topljivosti. Obje ranije spomenute reakcije (reakcija inhibicije i reakcija propagacije) su egzotermne reakcije budući da se energija aktivacije povećava s povećanjem energije pucanja A-H i R-H veze. Djelotvornost antioksidansa (AH) se povećava sa smanjenjem jakosti A-H veze. Idealno bi bilo kada nastali antioksidans slobodni radikal ne bi inicirao nastajanje novih slobodnih radikala ili podlijegao jakim lananim reakcijama oksidacije. Upravo zbog toga fenolni antioksidansi posjeduju tzv.

povoljno stanje. Oni su naime izvrsni donori vodika i elektrona, a njihovi intermedijeri - slobodni radikali su relativno stabilizirani rezonancijom. Uloga im je smanjiti broj položaja pogodnih za napad molekularnog kisika. Hidrokinoni primjerice reagiraju s peroksilnim radikalima stvaraju i stabilne rezonantne hibride semikinona.



Slika 2. Reakcija fenolnog antioksidansa i nastanak slobodnog radikala koji se može stabilizirati rezonancijom pri čemu nastaju stabilniji produkti.

- Preuzeto od Kovač i sur., (2009).

Intermedijerni radikal semikinona podliježe brojnim reakcijama u kojima nastaju puno stabilniji proizvod. Oni mogu reagirati i međusobno pri čemu nastaju dimeri ili se transformiraju u kinone (Slika 2).

## 1.6. KEMOTERAPIJA

Kemoterapija je naziv za sistemsko liječenje zloćudnih bolesti kemijskim tvarima prirodnog ili sintetskog podrijetla koje se još nazivaju antitumorski lijekovi, citotoksični lijekovi ili citostatici. Naziv kemoterapija koristi se jer se ovim liječenjem rast zloćudne stanice kontrolira kemijskim putem.

**Mehanizam djelovanja:** prema mehanizmu djelovanja citostatici najčešće remete sintezu i/ili funkciju makromolekula (DNA, RNA, bjelancevine) ili funkciju staničnih organela, osobito mitotskog aparata koji omogućuje diobu stanica. Kao posljedica ovih učinaka dolazi do smrti stanica.

Normalne stanice u tijelu rastu, dijele se i umiru pod kontrolom. Tumor nastaje kada organizam izgubi tu kontrolu, pa se stanice nastavljaju nezadrživo dijeliti i stvarati nove stanice. Citostatici uništavaju zloćudne stanice koje i njihov rast i diobu. Ti lijekovi ne djeluju selektivno, dakle isključivo na zloćudne stanice, nego mogu oštetiti i zdrave stanice u tijelu, naročito one koje se brzo dijele: krvne stanice, sluznicu probavnog sustava, spolne stanice, folikule kose. Upravo

ošte enje zdravih stanica uzrokuje popratne neželjene pojave kemoterapije. Ošte ene stanice obično se obnavljaju nakon prestanka kemoterapije.

Budući da citostatici na različite načine zaustavljaju stanični ciklus, radi boljeg antitumorskog učinka često se istovremeno daju dvije ili više vrsta lijekova. To se naziva polikemoterapijom ili kombiniranom kemoterapijom.

U liječenju nekih tumora koriste se druge vrste terapije, poput hormonske ili imunološke, često u kombinaciji s kemoterapijom, upravo zbog različitog načina djelovanja na zloćudne stanice. Hormonska terapija djeluje tako da sprečava stanice da dobiju hormon koji im je potreban za rast. Kao i kemoterapija, hormonska je terapija sistemska, dakle napada stanice svuda u tijelu (<http://www.medicina.hr/clanci/kemoterapija.htm>).

## **1.7. IMUNOTERAPIJA**

Imunoterapija koristi imunološki sustav organizma, bilo direktno ili indirektno, u borbi protiv raka. Naš organizam ima prirodnu sposobnost da se zaštiti od bolesti, uključujući i zloćudne. Imunološki sustav može prepoznati razliku između zdravih i zloćudnih stanica i eliminirati potonje iz tijela. Rak, dakle, može nastati kada imunološki sustav organizma zataji. Imunoterapija ili biološka terapija obnavlja, stimulira ili pojačava prirodnu antitumorsku funkciju imunološkog sustava. Jedan je od poznatijih oblika imunoterapije raka primjena tzv. citokina, bjelancevine male molekularne težine, koje antitumorski učinci ostvaruju direktno - kojom se enjima rasta tumorskih stanica i indirektno - stimuliranjem bolesnikovih imunoloških stanica. Drugi je od oblika imunoterapije uporaba tzv. monoklonalnih antitijela koja se vežu na specifične antigene tumorskih stanica. Blokiranje tih receptora na stanicama tumora zaustavlja prenošenje signala s površine stanice u jezgu i na taj način zaustavlja rast tumora.

Funkcija ljudskog imunološkog sustava, ovisi o unosu mikronutrijenata, koji se mogu ponašati kao antioksidansi. Nedavna klinička istraživanja su pokazala da dodatni unos antioksidansa može značajno poboljšati određeni imunološki odgovor u tijelu. Nadopuna vitaminima C, E i A ili beta-karotenom kod starijih ljudi je uzrokovala povećanu aktivaciju stanica koje sudjeluju u imunosti na tumore. Nadopuna antioksidativnim vitaminima je također je štitala imunosni odgovor u pojedinim ljudima koji su bili izloženi vanjskim izvorima slobodnih radikala (Bendich, 1993).

## **1.8. SLOBODNI RADIKALI I FUNKCIJA IMUNOLOŠKIH STANICA**

Mnoge zaštitne funkcije imunološkog sustava ovise o fluidnosti membrana samih stanica. Kako se koncentracija polinezasićenih masnih kiselina u biološkoj membrani povećava, tako se povećava i mogućnost lipidne peroksidacije membrane koja je posredovana slobodnim radikalima. Lipidna preoksidacija smanjuje fluidnost membrane što nepovoljno utječe na imunski odgovor. Gubitak fluidnosti membrane je izravno povezan sa smanjenim odgovorom limfocita na zahtjev imunološkog sustava. Stupanj nezasićenosti lipida koji se nalaze u membrani utječe i mijenja izloženost i aktivnost membranskih receptora. Kako se stupanj nezasićenosti membranskih lipida povećava tako se povećava i sinteza metabolita arahidonske kiseline, kao što su imunosupresivni prostaglandini, a koncentracija antioksidansa se smanjuje (Bendich, 1993).

