

Received: 2007.03.20  
Accepted: 2007.10.10  
Published: 2007.10.24

## Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych\*

Induction of phase II enzymes as a strategy in the chemoprevention of cancer and other degenerative diseases

Violetta Krajka-Kuźniak

Katedra Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

### Streszczenie

Charakterystyczną cechą procesu nowotworzenia, a także niektórych innych schorzeń określanych jako degeneracyjne zarówno w układach eksperymentalnych i, jak można przypuszczać, również u człowieka, jest stosunkowo długi okres, jaki upływa od chwili inicjacji do rozwoju klinicznej postaci nowotworu, który stwarza wiele możliwości wczesnej interwencji. Rola metabolizmu ksenobiotyków w indukcji procesu kancerogenezy została dobrze określona w ciągu ostatniego półwiecza. Jednak dopiero ostatnie lata, dzięki wykorzystaniu nowych narzędzi badawczych, umożliwiających zrozumienie mechanizmu indukcji, dostarczyły przekonujących dowodów, że selektywna indukcja enzymów II fazy jest skuteczną metodą ochrony komórki przed oddziaływaniem zarówno reaktywnych metabolitów związków kancerogennych jak i reaktywnych form tlenu (RFT). Daje to wyraźne podstawy do zastosowania jej jako strategii chemioprewencyjnej w profilaktyce nowotworów, a także ogólnej chemioprotekcji. Dotyczy to przede wszystkim S-transferaz glutationu i reduktazy NAD(P)H: chinon.

W artykule omówiono charakterystykę i funkcję tych dwóch układów enzymatycznych oraz mechanizm ich indukcji, a także związków, które indukując enzymy II fazy działają jako potencjalne czynniki chemioprewencyjne.

Słowa kluczowe:

GST • izoenzymy GST • NQ01 • indukcja • chemioprewencja • nowotwory

### Summary

The long interval which occurs between the initiation and the development of clinically defined cancer is a characteristic feature of carcinogenesis and other degenerative diseases in experimental models and in humans. This makes early intervention possible. In the last half century, the role of xenobiotic metabolism in the induction carcinogenesis has been thoroughly described. Recent research using new tools provide data helpful in understanding the mechanism of induction and convincing proof that selective induction of phase II enzymes is an effective way of protecting cells against reactive carcinogenic metabolites and reactive oxygen species. These results create a foundation for applying this approach as a chemopreventive and chemoprotective strategy. S-transferase glutathione and reductase NAD(P)H-quinone are enzymes of concern. In this paper the characteri-

\* Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2004–2006 jako projekt badawczy KBN 2P05F 049 26.

stics and function of these two enzymatic systems are presented as well as the mechanism of induction of compounds, which induce phase II enzymes and act as potential chemopreventive agents.

**Key words:** GST • isozymes GST • NQO1 • induction • chemoprevention • cancers

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/11393.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11393.pdf)

**Word count:** 4928

**Tables:** –

**Figures:** 3

**References:** 99

**Adres autorki:** dr n. farm. Violetta Krajka-Kuźniak, Katedra Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święckiego 4, 60-781 Poznań; e-mail: vkrajka@ump.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **AITC** – izotiocyjanian allilu; **ARE** – element odpowiedzi antyoksydacyjnej; **BITC** – izotiocyjanian benzylu; **BHA** – butylohydroksyanizol; **EQ** – etoksychinon; **GSH** – glutation; **GST** – S-transferaza glutationowa; **HNE** – 4-hydroksynonenal; **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny; **NQO1** – reduktaza NAD(P)H: chinon 1; **Nrf2** – jądrowy czynnik 2; **PEITC** – izotiocyjanian fenetylu; **PERK** – kinaza białkowa zlokalizowana w retikulum endoplazmatycznym; **PI3K** – kinaza fosfatydyloinozytolu; **PKC** – kinaza białkowa C; **PWA** – policykliczne węglowodory aromatyczne; **RFA** – reaktywne formy azotu; **RFT** – reaktywne formy tlenu.

## WPROWADZENIE

Profilaktyka chorób degeneracyjnych, zwłaszcza nowotworów, za pomocą syntetycznych środków farmakologicznych i/lub naturalnych składników diety, zwłaszcza tzw. nieodżywczych składników żywności, stanowi ważną alternatywę ciągle nieskutecznej terapii. Chemioprewencja ma na celu zahamowanie lub odwrócenie procesu kancerogenezy na jego możliwie najwcześniejszych etapach. Doświadczenia ostatnich ponad 30 lat dostarczyły dowodów, że tego rodzaju podejście jest możliwe i może być skuteczne. Zarówno w modelach doświadczalnych, jak i u ludzi proces indukcji nowotworów wiąże się z akumulacją wielu mutacji w krytycznych genach, którym towarzyszy wiele zjawisk o charakterze epigenetycznym. Charakterystyczną cechą tego procesu w obydwu systemach jest stosunkowo długi okres, jaki upływa od chwili inicjacji do rozwoju klinicznej postaci nowotworu, który stwarza wiele możliwości wczesnej interwencji. Rolę metabolizmu ksenobiotyków w regulacji kancerogenezy dobrze określono w ciągu ostatniego półwiecza. Jednak dopiero ostatnie lata, dzięki wykorzystaniu nowych narzędzi badawczych umożliwiających zrozumienie mechanizmu indukcji dostarczyły przekonujących dowodów, że selektywna indukcja enzymów II fazy jest skuteczną metodą ochrony komórki przez oddziaływaniem zarówno reaktywnych metabolitów jak i reaktywnych form tlenu (RFT). Daje to wyraźne podstawy do zastosowania jej jako strategii chemioprewencyjnej w profilaktyce nowotworów, a także ogólnej chemioprotekcji. Dotyczy to przede wszystkim S-transferazy glutationu i reduktazy NAD(P)H: chinon.

## S-TRANSFERAZY GLUTATIONOWE: CHARAKTERYSTYKA, NOMENKLATURA I FUNKCJA

Szczegółowa charakterystyka GST była już opisywana kilkakrotnie w polskim piśmiennictwie naukowym, dlatego

w niniejszym opracowaniu przedstawiono jedynie podstawowe informacje odsyłając czytelnika do wcześniejszych artykułów przeglądowych [11,42,44].

S-transferazy glutationowe (GST) [EC 2.5.1.18.] występują powszechnie w świecie żywych organizmów (ssaków, roślin, bakterii i owadów). Wyróżnia się trzy główne grupy GST: cytosolowe, mitochondrialne i mikrosomalne. Mikrosomalne GST są nazywane „białkami związanymi z błoną, biorącymi udział w metabolizmie eikozanoidów i glutationu” (MAPEG). Wśród cytosolowych GST wyodrębniono następujące klasy:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\omega$  [70]. Homologia sekwencji aminokwasów w tej samej klasie wynosi ponad 50%, a pomiędzy klasami 25–30%, niezależnie od gatunku ssaka [27]. W macierzy mitochondrialnej występuje klasa rozpuszczalnych GST nazywana kappa [70].

GST stanowią rodzinę wielofunkcyjnych białek, które działają jako ważne enzymy detoksykacyjne oraz wewnątrzkomórkowe białka wiążące, pełniące funkcje transportujące. Jako enzymy katalizują one reakcje sprzęgania między nukleofilowym zredukowanym glutationem i związkami elektrofilowymi. Katalityczna aktywność GST jest związana z detoksykacją kancerogenów, leków przeciwnowotworowych, pestycydów i herbicydów. GST odpowiada za detoksykację reaktywnych produktów, powstałych w czasie oksydacyjnego stresu, takich jak  $\alpha$ -,  $\beta$ -nienasycone karbonyle, chinony i wodoronadtlenki [75]. Ponadto GST działają jako białka magazynujące oraz służą do wewnątrzkomórkowego transportu związków, które mają ograniczoną rozpuszczalność w wodzie [3]. Istnieje wiele mechanizmów transportowych prowadzących do eliminacji koniugatów glutationu, takich jak: zależna od ATP pompa dla koniugatów z GSH, wielospecyficzny transporter anionów organicznych (multispecific organic anion transporter – MOAT), anionowy transporter koniugatów S-GSH dinitro-

fenoli (Dnp-SG ATP-aza), P-glikoproteina (170 kDa wielolekowa pompa oporności) i białko związane z wielolekową opornością (MRP; 190 kDa glikoproteina) [75].

Swoistość substratowa izoenzymów GST jest ogólnie opisywana jako szeroka i częściowo pokrywająca się, istnieją jednak pewne specyficzne substraty, które wykorzystuje się do klasyfikacji izoenzymów GST. Izoenzymy klasy  $\alpha$  ogólnie wykazują dużą aktywność peroksydazową, izoenzymy klasy  $\pi$  są bardzo aktywne wobec kwasu etakrynowego. Tlenek transtilbenu służy jako selektywny marker klasy  $\mu$ . Chlorowane nitrobenzeny są stosowane jako standardowe substraty wszystkich GST z wyjątkiem klasy  $\theta$ . GST klasy  $\theta$  katalizują aktywację małych bifunkcyjnych elektrofilów, takich jak dichlorometan, dibromek etylenu i diepoksyd butadienu [24].

Ponieważ izoenzymy GST biorą udział w metabolizmie nie tylko różnego rodzaju ksenobiotyków, ale także endogennych substratów stąd ich zmieniona ekspresja w określonych tkankach, a także w surowicy i moczu może być ważnym wskaźnikiem diagnostycznym. Na przykład podwyższone poziomy GST klasy  $\alpha$  w surowicy i/lub moczu stwierdzano w przypadku ostrego i przewlekłego zapalenia wątroby oraz uszkodzenia nerek. Z tego powodu pomiar GST  $\alpha$  w surowicy i moczu okazał się lepszym wskaźnikiem wczesnego odrzucenia przeszczepu wątroby i nerek niż badanie transaminazy [33,90]. Pomiar ekspresji GST  $\alpha$  w płynach biologicznych może być też wskaźnikiem stresu oksydacyjnego w wątrobie i nerkach [94]. Zwiększone poziomy GST klasy  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  mogą być związane z ochroną tkanek przed cytotoksycznością, a także kancerogennym działaniem acetaminofenu, tetrachloru węgla i aflatoksyny B1 [88]. Oczyszczone GST  $\mu$ ,  $\pi$  i  $\theta$  wykazują duże aktywności wobec epoksydów i epoksydioli, metabolitów policyklicznych węglowodorów (PWA). Związki te powszechnie występują w środowisku człowieka, m.in. w dymie tytoniowym [21]. Ponadto, nadekspresja GST klasy  $\alpha$  w komórkach wzmacnia ich ochronę przed nekrotycznym działaniem wywołanym przez cyklofosamid lub dietylonitrozoaminę [88].

Sprzęganie ksenobiotyków z glutationem w większości przypadków prowadzi do ich unieczynniania, jednak niektóre produkty sprzęgania są nawet bardziej aktywne niż związki macierzyste. Na przykład tego typu związkami są chlorowcopochodne alkanów (np. 1,2-dichloroetan, 1,2-dibromo-3-chloropropan), hydroksychinony, aminofenole (np. p-aminofenol). S-koniugaty glutationu tych związków lub produkty ich przemian są wyłapywane z krwiobiegu przez nerki, co wiąże się z ich nefrotoksycznością. Związki takie jak N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna (MNNG), aktywowane w wyniku sprzęgania z glutationem, uszkadzają DNA mogą inicjować proces kancerogenezy [58].

Inną funkcją GST jest obrona przed reaktywnymi formami tlenu (RFT), które uszkadzają komórkowe makrocząsteczki, takie jak kwasy nukleinowe, białka i lipidy są odpowiedzialne za patogenezę wielu chorób. W przypadku lipidów ochronne działanie GST polega na sprzęganiu reaktywnych, aldehydowych produktów peroksydacji lipidów, wśród których za szczególnie aktywne są uważane hydroksyalkenale. Przykładem może być 4-hydroksynonenal (4-HNE), który odgrywa ważną rolę w komórkowym

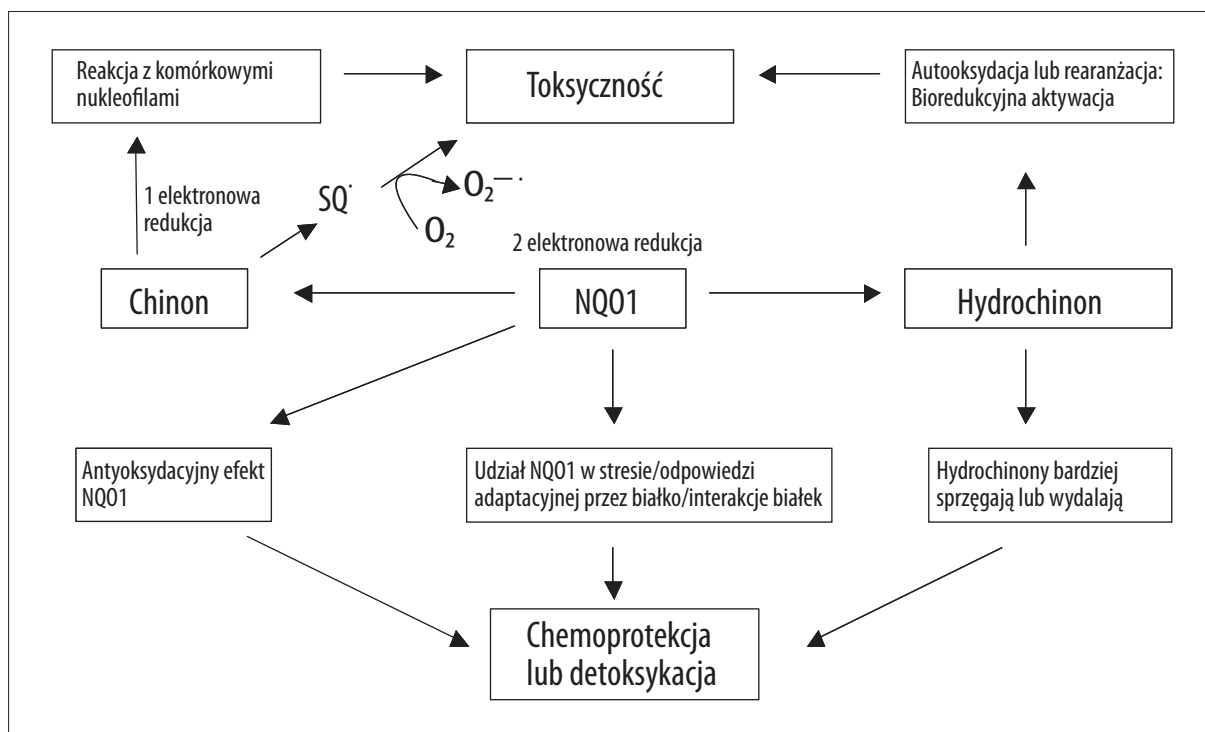
systemie sygnalizacyjnym [32], w tym również w przekazywaniu sygnałów także dla apoptozy, wywołanej takimi czynnikami jak utleniacze, szok termiczny lub promieniowanie UV. Wszystkie one wywołują peroksydację lipidów, dlatego sugerowano, że za modulację sygnalizacji komórkowej przynajmniej częściowo odpowiadać mogą produkty peroksydacji. Przeprowadzone w tym kierunku badania potwierdziły te przypuszczenia, okazało się, bowiem że rozmaite ludzkie linie komórkowe ekspozycje na umiarkowany stres oksydacyjny wykazują zwiększone poziomy 4-HNE. Jednakże w tych warunkach apoptoza nie była obserwowana, ponieważ odpowiedź adaptacyjna komórek obejmuje szybką, przejściową indukcję GST, mGSTA4-4, hGSTA4-4 lub hGST5.8. Te z kolei katalizują reakcję sprzęgania glutationu z 4-HNE oraz 76 kDa białkiem Ral aktywowanym przez związanie GTP-azy (RLIP76). Białko to katalizuje zależny od ATP transport koniugatu glutationu i HNE [97]. Awasthi i wsp. [4,5] stwierdzili, że u ludzi około 2/3 transportu GS-HNE jest katalizowane przez RLIP76, a komórki, u których występuje skoordynowana indukcja GST i RLIP76, transportują GS-HNE siedmiokrotnie szybciej w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zwiększona ekspresja GST klasy  $\alpha$  jest ważnym mechanizmem chroniącym komórki przed indukowaną stresem oksydacyjnym – apoptozą. Izoenzymy GST klasy  $\alpha$  wykazują także aktywność niezależnej od selenu peroksydazy glutationowej i obniżają poziom generowanych podczas peroksydacji lipidów hydronadtlenków lipidowych. W odróżnieniu od selenozależnych peroksydaz nie katalizują one rozkładu nadtlenu wodoru. Badania immunoprecypitacyjne z zastosowaniem poliklonalnych przeciwciał o wysokiej swoistości przeciw GST klasy  $\alpha$  wskazują, że w wątrobie i jądrach ludzi i szczurów około 50–60% całkowitej aktywności peroksydazowej w stosunku do hydronadtlenków fosfolipidowych przypisać można izoenzymom GST klasy  $\alpha$ . Odkrycia te stanowią dalsze potwierdzenie głównej roli GST klasy  $\alpha$  w regulacji peroksydacji lipidów [96,98].