### **1.8.1 ANTIOKSIDANSI**

Vitamini E i C, beta-karoten djeluju kao snažni antioksidansi dok je vitamin A manje snažan. Minerali kao Zn, Cu i Mn su prijeko potrebni za aktivnost superoksid dismutaze; Se je potreban za aktivnost glutation peroksidaze, a Fe za katalznu aktivnost. Uglavnom, minerali primarno ne djeluju kao antioksidansi, već su glavne komponente antioksidativnih enzima. Tri esencijalna mikronutrijenta mogu direktno utjecati na slobodne radikale.

[ ] Vitamin E (alfa-tokoferol), jedan od važnijih antioksidansa koji su topljivi u lipidima, nalazimo ga u svim staničnim membranama, njegova uloga je zaštita membrane od lipidne peroksidacije te na taj način sprječava gubitak fluidnosti membrana. Vitamin C (askorbinska kiselina) je topljiv u vodi i može hvatati slobodne radikale i singlete kisika, kao i vitamin E. Askorbat također može regenerirati reduciranu formu vitamina E (Machlin i sur., 1987).

Nedavna istraživanja su otkrila da je alfa-karoten efikasan hvata slobodnih singletnih radikala kisika i može djelovati kao antioksidans i prekursor vitamina A. Vitamin A ne može hvatati reaktivne singlete kisika i ima najmanju antioksidativnu aktivnost od svih ostalih antioksidansa, no njegov doprinos i važnost koju ima u imunskom sustavu je dobro poznata i važna (Bendich, 1993).

### **1.8.2. VITAMIN A I IMUNOLOŠKI SUSTAV**

Vitamin A je kroz povijest poznat i kao protu-infekcijski vitamin. Deficijencija vitamina A je povezana s povećanim rizikom oboljenja od raznih infekcija. On je važan za razvoj i funkciju T i B limfocita. Zbog toga smanjena koncentracija vitamina A, rezultira smanjenjem imunološkog odgovora posredovanog imuno stanicama, kao i smanjenim specifičnim odgovorom antitijela tijekom imunizacije. I samo najmanji nedostatak, bez ikakvih kliničkih dokaza deficijencije u vitaminu A, smanjuje imunosni odgovor na cijepliva i proizvodnju patogeno-specifičnih protutijela (Semba i sur., 1992). Vitamin A također djeluje kao kemijski dodatak, pojačavajući imunološki odgovor.

### **1.8.3. BETA-KAROTEN I IMUNOLOŠKI ODGOVOR**

Tradicionalan pogled nutricionista na beta-karoten je bio isključivo samo kao izvor vitamina A u prehrani. Brojna istraživanja pokazala su da karotenoidi mogu pojačati funkciju imunološkog sustava, neovisno o aktivnosti provitamina A (Bendich, 1991). Mehanizam pojačavanja imunosnog odgovora uključuje sposobnost mnogih karotenoida u hvatanju singlet kisika. U laboratorijskim istraživanjima, usporedbe karotena i nevitaminskog A karotenoida kantaksantina, pokazale su da oba karotenoida pojačavaju proliferativni odgovor T i B limfocita na mitogene; pojačavaju citotoksične T-stanice, sposobnost makrofaga i njihovog djelovanja na tumore te stimuliraju sekreciju TNF-a (Bendich, 1993).

## **2. ANTIOKSIDANSI U KEMOTERAPIJI**

Većina onkologa ne preporučava antioksidanse u standardnoj terapiji svojim pacijentima, ali neki ih ipak preporučuju u malim dozama nakon završetka terapije. No, otprilike oko 60% pacijenata uzimaju antioksidanse tijekom standardne kemoterapije, bez znanja njihovih doktora. Zbog toga, racionalna strategija korištenja antioksidansa i njihovih derivata u kombinaciji sa standardnom kemoterapijom je možda štetna, zato što endogeno stvoreni antioksidansi (glutathion i antioksidativni enzimi) u bilo kojoj dozi, ili oni uneseni u tijelo kao što su vitamin A, C i E, prirodni beta-karoten, u manjim dozama, mogu zaštititi stanice raka tijekom terapije, kao što i mala

doza unešenih antioksidansa može stimulirati proliferaciju rezidualnih stanica raka. Zbog toga bi se trebala razviti odgovorajuća terapija (Prasad, 2004). Postoje oprečni stavovi doktora kada se govori o korištenju antioksidansa kao dodatka standardnoj kemoterapiji. Jedna strana predlaže korištenje velike doze smjese antioksidansa prije i tijekom standardne kemoterapije u svrhu poboljšanja same učinkovitosti terapije, povećavajući odgovor tumora na kemoterapiju i smanjenje toksičnosti same terapije. Druga strana pak smatra da se nikakvi antioksidativni dodaci ne bi smjeli koristiti tijekom kemoterapije, zato što bi štitili normalne stanice raka od slobodnih radikala, koji su nusproizvod mnogih kemoterapeutskih lijekova (Prasad i sur., 2001).

## **2.1. EFIKASNOST KEMOTERAPIJE**

### **2.1.1. STANDARDNA**

Efikasnost standardne terapije koja uključuje kombinaciju operacije, mnogostrukih kemoterapijskih lijekova i ionizirajućeg zračenja, je dosegla plato za većinu tumora. Kod nekih rakova, gdje je standardna terapija imala povećanu stopu izlječenja, još uvijek postoji mogućnost da će se negdje u tijelu razviti ponovo novi rak kao odgovor na takvu vrstu liječenja. Tijekom izvođenja, standardna terapija može biti uzrok akutne toksičnosti koja se javlja tijekom takve vrste liječenja. Ova vrsta toksičnosti može biti uzrokom prekida nekih kemoterapijskih lijekova. Zbog toga, stvari koje mogu smanjiti toksičnost standardne terapije na normalne stanice, te one stvari koje mogu povećati odgovor tumorskih stanica na takvu vrstu terapije, mogu izrazito poboljšati trenutne mehanizme inhibicije rasta raka (Prasad i sur., 2001).

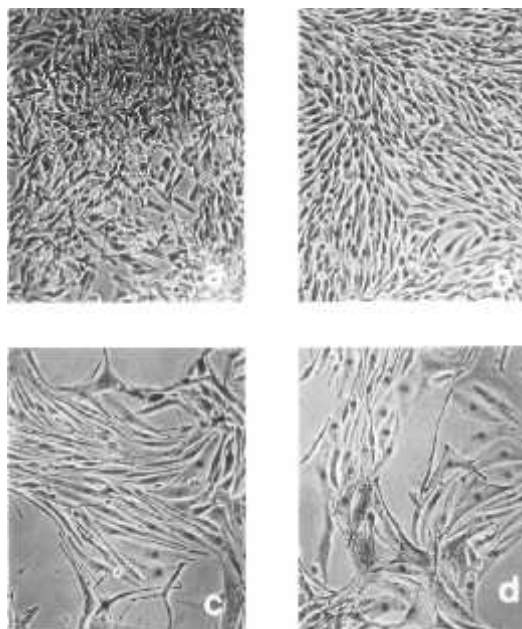
### **2.1.2. EKSPERIMENTALNA**

Između eksperimentalnih kemoterapeutskih postupaka koji se koriste u liječenju raka, kod ljudi se najviše koriste hipertermija, imunoterapija, modifikatori biološkog odgovora i genska terapija. Klinički rezultati svake nabrojane eksperimentalne terapije su poprilično varijabilni i ne toliko impresivni (Prasad i sur., 2001).