Polimorfizm transferaz glutationowych został dokładnie omówiony w *Postęпах Biochemii* [44]. Należy jednak podkreślić, że choć dane dotyczące korelacji polimorfizmu enzymów z podatnością na choroby są ciągle gromadzone, to związek przyczynowy między substratami wykorzystywanymi przez poszczególne produkty genu i chorobami związanymi z polimorfizmem tego genu wciąż nie jest wyjaśniony.

### REDUKTAZA NAD(P)H: CHINON 1 (NQO1)

#### – CHARAKTERYSTYKA, NOMENKLATURA I FUNKCJA

Kolejnym równie ważnym enzymem biorącym udział w detoksykacji ksenobiotyków jest NQO1. Enzym ten występuje u zwierząt, roślin i bakterii. U ludzi największą jego aktywność wykazano w wątrobie, znacznie mniejszą w nerkach, płucach i mózgu. W odniesieniu do wewnątrzkomórkowej lokalizacji, enzym ten charakteryzuje się największą aktywnością we frakcji cytoplazmatycznej. Mitochondria zawierają niewielką ilość enzymu odpowiadającą 2–3% całkowitej aktywności komórkowej. Podobną ilość NQO1 stwierdzono również we frakcji mikrosomalnej. Niedawne badania wykazały, że NQO1 jest obecna również w jądrze komórkowym [22].



Ryc. 1. Rola NQO1 w detoksykacji i aktywacji ksenobiotyków

Ze względu na to, że akceptorem elektronów w katalizowanych przez ten enzym reakcjach może być zarówno NADH jak i NADPH przypisywano mu różne nazwy, takie jak oksydoreduktaza NAD(P)H (akceptor chinonowy), reduktaza menadionu, reduktaza filochronu, reduktaza azobarwnikowa, reduktaza chinonowa. Obecnie stosowana nazwa to oksydoreduktaza NAD(P)H: chinonowa 1 (NQO1, DT-diaforaza) (EC 1.6.99.2) [73].

### Struktura NQO1

NQO1 jest flawoproteina, która występuje jako dimer, złożony z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej 32 kDa. Każda podjednostka składa się z 273 aminokwasów i FAD jako grupy prostetycznej. W wątrobie szczurów, myszy i ludzi wykazano obecność więcej niż dwóch izoenzymatycznych form NQO1 [43]. Li i wsp. [57] otrzymali w postaci krystalicznej białko NQO1 z cytosolu wątroby szczura i opisali dwie izoformy białkowe: hydrofilową i hydrofobową różniące się prawdopodobnie stopniem glikozylacji. Ludzkie i mysie białka NQO1 wykazują 86,5% podobieństwa, mysie i szczurze 93,8% podobieństwa natomiast ludzkie i mysie wykazują 85,5% podobieństwa [18].

### Funkcje NQO1

NQO1 odgrywa różnorodne role w komórce (ryc. 1). Jedną z nich jest udział w redukcji endogennych i egzogennych chinonów i związków chinonowych do hydrochinonów. Ubichinon, plastchinon funkcjonują odpowiednio w oddechowym i fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów. Związki te zawierają długołańcuchowe węglowe podstawniki, są związane z błonami i chociaż nawet ich jedno- i dwuelektronowe zredukowane formy, tj. semi- i hydrochinony są skłonne do autoutlenienia, są one stabi-

lizowane przez lipidy i białka błonowe [10]. Inne endogenne chinony, takie jak np. pochodne hormonów steroidowych, a także egzogenne, które są najczęściej podstawionymi benzo-, nafto- i antrachinonami oraz chinonowe metabolity, np. policyklicznych węglowodorów aromatycznych podlegają przemianom, które są odpowiedzialne za ich toksyczne, często mutagenne i kancerogenne właściwości [80]. Za toksyczne działanie chinonów są prawdopodobnie odpowiedzialne dwa mechanizmy: pierwszy – bezpośrednia interakcja wykazujących elektrofilowy charakter chinonów z nukleofilowymi komórkowymi makrocząsteczkami, takie jak DNA i białka, oraz drugi – podatność na jednoelektronowe redukcje katalizowane przez rozmaite flawoproteiny [23]. W wyniku jednoelektronowej redukcji chinonów powstają semichinony, które są łatwo utleniane przez tlen cząsteczkowy ponownie do chinonów (ryc. 1). Podczas tej przemiany tworzy się anionorodnik ponadtlenkowy, z którego w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową tworzy się  $H_2O_2$ . Z kolei  $H_2O_2$  może z udziałem  $Fe^{2+}$  przekształcić się w rodnik hydroksylowy  $OH^{\cdot}$  lub ulec deaktywacji w reakcji katalizowanej przez katalazę. Powstałe rodniki mogą atakować makrocząsteczki, np. DNA i w konsekwencji prowadzić do mutacji lub śmierci komórki [72]. Poza tym, RFT zużywając tlen kosztem komórkowych równoważników redukcyjnych powodują pojawienie się stresu oksydacyjnego. NQO1 zapobiega jednak powyższemu procesom redukując chinony w dwuelektronowej reakcji do hydrochinonów, które są bardziej stabilne i mogą być usuwane bezpośrednio lub mogą ulec reakcjom sprzęgania z kwasem glukuronowym lub siarkowym [43,73].

Istnieje wiele dowodów wskazujących na udział tego enzymu w redukcyjnej aktywacji cytotoksycznych leków przeciwnowotworowych o strukturze chinonów, takich jak mitomycyny i antracykliny. Enzymatyczna redukcja tych



przeciwnowotworowych związków chinonowych powoduje wzrost liczby reaktywnych metabolitów pośrednich, które mogą następnie ulegać nukleofilowej addycji z DNA i innymi makrocząsteczkami, co uznaje się za jeden z możliwych mechanizmów ich cytotoksyczności [77]. Sugerowano także, że przeciwnowotworowa skuteczność bioredukcyjnych czynników może być wzmocniona przez selektywną indukcję NQO1 w komórkach nowotworowych [6]. Reduktaza chinonowa redukuje także witaminę K. Może ona funkcjonować fizjologicznie jako jedna z kilku reduktaz witaminy K, w cyklu witaminy K, uczestniczącym w wątrobowej posttranslacyjnej modyfikacji czynników krzepnięcia zależnych od hydrochinonu witaminy K [73].

### Swoistość substratowa

Oznaczanie aktywności NQO1 wymaga obecności w mieszaninie reakcyjnej aktywatorów, którymi mogą być albumina surowicy wołowej, poliwinylpirolidon, niektóre niejonowe detergenty np. Tween-20 i Tween-60 i Triton. Aktywacja jest odwracalna i wydaje się wynikiem zwiększenia powinowactwa enzymu do NADH i NADPH. Maksymalną aktywność enzymu wykazano w zakresie pH 7,2–9,1. Najlepszymi akceptorami elektronów dla NQO1 są 2,6-dichlorofenoloindofenol oraz niektóre benzo- i naftochinony, natomiast błękit metylenowy i cyjanożelazian są stosunkowo mało skuteczne, a cytochromy c i b<sub>5</sub> są praktycznie nieaktywne jako akceptory. Na ogół uważa się, że wśród chinonów najbardziej aktywne są te bez łańcucha bocznego w pozycji 3. Aktywność zmniejsza się wraz ze wzrostem długości łańcucha bocznego. Niektóre chinony mogą pośredniczyć w transporcie elektronów z NQO1 na cytochrom c lub koenzym Q i w obu przypadkach witamina K3 (menadion) 1,4-naftochinon są najlepszymi pośrednikami [29,77].

NQO1 ma kilka właściwości, które różnią ją od innych znanych flawinowych reduktaz chinonowych tkanek ssaków. Oprócz tego, że wykazuje ona jednakową dla obu nukleotydów pirydynowych swoistość, inną charakterystyczną cechą tego enzymu jest wyjątkowo silna i wybiórcza inhibicja przez dikumarol i pokrewnych antagonistów witaminy K. Szczegółne znaczenie ma również to, że w przeciwieństwie do innych reduktaz chinonowych, takich jak np. reduktaza NADH: cytochrom c, reduktaza NADH: cytochrom b<sub>5</sub> lub oksydaza ksantynowa, które katalizują jednoelektronowe redukcje chinonów, NQO1 katalizuje wyłącznie redukcję dwuelektronową [7].

### Polimorfizm NQO1

Traver i wsp. [89] wykazali polimorfizm NQO1 z powodu mutacji pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphism – SNP). Wariant NQO1\*2 występujący w linii komórkowej BE okrężnicy nie ma wykrywalnej aktywności NQO1. SNP wydaje się powodować zmianę w strukturze przestrzennej białka enzymatycznego, co objawia się zmniejszonym powinowactwem do wiązania FAD i tym samym utratą aktywności enzymu. Istnieje etniczna zmienność w występowaniu tego polimorfizmu u 4,4% populacji kaukaskiej i 20,3% populacji azjatyckiej posiadających homologiczny genotyp. Istnieją doniesienia o różnorodnych innych wariantach NQO1, ale ich fizjologiczne znaczenie nie jest jeszcze poznane [22].

## CHARAKTERYSTYKA INDUKTORÓW ENZYMÓW II FAZY

Selektywną indukcję enzymów II fazy wywołują związki określane jako tzw. induktory monofunkcjonalne. Poznano przynajmniej dziewięć różnych chemicznych klas monofunkcyjnych induktorów. Obejmują one:

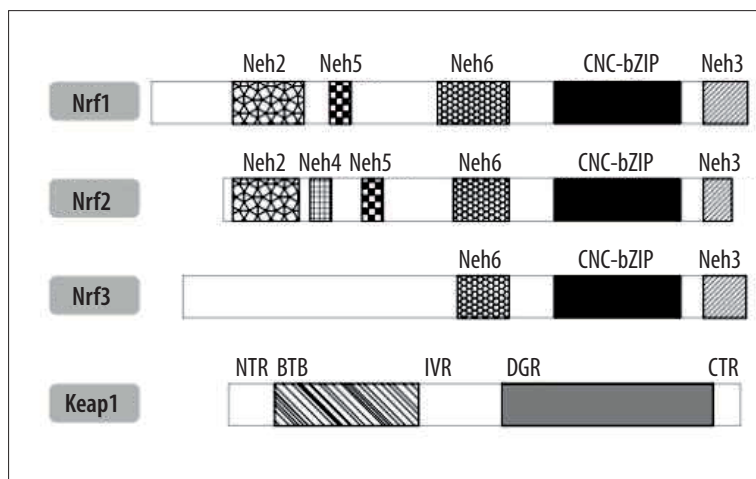
- ulegające utlenianiu *orto*- i *para*-difenole, ich pochodne chinony, a także inne typy akceptorów reakcji Michaela, np. olefiny lub acetyleny sprzężone z grupami usuwającymi elektrony. Reakcja Michaela prowadzi do utworzenia nowego wiązania C-C, a jej głównym etapem jest nukleofilowa addycja do  $\alpha,\beta$ -nienasyconych związków karbonylowych,
- izotiocyjaniany, które charakteryzuje wysoce elektrofilowy centralny atom węgla grupy  $-N=C=S$ . Związki te są powszechnie spożywane w postaci ich glukozynolowych prekursorów, które w dużych ilościach występują w roślinach z rodziny *Cruciferae*. Glukozynolany są hydrolizowane do izotiocyjanianów, aktywnych induktorów, przez występujący w roślinach enzym myrozynazę lub przez mikroflorę przewodu pokarmowego ssaków,
- ditiokarbaminiany, które są tworzone metabolicznie jako produkty addycji glutationu z izotiocyjanianów,
- pochodne 1,2-ditiolo-3-tionu (np. oltipraz i 1,2-ditiolo-3-tion), które początkowo były stosowane jako czynniki przeciwpasożytnicze,
- pochodne dwuwartościowych metali ciężkich, wśród których rtęć jest silniejszym induktorem niż kadm i cynk,
- hydronadtlenki (np. hydronadtlenek *tert*-butylowy),
- polieni, takie jak metabolity karotenoidów,
- dimerkaptany (np. 2,3-dimerkaptopropanol) [85].

Jedyną wyraźną uniwersalną cechą tych induktorów jest ich zdolność do reagowania z tiolowymi/disulfidowymi grupami na zasadzie alkilacji, utleniania, redukcji lub wymiany tiolu. Większość induktorów jest również substratami dla transferaz glutationowych, co ułatwia ich sprzężanie z glutationem. Uda i wsp. [92] wykazali, że w przypadku flawonoidów podwójne wiązanie pomiędzy węglem 2 i 3 w pierścieniu C jest istotne dla indukcji NQO1. Stąd najskuteczniejszymi induktorami aktywności tego enzymu okazały się kampferol, galangina, kwercetyna, myricetyna, apigenina. Dinkova-Kostova i wsp. [25] wykazali, że podwójne wiązanie w pierścieniu C może odgrywać rolę akceptora reakcji Michaela.

### Nrf2 – CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY ODPOWIEDZIALNY ZA INDUKCJĘ ENZYMÓW II FAZY – MOLEKULARNY CEL ODDZIAŁYWANIA CZYNNIKÓW CHEMIOPREWENCYJNYCH

Badania ostatnich lat wykazały, że główną rolę w indukcji enzymów II fazy odgrywa czynnik transkrypcyjny Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor), wiążący się z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) jądrowego DNA za pośrednictwem motywu zamka leucynowego (bZIP) [99]. Nrf2 jest członkiem rodziny białek „Cap 'n' collar” (CNC). Mysi nrf2 złożony jest z 597 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 66,9 kDa. Nrf2 zawiera 6 domen Neh1-Neh6 (ryc. 2). Neh1 zawiera domenę CNC-bZip, Neh2 domenę N-terminalną, Neh3 domenę C-terminalną, Neh4 i 5 są to kwaśne regiony, a Neh6 jest domeną bogatą w serynę [37].

Nrf2 aktywuje wiele genów kodujących białka o działaniu cytoprotekcyjnym, które deaktywują elektrofilne metabo-



Ryc. 2. Struktura białek z rodziny CNC i Keap1

lity, rozkładają RFT i stabilizują potencjał oksydoredukcyjny komórki. Poza GST i NQO1 należą do nich hydrolaza epoksydowa, ligaza  $\gamma$ -glutamylcysteiny, reduktaza glutationu, UDP-glukuronylotransferaza, reduktaza tioredoksyny, katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa i oksygenaza hemu. Aktywacja Nrf2 pociąga więc za sobą ekspresję całej baterii cząsteczek cytoprotekcyjnych [84,99].

Myszy pozbawione genu *nrf2* (*nrf2*  $-/-$ ) charakteryzowały się znacznie większą podatnością na czynniki cytotoksyczne i genotoksyczne niż myszy typu dzikiego. Było to spowodowane obniżoną ekspresją zarówno konstytutywnej, jak i indukowanej ekspresji GST klasy  $\alpha$  i  $\mu$  – Gsta1, Gsta2, Gstm2, Gstm3, Gstm4 i Gstm6 [14]. Dalsze badania wykazały, że w wątrobie i żołądku myszy z usuniętym *nrf2*, podstawowe aktywności GST  $\pi$  i NQO1 były znacznie obniżone [99]. Podobne wyniki zaobserwowali Cho i wsp. [19] w płucach. Nrf2 jest sekwestrowany w cytoplazmie przez białko inhibitorowe Keap1 wiążące się do jego domeny Neh2 złożonej z około 100 aminokwasów (ryc. 2). Sekwencje aminokwasowe białek Keap1 są bardzo konserwatywne. Mysie, szczurze i ludzkie (KIAA0132) Keap1 wykazują duże podobieństwo. Zidentyfikowano pięć domen Keap1: NTR (region N-końcowy), BTB/POZ, IVR (region interwencyjny), DGR i CTR (region C-końcowy). DGR jest domeną wiążącą aktywną zawierającą podwójne powtórzenie glicyny, która jest istotna dla wiązania Keap1 z Nrf2 [37,44].