### 2.1.3. EFEKT ANTIOKSIDANSA NA STANICE RAKA

Antioksidansi kao što su retinoi i kiseline (i njezini derivati), vitamin E (tokoferol sukcinat i u vodi topljiva forma vitamina E), vitamin C i karotenoidi (primarno karoten i polarni karotenoidi), kada se koriste u visokim dozama, induciraju diferencijaciju stanica, inhibiraju rast i uzrokuju apoptozu u stanicama raka u glodavaca i ljudi, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uvjetima (Prasad i sur., 2001).

Jedan od primjera je tokoferol sukcinat ( $\alpha$ -TS) koji inducira diferencijaciju stanica melanoma u uvjetima stanice u kulturi (Slika 2) (Prasad i sur., 1982).



**Slika 2.** Stanice melanoma su bile posađene u kulturu stanica, nakon toga su dodani  $\alpha$ -tokoferil sukcinat ( $\alpha$ -TS) i natrijev sukcinat + etanol, u odvojene kulture 24 h nakon nasadivanja stanica. Lijekovi i medij su bili promjenjeni drugi i treći dan nakon obrade. Četiri dana nakon obrade napravljena je fotomikrografija. Kontrolne kulture su pokazivale fibroblastne stanice kao i okrugle stanice u naokupinama (a). Kulture koje su bile obrađene etanolom (1%) i natrijevim sukcinatom (5-6 µg/mL) su također pokazivale takvu morfologiju fibroblastnih stanica ali sa manje okruglih stanica (b). One kulture koje su bile obrađene s  $\alpha$ -TS (5 µg/mL) (c) i (6 µg/mL), (d) pokazale su dramatičnu promjenu stanica u njihovoj morfologiji.

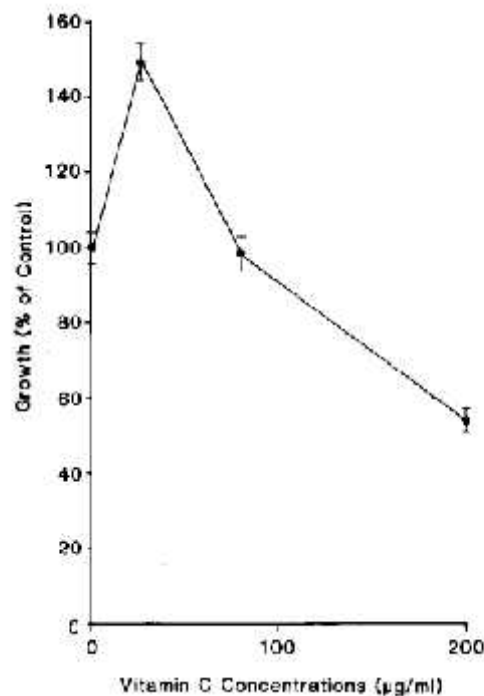
Predloženo je nekoliko mehanizama djelovanja visoke doze antioksidansa na stanice raka u *in vitro* uvjetima. Visoka doza antioksidansa inhibira ekspresiju C-myc, N-myc i H-ras kao i aktivnost



protein kinaze C. Ove promjene služe kao signali protiv rasta u stanicama raka. Dodatno, visoke doze antioksidansa povećavaju ekspresiju transformirajućeg faktora rasta – (TGF- $\beta$ ) mRNA, TGF- $\beta$  proteina i njegovu sekreciju, kao i ekspresiju p21 te divljeg tipa p53, a svi se oni smatraju signalima za inhibitore rasta tumorskih stanica. -TS inducira Fas-posredovanu apoptozu u estrogenskim receptorima stanica raka dojke, i pretvara Fas-otpornu humanu stanicu raka dojke u Fas-osjetljivi fenotip (Yu i sur., 1999). Fas (također poznat kao CD95 ili APO-1) pripada TNF receptorima i NGF (nerve growth factor) receptorskoj superfamiliji te regulira apoptozu. -TS također inhibira fosforilaciju i transaktivaciju E2F (transkripcijski faktor koji je važan u regulaciji proliferacije stanica) (Turley i sur., 1997). Za beta-karoten je dokazano da poveća ekspresiju gena za koneksin u stanicama raka. Ovakvo otkriće ukazuje na to da obrada beta-karotenom ponovno uspostavlja jedno od obilježja normalnih stanica, budući da gen za koneksin kodira za protein koji spaja procjep (gap junction) između stanica a s kojim su normalne stanice međusobno povezane. Tip i opseg uinka visoke doze antioksidansa koji djeluje na tumorske stanice, ovisi o tipu i formi samog antioksidansa, kao i o tipu tumorske stanice na koju bi trebao djelovati (Prasad i sur., 2001).

U inak inhibicije rasta stanica koji antioksidansi imaju na stanice raka i ne mora uključivati standardno djelovanje antioksidansa, nego mogu uključivati promjene u ekspresiji gena ili translokaciji određenog proteina iz jednog staninog odjeljka u drugi. Mješavina retinoinne kiseline, -TS, vitamina C i karotenoida, uzrokuje inhibiciju proliferacije ljudskih stanica melanoma u kulturi od 50%, no pojedini antioksidansi u istim koncentracijama ne reduciraju proliferaciju stanica. Udvostručene samo doze vitamina C u toj istoj mješavini antioksidansa, uzrokuje inhibiciju proliferacije stanica za 90%. Endogene proizvedeni antioksidansi, kao što je nadekspresija mitohondrijske managansuperoksid-dizmutaze (Mn-SOD) i N-acetilcistein (NAC) reduciraju proliferaciju kancerogenih stanica u kulturi. Laboratorijski podaci pokazuju da antioksidansi štite kancerogene stanice, dok dijetarni ili oni endogeno stvoreni antioksidansi koji se ne pojavljuju uvijek i u malim dozama, ne utječu na proliferaciju kancerogenih stanica. Na primjer, jedna niska doza -TS, d-tokoferola (-T), vitamin C, ili NAC dodana u kretkom vremenu prije radijacije, reducira efektivnost x-radijacije *in vitro* i *in vivo* modelima. Prevelika ekspresija Mn-SOD pojačava otpornost tumorskih stanica u kulturi na radijacijska zračenja. Doze -TS, vitamina C i retinoinne kiseline koje inhibiraju rast stanica, a koje su dodane prije i poslje radijacije, povećavaju u inak x-zračenja na kancerogene stanice u kulturi i zaštićuju normalne fibroblaste od