Inną cechą charakterystyczną Keap1 jest obecność 25 cystein w sekwencji złożonej z 624 aminokwasów. Badania Dinkovej-Kostovej i wsp. [25] wykazały, że najbardziej reaktywnymi resztami cysteinowymi w Keap1 są reszty C257, C273, C288 i C297. Modyfikacja grupy tiolowej tych cystein przez induktor może wywoływać zmiany konformacyjne w Keap1, które prowadzą do uwolnienia Nrf2, translokacji do jądra komórkowego, związania z ARE i aktywacji kontrolowanych przez ten czynnik genów [85].

Wiele związków występujących naturalnie i syntetycznych, takich jak resweratrol, kurkumina, sulforafan lub oltipraz aktywuje w ten sposób układ Nrf2-Keap1-ARE [48].

U myszy ICR z niedoborem *nrf2* zaobserwowano niskie lub niepodatne na indukcję oltiprazem i sulforafanem po-

ziomy GST i NQO1 w modelu nowotworu przedłożądka wywołanego benzo[a]pirenem [85].

Nrf2 może być także aktywowany w procesie fosforylacji za pośrednictwem kinaz biorących udział w przekazywaniu sygnału w komórce, takich jak kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (MAPK), kinazy białkowe C (PKC) lub kinazę fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz kinazę białkową umiejscowioną w retikulum endoplazmatycznym (PERK) (ryc. 3) [54].

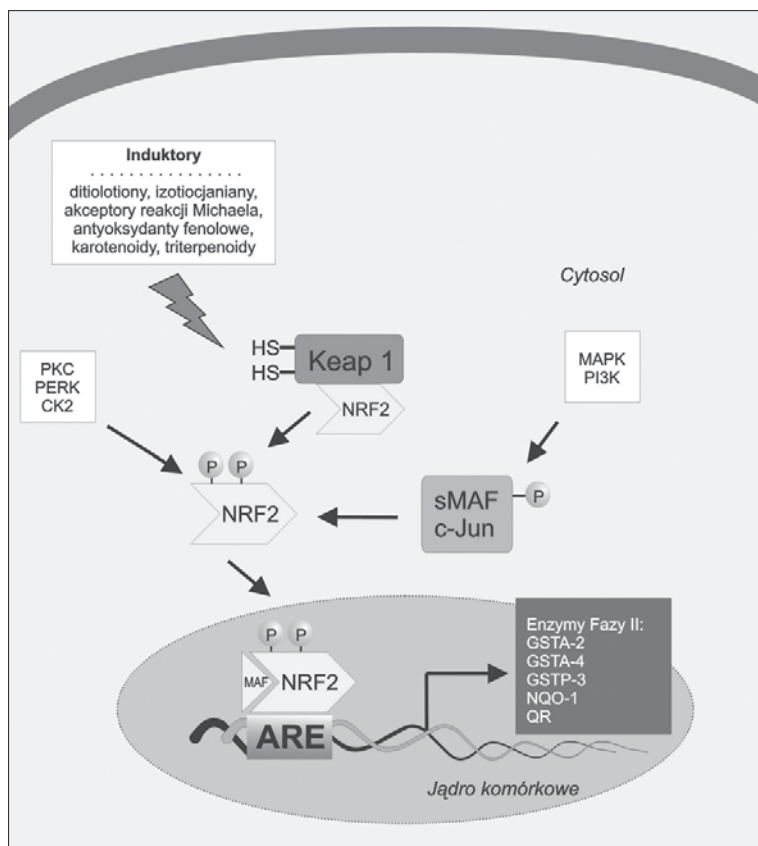
MAPK są serynowo-treoninowymi kinazami, które do swej aktywacji wymagają zarówno fosforylacji reszt tyrozyny jak i reszt treoniny. MAPK mogą łączyć sygnały chemiczne z Nrf2 i następnie prowadzić do aktywacji genów zależnych od ARE. Również małe białka Maf uczestniczą w regulacji enzymów detoksykacyjnych, tworząc heterodimer z Nrf2. Poprzez podobny moduł sygnałowy regulowany przez GTP działa N-końcowa kinaza c-Jun [47].

Do super rodziny kinaz serynowo-treoninowych, które uczestniczą w regulacji ARE, należą również PKC. Seryna 40 umiejscowiona w domenie Neh2 białka Nrf2 wchodzi w interakcję z Keap1 a jednocześnie została zidentyfikowana jako miejsce fosforylacji PKC [17].

PI3K jest kinazą lipidową kontrolującą wzrost komórki, różnicowanie i apoptozę. Lee i wsp. [56] wykazali udział PI3K w regulacji zależnych od ARE genów w linii komórkowej IMR-32 neuroblastomy.

Niedawne badania wykazały, że Nrf2 mógłby być substratem dla PERK. Fosforylacja katalizowana przez PERK indukuje dysocjację Nrf2 od Keap1 i zwiększa transport jądrowy [99]. Oprócz egzogennych aktywatorów szlaku Nrf2-ARE zidentyfikowano wiele endogennych związków chemicznych, np. tlenek azotu. Po ekspozycji komórek śródbłonka i komórek neuroblastomy na donory NO zaobserwowano jądrową akumulację białka Nrf2 i indukcję enzymów II fazy [16].

Degradacja Nrf2 zachodzi poprzez układ ubikwityna-proteasom. Okres półtrwania Nrf2 w komórkach nie jest dłuższy niż 20 min [40].



Ryc. 3. Schemat indukcji enzymów II fazy w wyniku aktywacji Nrf2-Keap1-ARE

Klasyczny schemat kancerogenezy zakłada, że genotoksyczne uszkodzenia DNA są odpowiedzialne przede wszystkim za inicjację tego procesu i konwersję niezłośliwych guzów w postaci rakowe. Proces kancerogenezy u człowieka jednak lepiej charakteryzuje akumulacja wielu mutacji w genach regulujących komórkową homeostazę, przede wszystkim onkogenach, genach supresorowych i genach regulujących apoptozę. Mutacje te są spowodowane nie tylko przez czynniki egzogenne (ksenobiotyki), ale jak się obecnie wydaje w równym, a nawet większym stopniu przez endogenne uszkodzenia DNA, które są generowane przez całe życie człowieka i tym samym mają wpływ na każdy z etapów kancerogenezy. Głównym czynnikiem wywołującym te endogenne uszkodzenia nie tylko DNA, ale także lipidów i białek są reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu (RFA) wytwarzane w stanach zapalnych, przez pobudzone przez ten proces neutrofile i makrofagi. Źródłem endogennych RFT w warunkach fizjologicznych jest łańcuch oddechowcy. Te endogenne RFT i RFA reagują bezpośrednio z DNA modyfikując jego strukturę i funkcję [39,64]. Stany zapalne i mutacje wywołane przez czynniki egzogenne (środowiskowe) są więc ze sobą powiązane.

Dlatego stymulacja drogi sygnałowej Nrf2-ARE inaktywującej zarówno reaktywne metabolity egzogennych kancerogenów, jak i endogenne czynniki uszkadzające DNA stanowi unikalny cel oddziaływania czynników chemioprewencyjnych. Przykładem nowych związków o takim działaniu są triterpenoidy, które mogą stymulować syntezę enzymów II fazy w dawkach poniżej 1nM. Co ciekawe, związki te są nie tylko silnymi induktorami oksygenazy 1 hemu (HO1) pozostającej pod kontrolą Nrf2, ale także supresorami syn-

tazy tlenku azotu (iNOS). Zwiększona aktywność tych enzymów wywołuje pożądane efekty w dwóch ważnych cząsteczek sygnalizacyjnych, mianowicie, tlenku węgla (CO) i tlenku azotu (NO), które mają istotne prozapalne lub antyzapalne właściwości [83]. Tak więc poprzez działania na czynnik transkrypcyjny Nrf2, który reguluje ekspresję tak wielu genów związanych z kancerogenezą, możliwa jest wielokierunkowa ingerencja w ten proces.

#### PRZYKŁADY MODULACJI I/LUB SKUTECZNEJ CHEMIOPREWENCJI W WYNIKU INDUKCJI ENZYMÓW II FAZY

Wyjaśnienie molekularnego mechanizmu indukcji enzymów II fazy dostarczyło dodatkowych argumentów za możliwością jej wykorzystania jako strategii chemioprewencyjnej. Wiele danych wskazuje, że modulacja ekspresji enzymów II fazy zmienia podatność na kancerogenezę. Nadekspresja GST P1 chroni komórki gruczołu krokowego przed cytotoksycznością i uszkodzeniami DNA wywołanymi ekspozycją na heterocykliczną aminę, 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydynę (PhIP). Celowana delecja albo genu GST P1 albo genu NQO1 zwiększała wrażliwość myszy na kancerogenezę skóry indukowaną przez PWA [85]. W badaniach u ludzi, utrata ekspresji GST T1 jest związana ze zwiększonym ryzykiem raka pęcherza, przewodu pokarmowego i skóry, podczas gdy genotyp GST M1 null jest wiązany z wysokim ryzykiem raków jamy ustnej i płuc łączonych z paleniem papierosów [55].

Do związków przeciwnowotworowych, których działanie można wiązać z indukcją enzymów II fazy należy wiele naturalnych związków zawartych w diecie człowieka, a tak-



że syntetycznych np. oltipraz. Do tych pierwszych zaliczane są przede wszystkim organiczne związki siarki i roślinne związki fenolowe.

**Organiczne połączenia siarki** reprezentują liczną grupę związków: allilowe pochodne siarki oraz glukozynolany i izotiocyjaniany. Naturalne składniki warzyw *Allium*: siarczek allilu i disiarczek diallilu, trisiarczek diallilowy istotnie zwiększały aktywności GST i NQO1 w nowotworach wątroby i okrężnicy u szczura [17,34,67]. Organiczne siarczki, takie jak: siarczek diallilu, disiarczek diallilu, siarczek dipropyłu, disiarczek dipropyłu indukowały aktywności NQO1 i GST oraz poziom GST klasy  $\mu$ ,  $\pi$  i  $\alpha$  w jelicie natomiast GST klasy  $\mu$  i  $\alpha$  w wątrobie szczura [34,35]. W wątrobie i jelicie myszy również zanotowano podwyższoną ekspresję GST  $\mu$ ,  $\pi$  i  $\alpha$  po doustnym podawaniu disiarczku diallilu [1].

**Indolo-3-karbinol** występuje jako glukozynolan w warzywach z rodziny *Cruciferae*, takich jak: kapusta, jarmuż, brukselka, brokuły. Podawanie szczurom indolo-3-karbinolu (w dawce 56 mg/kg m.c.) zwiększało aktywność NQO1 i GST [69]. Indolo-3-karbinol indukował GST klasy  $\mu$  i  $\theta$  w wątrobie szczura [52,76].

**Iberyna** jest produktem hydrolizy glukozynolanów pochodzących z brokułów pod wpływem flory bakteryjnej. Jakubikowa i wsp. [41] wykazali, że iberyna jest silnym induktorem GST i NQO1 *in vitro*. Badania *in vivo* wykazały, że iberyna podawana szczurom (w dawce 100  $\mu$ mol/kg m.c.) powodowała wzrost aktywności jelitowej GST [49].

**Organiczne izotiocyjaniany** powszechnie występujące w diecie człowieka są odpowiedzialne za ostry, piekący smak i zapach przypraw, takich jak musztarda i chrzan. Izotiocyjaniany, będące produktami rozpadu glukozynolanów pod wpływem myrozynazy są bardzo silnymi induktorami GST i NQO1 u myszy i szczurów. W odniesieniu do właściwości chemioprewencyjnych największe znaczenie ma izotiocyjanian fenetylu (PEITC), który hamuje różne postaci nowotworów indukowanych u zwierząt doświadczalnych przez chemiczne kancerogeny, takie jak 7,12-dimetylobenz[*a*]antracen i nitrozoaminy. Mechanizm chemioprewencyjnego działania PEITC wiąże się z indukacją GST i NQO1. Izotiocyjanian fenetylu zwiększał poziom GST klasy  $\alpha$ ,  $\pi$  i  $\mu$  w wątrobie szczura po podaniu w diecie [74]. Van Lieshout i wsp. [93] zaobserwowali, że podawanie w diecie PEITC podwyższa poziom GST  $\theta$  w żołądku szczura. Natomiast izotiocyjanian allilu (AITC) podawany (w dawce 10  $\mu$ mol/kg m.c./dzień) przez 5 dni zwiększał aktywności GST i NQO1 w tkankach przewodu pokarmowego, płucach, wątrobie, śledzionie, nerkach szczura [66]. U myszy z neoplazją żołądka indukowaną przez benzo[*a*]piren zaobserwowano indukację GST i NQO1 po podaniu izotiocyjanianu benzylu (BITC) [36]. Po podaniu izotiocyjanianu obserwowano także w wątrobie szczura zwiększoną ekspresję izoenzymu GST klasy  $\pi$  [68]. Badania Munday i wsp. [65] wykazały, że AITC, erucyna, iberyna oraz sulforafan zwiększały aktywności GST i NQO1 w żołądku i pęcherzu moczowym szczura.

Wyzolowany z brokułów oraz syntetyczny izotiocyjanian, **sulforafan** jest jednym z najsilniejszych induktorów GST i NQO1; hamuje indukowane chemicznymi kancerogenami nowotwory gruczołu piersiowego u szczura. Indukcja GST wiąże się ze zwiększoną ekspresją izoenzymów  $\alpha$ ,  $\mu$

i  $\pi$  oraz  $\theta$  u szczura [59,93]. Podobne właściwości wykazywał też prekursor sulforafanu, **glukorafanina** wyizolowana z brukselki [85].

**Związki fenolowe** występują w wielu warzywach, owocach i produktach zbożowych. Można je podzielić na dwie grupy: kwasy fenolowe i flawonoidy. Związki fenolowe stanowią wyróżniającą się grupę związków w chemioprewencji ze względu na pełnienie podwójnej funkcji: jako przeciwutleniacze i jako induktory enzymów detoksykacyjnych [95]. W przypadku oddziaływania na enzymy II fazy istotna jest zależność między strukturą a aktywnością. Związki fenolowe, takie jak 1,4-difenole (p-fenole) mają największą zdolność indukowania aktywności GST [25]. Długotrwałe spożywanie **ekstraktów z zielonej herbaty** zwiększa aktywność GST u szczura [60]. Również u szczurów traktowanych galusanem epigallokatechiny, który jest składnikiem zielonej herbaty zaobserwowano zwiększenie poziomu GST klasy  $\alpha$  [20].

Do fenolokwasów należy też, **kwasy protokatechowy**. Występuje w warzywach i owocach oraz orzeszkach ziemnych, a także w suchych kwiatach *Hibiscus sabdariffa*. Jest skutecznym czynnikiem w hamowaniu kancerogenezy w jamie ustnej, żołądku, wątrobie, okrężnicy, pęcherzu indukowanej przez nitrozoaminy i azoksymetan [91]. Badania Krajki-Kuźniak i wsp. [51] wykazały, że kwas protokatechowy podawany dootrzewnowo zwiększał aktywność GST i poziom GST klasy  $\mu$  w wątrobie szczura.

Syntetyczne związki fenolowe **butylohydroksyanizol** (BHA) i **etoksychinon** (EQ) mogą chronić zwierzęta przed rozmaitymi kancerogenami działającymi zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo*. Związki te są znane zwłaszcza z ochrony przed genotoksycznością aflatoksyny B1 *in vivo*. W 1980 r., Benson, Hunkeler i Talalay [8] donieśli, że podawanie BHA zwiększało aktywność NQO1 w wielu tkankach myszy przy czym w największym stopniu w wątrobie. Forkert i współpr. [31] wykazali zwiększony poziom GST  $\alpha$  i  $\pi$  w płucach myszy traktowanych BHA. Chaubey i wsp. [15] zaobserwowali, że podanie BHA myszom podnosi poziom GST klasy  $\alpha$ ,  $\mu$  i  $\pi$  w wątrobie. Natomiast w wątrobie szczura silnym induktorem okazał się EQ, który indukował GST klasy  $\alpha$  i  $\mu$  podczas gdy BHA tylko GST klasy  $\alpha$  [61,63].

**Flawonoidy**, które reprezentują ogromną grupę związków fenolowych oprócz innych funkcji, mogą także indukować enzymy II fazy [64].

**Morin**, flawonoid podawany w diecie zwiększał aktywność zarówno GST i NQO1 w wątrobie szczura hamując kancerogenezę jelita grubego wywołaną azoksymetanem [87], a także nowotwór języka indukowany 4-nitrocholino 1-tlenkiem [45]. Inny flawonoid obecny w miodzie, **pinostrobin** okazał się silnym induktorem aktywności NQO1 [30].