radijacijskih oštećenja. Vitamin A i  $\beta$ -karoten u visokim dozama, dodavani svakodnevno prije x-radijacije kao i tijekom cijelog perioda liječenja, uzrokuju >90% stopu izlječenja kod miševa s transplatiranim adenokarcinomom dojki, dok obrada koja uključuje samo radijaciju ili samo antioksidanse nije učinkovita. Dodatak višestrukih dijetarnih antioksidansa (vitamina A, C i E) reducira mijelosupresiju, bez zaštite stanica raka u miševa nad kojima se provodi radijoimunoterapija (Prasad 2004). U malim dozama, pojedina ni antioksidansi mogu stimulirati rast nekih kancerogenih stanica. Primjerice, vitamin C u dozama od 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  stimulira rast ljudskih stanica raka žlezde slinovnice (Slika 3) kao i ljudskih leukemijskih stanica u kulturi. Takve niske doze vitamina C nemaju značajni učinak na rast ostalih stanica raka.



Slika 3. Učinak vitamina C na rast ljudskih tumorskih stanica žlezde slinovnice u kulturi (2HPG1). Stanice (100,000/60 mm po dozi) nastane su u kulturi tkiva, i svježe pripremljena otopina natrijeva askorbata u različitim koncentracijama je dodana 24 h poslije. Svježe napravljen natrijev askorbat i podloga su promjenjeni nakon dva dana tretmana. Rast je određen trećeg dana nakon obrade. Svaka vrijednost (+/- SEM) predstavlja prosjek od 9 uzoraka (Prasad i sur., 1996).

Niske doze sintetičkog  $\beta$ -karotena, povećale su učestalost pojavljivanja raka pluća među populacijom teških pušača. Mehanizam stimulacije rasta kancerogenih stanica pri niskim dozama

pojedina njih antioksidansa je nepoznat. Zato što postoji velika razlika između u inkovima kojeg proizvode niske i visoke doze nekih antioksidansa kao što su vitamin E, C i karotenoidi, i zato što pojedina ni antioksidansi u oksidiranom stanju mogu djelovati kao radikali, upotreba samo individualnih antioksidansa u dugoročnoj liječenju nema znanstvene podloge (Prasad i sur., 2001).

#### 2.1.4. POJEDINA NI ILI MNOGOSTRUKI ANTIOKSIDANSI

Mješavina četiri antioksidansa (13-cis-retinoične kiseline, natrijevog askorbata,  $\alpha$ -TS i polarnog karotenoida, bez  $\beta$ -karotenske aktivnosti) izrazito inhibira rast ljudskih melanoma stanica u kulturi. Ti antioksidansi pojedinačno nemaju nikakvog učinka na rast tumorskih stanica (Tablica 3).

**Tablica 3.** Učinak mješavine četiri antioksidansa na rast ljudskih stanica melanoma u kulturi (Prasad i sur., 2001).

Treatments	Cell Number (% of Controls)
Vit C (50 $\mu\text{g/mL}$ )	102 $\pm$ 5
PC (10 $\mu\text{g/mL}$ )	96 $\pm$ 2
$\alpha$ -TS (10 $\mu\text{g/mL}$ )	102 $\pm$ 3
RA (7.5 $\mu\text{g/mL}$ )	103 $\pm$ 3
Vit C (50 $\mu\text{g/mL}$ ) + PC (10 $\mu\text{g/mL}$ ) + $\alpha$ -TS (10 $\mu\text{g/mL}$ ) + RA (7.5 $\mu\text{g/mL}$ )	56 $\pm$ 3
Vit C (100 $\mu\text{g/mL}$ )	64 $\pm$ 3
Vit C (100 $\mu\text{g/mL}$ ) + PC (10 $\mu\text{g/mL}$ ) + $\alpha$ -TS (10 $\mu\text{g/mL}$ ) + RA (7.5 $\mu\text{g/mL}$ )	13 $\pm$ 1
Vit C (50 $\mu\text{g/mL}$ ) + PC (5 $\mu\text{g/mL}$ ) + $\alpha$ -TS (5 $\mu\text{g/mL}$ ) + RA (3.8 $\mu\text{g/mL}$ )	98 $\pm$ 4

Data were summarized from a previous publication [20].

Values are mean  $\pm$  SEM.

PC = Polar carotenoids (PC) originally referred to as beta-carotene [40].

Ako se doza jednog od antioksidansa udvostruči (vitamin C) i dalje dolazi do redukcije rasta tumorskih stanica u kulturi. Mješavina od četiri različita antioksidansa je također bila više učinkovita od pojedinačnih antioksidansa u reduciranju rasta ljudskih stanica raka žlijezde slinovnice (Tablica 4) (Prasad i sur., 2001).

**Tablica 4.** Efekt mješavine četiri antioksidansa na rast ljudskih tumorskih stanica žljezde slinovnice u kulturi

Treatments	Cell Number (% of Controls)
$\alpha$ -TS (10 $\mu$ g/mL)	90 $\pm$ 5
$\alpha$ -TS (20 $\mu$ g/mL)	62 $\pm$ 4
RA (7.5 $\mu$ g/mL)	89 $\pm$ 2
RA (15 $\mu$ g/mL)	55 $\pm$ 2
Vit C (100 $\mu$ g/mL)	98 $\pm$ 3
PC (10 $\mu$ g/mL)	60 $\pm$ 5
PC (20 $\mu$ g/mL)	30 $\pm$ 1
Vit C (100 $\mu$ g/mL) + PC (10 $\mu$ g/mL) + $\alpha$ -TS (10 $\mu$ g/mL) + RA (7.5 $\mu$ g/mL)	40 $\pm$ 2
Vit C (100 $\mu$ g/mL) + PC (20 $\mu$ g/mL) + $\alpha$ -TS (10 $\mu$ g/mL) + RA (7.5 $\mu$ g/mL)	19 $\pm$ 2
Vit C (100 $\mu$ g/mL) + PC (10 $\mu$ g/mL) + $\alpha$ -TS (10 $\mu$ g/mL) + RA (7.5 $\mu$ g/mL)	10 $\pm$ 1
Vit C (100 $\mu$ g/mL) + PC (10 $\mu$ g/mL) + $\alpha$ -TS (10 $\mu$ g/mL) + RA (15 $\mu$ g/mL)	25 $\pm$ 3

Values are mean  $\pm$  SEM.