**Preparaty z soi** hamują nowotwory indukowane przez PWA czy nitrozoaminy w modelach eksperymentalnych. Zaobserwowano wzrost aktywności GST i NQO1 w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w izoflawony, genisteinę i daidzeinę [2]. Podobny efekt zanotowano w wątrobie myszy, którym podawano genisteinę [12].



Syntetycznym flawonoidem jest **4-bromoflawon**, który jest bifunkcyjnym induktorem enzymów. Song i wsp. [82] wykazali, że indukował on całkowitą aktywność NQO1 i GST w wątrobie, okrężnicy, żołądka i płucach szczura oraz izoformy  $\alpha$  i  $\mu$  w hodowlach komórkowych wątrobiaka szczura.

#### INNE ZWIĄZKI

Choć ich zasadnicze mechanizmy działania są inne (np. aktywacja czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i AP-1) lub wielokierunkowe, indukcja enzymów II fazy może się także przyczyniać do ich przeciwnowotworowego działania.

**Kurkumina**, główny żółty barwnik kurkumy, ma antyoksydacyjne i przeciwzapalne właściwości. Ponadto kurkumina chroni przed chemicznie indukowanymi rakami w różnych modelach zwierzęcych, np. hamowanie tumorigenezy żołądka u myszy wywołanej przez B[a]P. Wykazano, że izoenzym GST klasy  $\pi$  odgrywa główną rolę w detoksykacji (+)-anty-B[a]PDE w wątrobie myszy [78]. Podawanie kurkuminy w diecie szczurom wywołało podwyższenie GST klasy  $\alpha$ ,  $\mu$  i  $\pi$  [71]. Również Singletary i wsp. [79] wykazali hamowanie tworzenia adduktów w gruczole piersiowym samic szczura poprzez zwiększenie aktywności NQO1 i GST. Na przykładzie kurkuminy wykazano, że wprowadzenie grupy hydroksylowej w pozycję *orto*- w pierścieniach aromatycznych w sąsiedztwie do grup akceptorów Michaela, znacznie zwiększa zdolność do indukcji. Tak więc kurkumina ma dużo mniejszą moc indukcyjną niż pochodna bis-2-hydroksykurkumina [85].

**Terpeny** są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie i mogą być, jak już wspomniano wcześniej, dobrym przykładem związków, które indukują syntezę enzymów II fazy poprzez aktywację czynnika Nrf2. Diterpeny, *kahweol* i *kafestol* zawierające dwa pierścienie furanu, izolowane z nasion zielonej kawy są induktorami aktywności GST w różnych tkankach u myszy [13], a także zwiększają poziom GST  $\theta$  w wątrobie i nerkach szczura [38].

**Kumaryny** są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym, znajdują się m.in. w owocach cytrusowych i niektórych warzywach, np. w pietruszce, selerze, pasternaku. W oparciu o budowę chemiczną wyróżnia się kumaryny, furanokumaryny i piranokumaryny. Van Lieshout i wsp. [93] wykazali, że kumaryna podawana w diecie (w dawce 2500 mg/kg m.c.) zwiększała poziom GST  $\theta$  w przetyku, żołądka i jelicie szczura. Aurapten, jest kumaryną, obecną w skórkach pomarańczy wykazuje antypromocyjne właściwości w tumorigenezie wywołanej przez 7,12-dimetylobenz[a]antracen w skórze myszy. Aktywność GST i NQO1 w wątrobie i okrężnicy szczura była istotnie podwyższona po doustnym podaniu auraptenu [46,86].

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] Andorfer J.H., Tchaikovskaya T., Listowsky I.: Selective expression of glutathione S-transferase genes in the murine gastrointestinal tract in response to dietary organosulfur compounds. *Carcinogenesis*, 2004; 25: 359–367
- [2] Appelt L.C., Reicks M.M.: Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. *J. Nutr.*, 1999; 129: 1820–1826

#### ZWIĄZKI SYNTETYCZNE

Pośród syntetycznych induktorów enzymów II fazy w centrum uwagi znajduje się **oltipraz**. Ten ditiolion jest strukturalnie podobny do ditiolionów znajdujących się w warzywach roślin krzyżowych i jest stosowany w leczeniu jako środek przeciw pasożytom. Chemioprewencyjny wpływ oltiprazu wykazano dla różnych klas nowotworów swoistych dla określonych tkanek: tchawicy, płuc, żołądka, jelita cienkiego, okrężnicy, trzustki, wątroby, pęcherza moczowego, gruczołu piersiowego i skóry [54]. Właściwości ochronne oltiprazu przypisuje się po części jego zdolności do indukowania całej gamy enzymów II fazy, a w szczególności, GST i NQO1. Oltipraz podawany w diecie podwyższa poziom GST klasy  $\alpha$ ,  $\mu$  i  $\pi$  w wątrobie oraz GST klasy  $\pi$  w nerkach i płucach szczura [28]. Natomiast van Lieshout i wsp. [93] wykazali, że oltipraz podawany w diecie (w dawce 300 mg/kg m.c.) zwiększa poziom GST klasy  $\theta$  w żołądku szczura. Pojedyncza dawka oltiprazu (125 mg doustnie) zwiększała aktywność GST w limfocytach obwodowych, oraz 5-krotny wzrost mRNA dla NQO1 w śluzówce okrężnicy po podaniu 250 mg/m<sup>2</sup> oltiprazu. Dwumiesięczna próba kliniczna przeprowadzona w Qidong, w Chinach, gdzie ekspozycja w diecie na aflatoksynę i ryzyko raka wątroby są wysokie, wykazała, że codzienne podawanie oltiprazu (w dawce 125 mg) znacząco zwiększało poziom produktu detoksykacji kwasu merkapturowego oltiprazu wydalanego w moczu [54].

**Związki selenu** chronią przed nowotworami gruczołu piersiowego, okrężnicy, płuc, wątroby wywołanymi działaniem azoksymetanu, benzo[a]pirenu, dimetylobenzo[a]antracenu, nitrozoamin. W wątrobie szczura zaobserwowano wzrost aktywności NQO1 i GST [53]. Badania Sohn i wsp. [81] wykazały, że p-XSC oraz jego o- i m-izomery zwiększały poziom izoenzymów GST klasy  $\alpha$ ,  $\mu$  i  $\pi$  w wątrobie, nerkach, okrężnicy i gruczole piersiowym.

#### PODSUMOWANIE

Stres oksydacyjny oraz procesy zapalne generujące reaktywne formy tlenu i azotu, a także tworzenie elektrofilowych metalotów związków chemicznych uszkadzających komórki makrocząsteczki, stanowią istotny element patogeny wielu schorzeń degeneracyjnych. Indukcja enzymów II fazy poprzez aktywację czynnika Nrf2 kontrolującego ekspresję wielu czynników cytoprotekcyjnych może więc stanowić ważną strategię zapobiegania nie tylko nowotworom, ale także takim schorzeniom jak choroby neurodegeneracyjne i układu krążenia. Przeprowadzone dotychczas badania wskazujące na chemioprewencyjne właściwości związków stymulujących syntezę enzymów II fazy, zwłaszcza wykazujących aktywność w dawkach poniżej 1 nM, jak np. opisane niedawno triterpenoidy, pozwalają mieć nadzieję, że strategia ta zostanie wykorzystana w profilaktyce i/lub terapii tych schorzeń.