PC = polar carotenoids, originally referred to as beta-carotene [40].

$\alpha$ -TS =  $\alpha$ -tocopheryl succinate (vitamin E).

Vit C = Vitamin C (sodium ascorbate).

RA = 13-cis Retinoic acid.

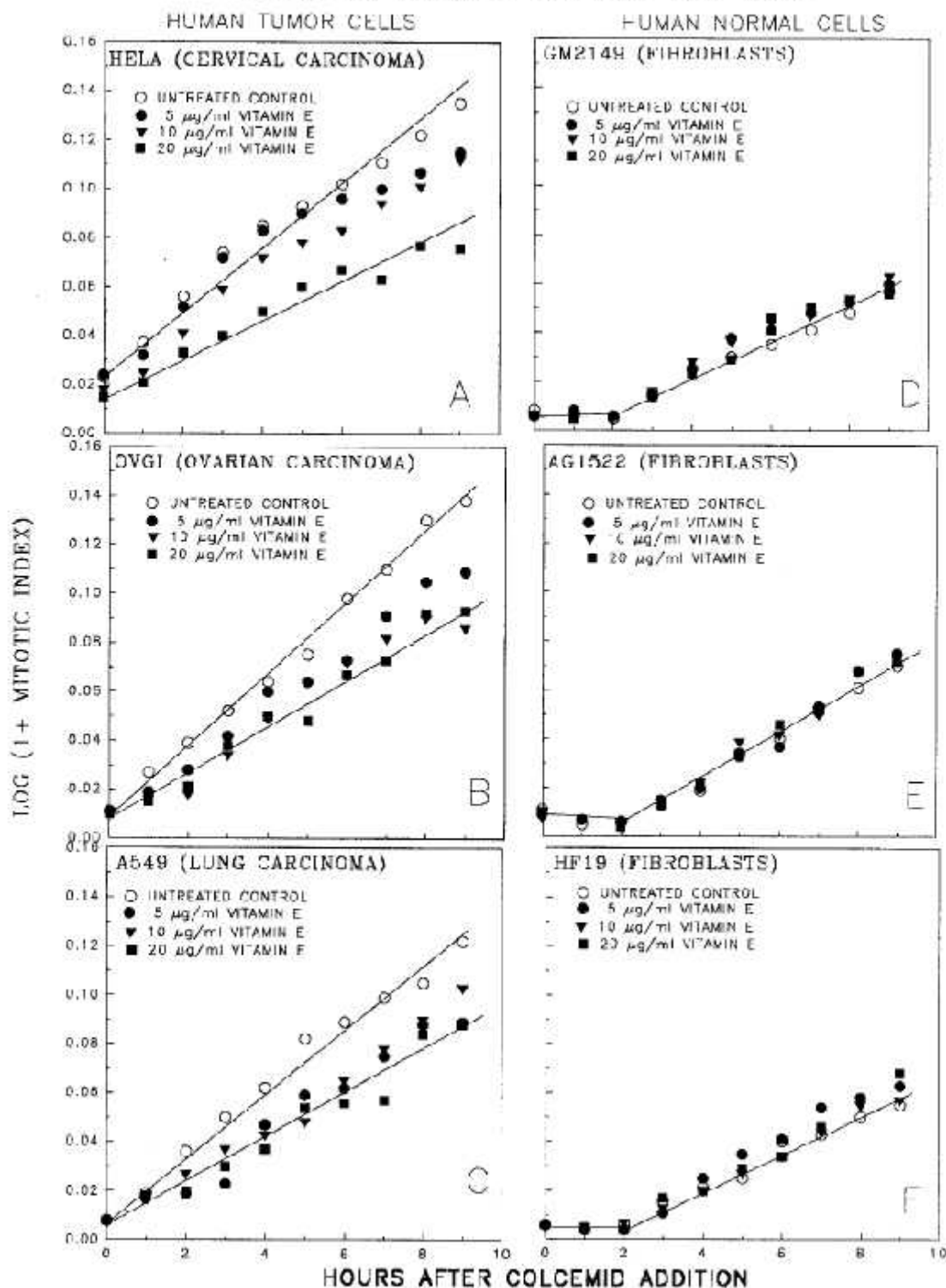
Data were summarized from a previous publication [16].

Ovakva istraživanja su važna jer ukazuju na to da mješavina antioksidansa može biti puno više efektivna od pojedina njih antioksidanta u reduciranju rasta tumorskih stanica.

### 2.1.5. NORMALE STANICE / STANICE RAKA

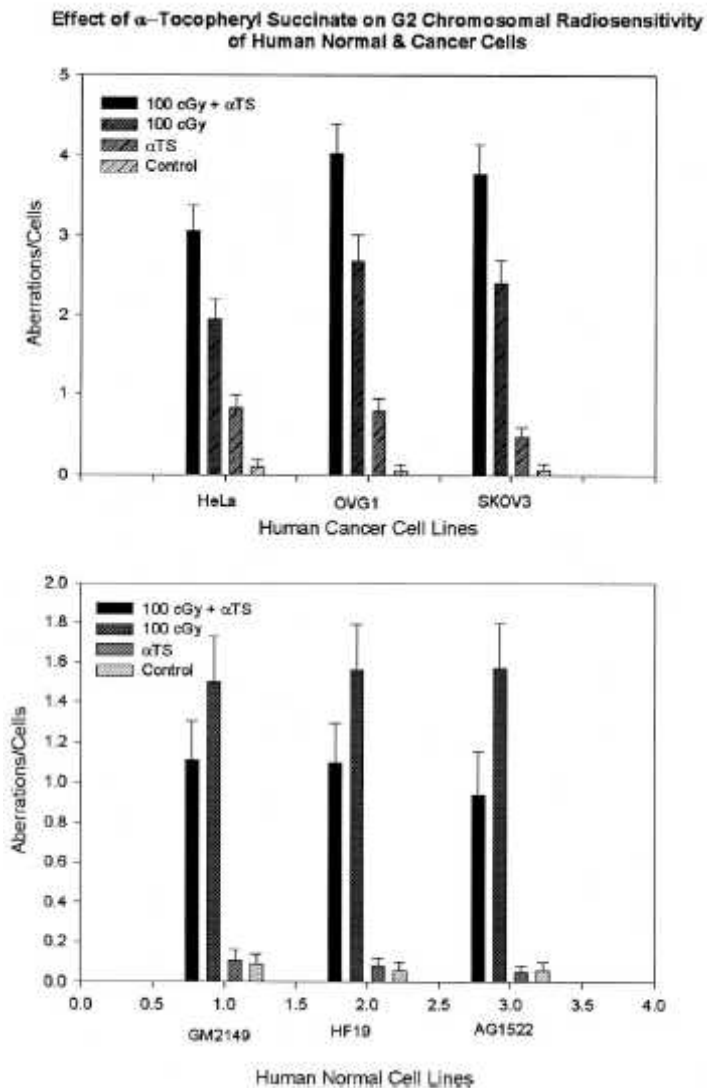
Visoke doze pojedina njih antioksidansa ili nemaju nikakvog uinka na normalne stanice ili prouzrokuju relativno manju inhibiciju rasta na stanice raka u kulturi.  $\alpha$ -TS inducira apoptozu u ljudskim stanicama raka prostate, ali ne i u normalnim stanicama prostate *in vitro* uvjetima.  $\alpha$ -TS smanjuje akumulaciju mitotičkih stanica u tri različite stanične linije raka, ali ni i kod normalnih ljudskih fibroblasta (Slika 4).

EFFECTS OF VITAMIN E ON HUMAN CELL CYCLE



Slika 4. U inak -TS mitotsku akumulaciju u tri stani ne linije raka i tri normalne ljudske stani ne linije fibroblasta. Smanjena mitotska akumulacija je vi ena u stani nim linijama raka (A-C), ali ne i u normalnih fibroblasta (D-F). Zna ajna razlika u p = 0,05 je uo ena u svim tumorskim linijama (A-C) pri 20 µl/mL, -TS u svim to akama koje su uspole ivane sa kontrolonim uzorkom( Jha i sur., 2001).

Nadalje,  $\alpha$ -TS inducira kromosomska ošte enja u stanicama raka cerviksa kao i u ljudskim stanicama raka jajnika, ali na normalne ljudske fibroblaste nema u inka (Slika 5).



**Slika 5.** U inak d- -tokoferil sukcinata ( $\alpha$ -TS) na razinu kromosomskih ošte enja uzrokovanih radijacijom u ljudskim stanicama raka cerviksa (HeLa stanice), i stani noj liniji raka jajnika (OVG1 i SKOV3), te u normalnim ljudskim fibroblastima (GM2149, HF19 i AG1522). Obrada samo sa  $\alpha$ -TS pove ava kromosomska ošte enja u svim trima stani nim kacerogenim linijma, ali ne i u normalnim stani nim linijama. Obrada s  $\alpha$ -TS tako er poja ava efekt kromosmskog ošte enja koje uzrokuje zra enje, ali štiti normalne stanice od takve štete. Razlika u stanicama raka izme u kontrolne i pokusne grupe te izme u kontrolne (samo sa zra enjem) i eksperimentalne grupe (zra enje +  $\alpha$ -TS) je zna ajna pri  $p=0.05$  (Kumar B i sur., 2001).

Razlog različitog utjecaja inka kojeg imaju antioksidansi na normalne stanice i stanice raka je nepoznat. U slučaju vitamina C, veća osjetljivost tumorskih stanica može biti povezana s većom unutarstaničnom koncentracijom tog antioksidansa. U slučaju  $\alpha$ -TS, veća osjetljivost tumorskih stanica.

**Tablica 2.** Nakupljanje  $\alpha$ -tokoferil sukcinata ( $\alpha$ -TS) u ljudskim stanicama raka (HeLa stanice) i normalnim ljudskim fibroblastima nakon 24 h obrade sa  $\alpha$ -TS. Uinkovitost oporavka bila je između 55-75%. Nivo akumulacije nakon obrade stanica sa  $\alpha$ -TS tijekom 24 h bio je sličan kao i u HeLa stanicama normalnih fibroblasta. Svako mjerenje je ponovljeno dva puta.

(Kumar i sur., 2001).

Concentrations of $\alpha$ -TS	Accumulation of $\alpha$ -TS ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	
	Fibroblasts	HeLa cells
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (37.6 $\mu\text{M}$ )		
Experiment 1	1.07	1.23
Experiment 2	0.89	1.02
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (18.8 $\mu\text{M}$ )		
Experiment 1	1.38	1.87
Experiment 2	1.04	0.93

Jedno istraživanje pokazalo je da su stanice tumora *in vivo* više osjetljive na nedostatak antioksidansa (vitamin A i E) od normalnih stanica ako uspoređujemo na razini inhibicije rasta (Jha i sur., 1991). Sve normalne i tumorske stanice zahtijevaju određenu količinu antioksidansa za svoj rast i preživljavanje. Zbog toga, nedostatak bilo kojeg od antioksidansa bi moglo usporiti rast i tumorskih i normalnih stanica. Moguće je da su tumorske stanice mnogo više osjetljivije na nedostatak antioksidantnih vitamina od normalnih stanica. U svakom slučaju, takva opažanja nemaju terapijsku važnost kod raka u ljudi, zato što nedostatak vitamina E ili A može uzrokovati ozbiljne neuronske probleme, od kojih su neki ireverzibilni. Treba istaknuti da nedostatak vitamina E je jako teško postići, barem što se tiče ljudi (Prasad, 2004).

### **2.1.6. DUŽINA TERAPIJE**

Obrada antioksidansima u kratkom vremenu (par sati) ne mora inhibirati rast kancerogenih stanica, me utim obrada stanica raka kroz duži period (24 h ili više ) sa istom dozom antioksidansa može uzrokovati inhibiciju rasta tih stanica. Zbog relativne nestabilnosti antioksidansa u mediju i zato što se u mediju ne nalaze neki osnovni mikronutrijenti, potrebno je mijenjati sam mediji i antioksidanse u njemu svaka dva dana nakon po etka obrade. U istraživanju u inka antioksidansa u kombinaciji sa standardnim kemoterapijskim lijekovima, važno je odrediti ne samo dužinu same terapije, nego i to no vrijeme dodavanja ode enog antioksidansa u odnosu na kemoterapijske lijekove. Op enito, stanice su antioksidansima obra ene prije i poslje obrade koja uklju uje radijaciju ili druge kemikalije. Dobiveni rezultati takvih obrada mogu se razlikovati i kvalitativno i kvantitativno jedno od drugog. Primjerice, obrada nekim antioksidansom nekoliko sati prije ili poslje obrade s kemoterapijskim lijekom, ne mora pove ati u inak inhibicije rasta tih lijekova na stanice raka. No, ista takava obrada samo u razdoblju od tri dana, u istim pokusnim uvjetima, može pove ati u inak inhibicije rasta lijekova na stanice raka. Zbog toga, podaci o inhibiciji rasta abnormalnih i stanica raka koji su dobiveni nakon obrade s višestrukom dozom antioksidansa koji su korišteni u dužem periodu prije i poslje kemoterapijskih lijekova i u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, možda su više važni u kemoterapiji nego korištenje mješavine antioksidansa nakon kemoterapijske obrade u kra em periodu (Prasad i sur., 2001).

### **2.1.7. NEMAJU SVI ANTIOKSIDANSI ISTI UTJECAJ NA STANICE RAKA**

U inkovitost antioksidansa ovisi o stani nom okruženju u kojem djeluju. primjerice -karoten je puno u inkovitiji u hvatanju slobodnih radikala kisika u usporedbi s drugim antioksidansima ( Krinsky, 1989). -karoten je u inkovit u hvatanju slobodnih radikala kisika pri nižim tlakovima kiska, dok je -tokoferol bolji pri višim tlakovima ksika u stanicama (Vile i Winterbourn, 1988). -karoten pove ava ekspresiju gena za koneksin, dok vitamin A to ne radi (Zhang i sur., 1992). -karoten i vitamin C sprije avaju atooksidaciju -tokoferola (Carini i sur., 1990). Vitamin C je



u inkovit antioksidans u vodenom okruženju, dok su vitamin A, -karoten i vitamin E naju inkovitiji kao antioksidansi u lipidnom okruženju. Vitamin A inducira diferencijaciju stanica epitelnog porijekla u nekim tumorima, dok - karoten i -tokoferol ne. -tokoferol i - karoten induciraju diferencijaciju u mišjim stanicama melanoma, dok vitamin C i A to ne rade (Hazuka i sur., 1990). Vitamin C inhibira rast tumorskih stanica ali ne uzrokuje i njihovu diferencijaciju ( Prasad i sur., 1979). Ova istraživanja ukazuju na to da svi antioksidansi nemaju isti u inak na stanice raka.

Neki predloženi mehanizmi za poboljšanje u inka x-zra enja i kemoterapijskih lijekova a koji uklju uju antioksidanse uklju uju sljede e: a) visoke doze antioksidansa prije radijacije ili kemoterapijskih lijekova uzrokuju ošte enja u stanicama raka ali ne i u normalnim stanicama, a tijekom terapije pojavljuju se dodatna ošte enja u kancerogenim stanicama uzrokovane nekim drugim mehanizmom a ne pomo u slobodnih radikala kisika, b) retinoi na kiselina inhibira popravak štete uzrokovane radijacijom u stanicama raka, i zbog toga šteta u tim stanicama se još više pove ava prisutnoš u retinoi ne kiseline i nakon radijacije, c) -TS inducirana apoptoza u stanicama raka je neovisna o p53 i p21, dok je 5-FU inducirana apoptoza posredovana sa p53 i p21, i zbog toga kombinacija antioksidansa i kemoterapeutika je više u inkovitija nego njihovo zasebno korištenje, d) visoka ekspresija c-myc i H-ras onkogeni pove ava radiootpornost tumorskih stanica, dok visoka doza -TS reducira ekspresiju ta dva onkogeni, i zbog toga korištenje -TS prije same radijacije može pove ati osjetljivost tih stanica na radijaciju, i e) -TS se ponoša kao lijek protiv angiogeneze, dok standardni kemoterapijski lijekovi ne, i zbog toga kombinacija -TS i lijeka bi možda bila više u inkovita od samostalnog lijeka (Prasad, 2001).

### **3. LITERATURA**

Semba R. D., A. L. Scott, G. Natadisastra, S. Wirasasmita, L. Mele. E. Ridwan, K. P. West, and A.Sommer. Depressed immune response to tetanus in children with vitamin A deficiency. *J. Nutr.* 122:101, 1992.

Machlin. L. J., and A. Bendich, Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* 1441-445, 1987.

Adrienne Bendich: Physiological Role of Antioxidants in the Immune System, *Journal of Dairy Science* Vol. 76, No. 9, 2789-2794, 1993.

Bendich. A., Carotenoids and immunity. *Clin. Appl. Nutr.* 1:45-52, 1991.

Kedar N. Prasad, Rationale for Using High-Dose Multiple Dietary Antioxidants as an Adjunct to Radiation Therapy and Chemotherapy, American Society for Nutritional Sciences. *J. Nutr.* 134: 3182S–3183S, 2004.

Kedar N. Prasad, PhD, William C. Cole, PhD, Bipin Kumar, MD, and K. Che Prasad : Scientific Rationale for Using High-Dose Multiple Micronutrients as an Adjunct to Standard and Experimental Cancer Therapies, *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 20, No. 5, 450S–463S, 2001.

Prasad KN, Cole WC, Hovland P: Cancer prevention studies: Past, present and future, *Nutrition* 14:197–210, 1998.

Prasad KN, Edwards-Prasad J: Effect of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture, *Cancer Res.* 42:550–555, 1982.

Yu W, Israel K, Liao QY, Aldaz CM, Sanders BG, Kline K: Vitamin E succinate (VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: role for Mr 43,000 Fas in VES-triggered apoptosis, *Cancer Res* 59:953–61, 1999.

Turley J, Ruscetti F, Kim S-J, Fu T: Vitamin E succinate inhibits proliferation of BT-20 human breast cancer cells: Increased binding of cyclic AMP negatively regulates E<sub>2</sub>F transactivation activity, *Cancer Res* 57:2668–2675, 1997.

Prasad KN, Kumar R: Effect of individual antioxidant vitamins alone and in combination on growth and differentiation of human non-tumorigenic and tumorigenic parotid acinar cells in culture. *Nutr Cancer* 26:11–19, 1996.

Jha MN, Bedford JS, Cole WC, Edwards-Prasad J, Prasad KN: Vitamin E (d- $\alpha$  tocopheryl succinate) decreases mitotic accumulation in  $\gamma$ -irradiated human tumor, but not in normal cells. *Nutr Cancer* 35:189–194, 1999.

Kumar B, Jha MN, Cole WC, Bedford JS, Prasad KN: d- $\alpha$  tocopheryl succinate (vitamin E) enhances radiation-induced chromosomal damage levels in human cancer cells, but reduces it in normal cells. *J Am Coll Nutr*, Vol. 21, No. 4, 339-343, 2002.

Krinsky N: Antioxidant Functions of Carotenoids. *Free Radical Biol & Med* 7:617–635, 1989.

Vile GF, Winterbourn CC: Inhibition of Adriamycin Promoted Microsomal Lipid Peroxidation By  $\beta$ -Carotene,  $\alpha$ -Tocopherol and Retinal At High and Low Oxygen Partial Pressure. *FEBS Lett* 238:353–356, 1988.

Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS: Carotenoids up-regulate connexin-43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 52:5707–5712, 1992.

Carini R, Poli G, Dianzani MU, Maddix SP, Slater TF, Cheeseman KH: Comparative evaluation of the amount of the antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate and  $\alpha$ -tocopherol succinate in isolated hepatocytes and liver microsomal suspensions. *Biochem Pharmacol* 39:1597–1601, 1990.

Hazuka MB, Edwards-Prasad J, Newman F, Kinzie JJ, Prasad KN: Beta-carotene induces morphological differentiation and decreases adenylate cyclase activity in melanoma cells in culture. *J Am Coll Nutr* 9:143–9, 1990

Prasad KN, Edwards-Prasad J: Effect of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. *Cancer Res* 42:550–555, 1982

Prasad KN, Sinha PK, Ramanujam M, Sakamoto A: Sodium ascorbate potentiates the growth inhibitory effect of certain agents on neuroblastoma cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 829–832, 1979

Prasad KN, Edwards-Prasad J: Expressions of some molecular cancer risk factors and their modification by vitamins. *J Am Coll Nutr* 9:28–34, 1990.

Salganik R, Albright C, Rodgers J, et al: Enhancement of apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice by depletion of antioxidants (abstract). American Society for Cell Biology, Annual Meeting, 1999. Washington, D.C.: Am Soc Cell Biol, 444a, 1999.

dr.sc. Spomenka Kovač, docent mr.sc. Valentina Bušić, *Antiosidanski u hrani*, Osijek, skripta, 2009.

<http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763>

<http://www.vasezdravlje.com/izdanje/clanak/357/1/>

[http://images.google.co.uk/imgres?imgurl=http://www.biol.pmf.hr/e-skola/radovi/karoten/klorofil.gif&imgrefurl=http://www.biol.pmf.hr/e-skola/radovi/karoten/Karoten.htm&usg=\\_\\_LEP1HIsJzVpBt0D2pi3UruPnSas=&h=266&w=440&sz=4&hl=en&start=2&tbnid=GsiLVbtq97zcSM:&tbnh=77&tbnw=127&prev=/images%3Fq%3Dkarotenoidi%26hl%3Den](http://images.google.co.uk/imgres?imgurl=http://www.biol.pmf.hr/e-skola/radovi/karoten/klorofil.gif&imgrefurl=http://www.biol.pmf.hr/e-skola/radovi/karoten/Karoten.htm&usg=__LEP1HIsJzVpBt0D2pi3UruPnSas=&h=266&w=440&sz=4&hl=en&start=2&tbnid=GsiLVbtq97zcSM:&tbnh=77&tbnw=127&prev=/images%3Fq%3Dkarotenoidi%26hl%3Den)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_E](http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_E)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_c](http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_c)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_a](http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_a)

<http://www.medicina.hr/clanci/kemoterapija.htm>

## 4. SAŽETAK

Mnogo je članaka objavljeno o ulozi antioksidansa, pravilnom načinu ishrane i prilagodbi života u svrhu sprječavanja pojave raka. No, potencijalna uloga tih faktora na utjecaj raka kod ljudi je većinom bila zapostavljena. Opsežna in vitro i ograničena in vivo istraživanja su otkrila da individualni antioksidansi kao što je vitamin A (retinoidi), vitamin E (primarno  $\alpha$ -tokoferil sukcinat), vitamin C (primarno natrijev askorbat) i karotenoidi (primarno polarni karotenoidi) induciraju diferencijaciju i inhibiciju rasta stanica, različitim mehanizmima, i u različitim postotcima u stanicama raka kod ljudi i glodavaca. Predloženi mehanizmi za te efekte uključuju inhibiciju aktivnosti protein kinaze C, prostaglandin E1 stimuliranu adenilat ciklaznu aktivnost, ekspresiju c-myc, H-ras, i transkripcijskog faktora (E2F) te indukciju transformirajućeg faktora rasta-b i p21 gena. Nadalje, vitamini sa antioksidativnom aktivnošću individualno ili u kombinaciji, pospješuju efekt inhibicije rasta uzrokovanog x-zračenjem, kemoterapijskim lijekovima, hipertermijom, i modifikatorom biološkog odgovora na tumorske stanice, primarno u in vitro uvjetima. Ovi vitamini, korišteni individualno, također reduciraju toksičnost koju prouzrokuju standardni tumorski terapijski lijekovi na normalne stanice. Prehrana s niskim udjelom masti i visokim udjelom vlakna može povećati efikasnost standardnih kemoterapijskih lijekova; pretpostavljeni mehanizam djelovanja uključuje povećanu razinu butanske kiseline i vezanje potencijalnih mutagena u gastrointestinalnom traktu na vlakna te smanjenje rasta promovirajućih agenata kao što su prostaglandini, određene masne kiseline i estrogen. Zbog toga je predložena hipoteza u kojoj nadomjestak s mješavinom vitamina s antioksidanskim svojstvima zajedno sa načinom prehrane i promjenom stila života mogu poboljšati efikasnost standardne i eksperimentalne kemoterapije.

## 5. SUMMARY

Numerous articles and several reviews have been published on the role of antioxidants, and diet and lifestyle modifications in cancer prevention. However, the potential role of these factors in the management of human cancer have been largely ignored. Extensive in vitro studies and limited in vivo studies have revealed that individual antioxidants such as vitamin A (retinoids), vitamin E (primarily  $\alpha$ -tocopheryl succinate), vitamin C (primarily sodium ascorbate) and carotenoids (primarily polar carotenoids) induce cell differentiation and growth inhibition to various degrees in rodent and human cancer cells by complex mechanisms. The proposed mechanisms for these effects include inhibition of protein kinase C activity, prostaglandin E1-stimulated adenylate cyclase activity, expression of c-myc, H-ras, and a transcription factor (E2F), and induction of transforming growth factor- $\beta$  and p21 genes. Furthermore, antioxidant vitamins individually or in combination enhance the growth-inhibitory effects of x-irradiation, chemotherapeutic agents, hyperthermia, and biological response modifiers on tumor cells, primarily in vitro. These vitamins, individually, also reduce the toxicity of several standard tumor therapeutic agents on normal cells. Low fat and high fiber diets can further enhance the efficacy of standard cancer therapeutic agents; the proposed mechanisms for these effects include the production of increased levels of butyric acid and binding of potential mutagens in the gastrointestinal tract by high fiber and reduced levels of growth promoting agents such as prostaglandins, certain fatty acids and estrogen. Therefore is proposed a working hypothesis that multiple antioxidant vitamin supplements together with diet and lifestyle modifications may improve the efficacy of standard and experimental cancer therapies