- [3] Armstrong R.N.: Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997; 10: 2–18
- [4] Awasthi S., Cheng J.Z., Singhal S.S., Saini M.K., Pandya U., Pikula S., Bandorowicz-Pikula J., Singh S.V., Zimniak P., Awasthi Y.C.: Novel function of human RLIP76: ATP-dependent transport of glutathione conjugates and doxorubicin. *Biochemistry*, 2000; 39: 9327–9334

- [5] Awasthi S., Sharma R., Singhal S.S., Zimniak P., Awasthi Y.C.: RLIP76, a novel transporter catalyzing ATP-dependent efflux of xenobiotics. *Drug Metab. Dispos.*, 2002; 30: 1300–1310
- [6] Begleiter A., Leith M.K., Curphey T.J., Doherty G.P.: Induction of DT-diaphorase in cancer chemoprevention and chemotherapy. *Oncol. Res.*, 1997; 9: 371–382
- [7] Benson A.M., Barretto P.B., Stanley J.S.: Induction of DT-diaphorase by anticarcinogenic sulfur compounds in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986; 76: 467–473
- [8] Benson A.M., Hunkeler M.J., Talalay P.: Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980; 77: 5216–5220
- [9] Brockmöller J., Cascorbi I., Kerb R., Sachse C.H., Roots I.: Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol. Lett.*, 1998; 102–103: 173–183
- [10] Brunmark A., Cadenas E., Seruga-Aguilar J., Lind C., Ernster L.: DT-diaphorase-catalyzed two-electron reduction of various p-benzoquinone- and 1,4-naphthoquinone epoxides. *Free Radic. Biol. Med.*, 1988; 5: 133–143
- [11] Butkiewicz A., Chorąży M.: Indywidualne predyspozycje do zachorowania na raka płuca-rola genów związanych z metabolizmem nowotworów. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1999; 53: 655–673
- [12] Cai Q., Wei H.: Effect of dietary on antioxidant enzyme activities in Sencar mice. *Nutr. Cancer*, 1996; 25: 1–7
- [13] Cavin C., Bezencon C., Guignard G., Schilter B.: Coffee diterpenes prevent benzo[a]pyrene genotoxicity in rat and human culture systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 306: 488–495
- [14] Chanas S.A., Jiang Q., McMahon M., McWalter G.K., McLellan L.I., Elcombe C.R., Henderson C.J., Wolf C.R., Moffat G.J., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D.: Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J.*, 2002; 365: 405–416
- [15] Chaubey M., Singhal S.S., Awasthi S., Saxena M., Dyer R.B., Awasthi Y.C., Herzog N.K.: Gender-related differences in expression of murine glutathione S-transferases and their induction by butylated hydroxyanisole. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 1994; 108: 311–319
- [16] Chen C., Kong A.N.: Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmaceutical effects. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005; 26: 318–326
- [17] Chen C., Kong A.N.: Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1505–1516
- [18] Chen S., Knox R., Lewis A.D., Friedlos F., Workman P., Deng P.S., Fung M., Ebenstein D., Wu K., Tsai T.M.: Catalytic properties of NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase: study involving mouse, rat, human and mouse-rat chimeric enzymes. *Mol. Pharmacol.*, 1997; 47: 934–939
- [19] Cho H.Y., Jedlicka A.E., Reddy S.P., Kensler T.W., Yamamoto M., Zhang L.Y., Kleeberger S.R.: Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2002; 26: 175–182
- [20] Chou F.P., Chu Y.C., Hsu J.D., Chiang H.C., Wang C.J.: Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60: 643–650
- [21] Coles B., Ketterer B.: The role of glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1999; 25: 47–70
- [22] Danson S., Ward T.H., Butler J., Ranson M.: DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treat. Rev.*, 2004; 30: 437–449
- [23] De Long M.J., Prochaska H.J., Talalay P.: Induction of NAD(P)H:quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: a model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83: 787–791
- [24] Delbanco E.H., Bolt H.M., Huber W.W., Beken S., Geller F., Philippou S., Brands F.H., Brüning T., Thier R.: Glutathione transferase activities in renal carcinomas and adjacent normal renal tissues: factors influencing renal carcinogenesis induced by xenobiotics. *Arch. Toxicol.*, 2001; 74: 688–694
- [25] Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Cole R.N., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M., Talalay P.: Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 11908–11913
- [26] Dinkova-Kostova A., Talalay P.: Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT-diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 29: 231–240
- [27] Eaton D.L., Bammler T.K.: Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*, 1999; 49: 156–164
- [28] Egner P.A., Kensler T.W., Prestera T., Talalay P., Libby A.H., Joyner H.H., Curphey T.J.: Regulation of phase 2 enzymes induction by oltipraz and other dithiolethiones. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 177–181
- [29] Ernster L.: DT-diaphorase. *Meth. Enzymol.*, 1967; 10: 309–317
- [30] Fahey J.W., Stephenson K.K.: Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): a potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 7472–7476
- [31] Forkert P.G., D'Costa D., El-Mestrah M.: Expression and inducibility of alpha, pi, and mu glutathione S-transferase protein and mRNA in murine lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1999; 20: 143–152
- [32] Gallagher E.P., Gardner J.L., Barber D.S.: Several glutathione S-transferase isozymes that protect against injury are expressed in human liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 71: 1619–1628
- [33] Giannini E., Risso D., Ceppa P., Botta F., Chiarbonello B., Fasoli A., Malfatti F., Romagnoli P., Lantieri P.B., Testa R.: Utility of alpha-glutathione S-transferase assessment in chronic hepatitis C patients with near normal alanine aminotransferase levels. *Clin. Biochem.*, 2000; 33: 297–301
- [34] Guyonnet D., Belloir C., Suschetet M., Siess M.H., Le-Bon A.M.: Antimutagenic activity of organosulfur compounds from Allium is associated with phase II enzyme induction. *Mutat. Res.*, 2001; 495: 135–145
- [35] Guyonnet D., Siess M.H., Le-Bon A.M., Suschetet M.: Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from allium vegetables in rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999; 154: 50–58
- [36] Hecht S.S.: Chemoprevention by isothiocyanates. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 199; 22: 195–209
- [37] Holtzclaw W.D., Dinkova-Kostova A.T., Talalay P.: Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv. Enzyme Regul.*, 2004; 44: 335–367
- [38] Huber W.W., Prustomersky S., Delbanco E., Uhl M., Scharf G., Turesky R.J., Thier R., Schulte-Hermann R.: Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol. *Arch. Toxicol.*, 2002; 76: 209–217
- [39] Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C.: Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 276–285
- [40] Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., O'Connor T., Yamamoto M.: Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, 2003; 8: 379–391
- [41] Jakubikova J., Bao Y., Bodo J., Sedlak J.: Isothiocyanate iberin modulates phase II enzymes, posttranslational modification of histones and inhibits growth of Caco-2 cells by inducing apoptosis. *Neoplasma*, 2006; 53: 463–470
- [42] Jaskuła-Sztul R.: Polimorfizm enzymów detoksykacyjnych. *Post. Bioch.*, 2000; 46: 50–59
- [43] Joseph P., Xie T., Xu Y., Jaiswal A.K.: NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase): expression, regulation, and role in cancer. *Oncol. Res.*, 1994; 6: 525–532
- [44] Kargas Ch., Walter Z.: Znaczenie polimorfizmów genów transferaz glutationowych człowieka. *Post. Bioch.*, 2003; 49: 85–95
- [45] Kawabata K., Tanaka T., Honjo S., Kakumoto M., Hara A., Makita H., Tatemasu N., Ushida J., Tsuda H., Mori H.: Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 1999; 83: 381–386
- [46] Kelly V.P., Ellis E.M., Manson M.M., Chanas S.A., Moffat G.J., McLeod R., Judah D.J., Neal G.E.: Chemoprevention of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis by coumarin, a natural benzopyrone that is a potent inducer of aflatoxin B1-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat liver. *Cancer Res.*, 2000; 60: 957–969
- [47] Kobayashi M., Yamamoto M.: Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.*, 2006; 46: 113–140

- [48] Köhle C., Bock K.W.: Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 72: 795–805
- [49] Kore A.M., Jeffery E.H., Walling M.A.: Effects of 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)-propane on xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 1993; 31: 723–729
- [50] Krajka-Kuźniak V., Szafer H., Baer-Dubowska W.: Hepatic and extrahepatic expression of glutathione S-transferase theta in rat and its modulation by naturally occurring phenolic. Abstracts of 18th Meeting of European Association for Cancer Research, Innsbruck, 3-6.07.2004, 343–344
- [51] Krajka-Kuźniak V., Szafer H., Baer-Dubowska W.: Modulation of 3-methylcholanthrene-induced rat hepatic and renal cytochrome P450 and phase II enzymes by plant phenols: protocatechuic and tannic acids. *Toxicol. Lett.*, 2004; 152: 117–126
- [52] Krajka-Kuźniak V., Szafer H., Baer-Dubowska W.: Modulation of rat liver and kidney GST activity and expression by oral administration of indole-3-carbinol. *Acta Biochim. Pol.*, 2005; 52(Suppl.1): 155–156
- [53] Kramer F., Jensen P.S., Vinggaard A.M., Larsen E.H., Breinholt V.M.: Effect of utero-administered coumestrol, equol, and organic selenium on biomarkers for phase 2 enzyme capacity and redox status. *Nutr. Cancer*, 2003; 46: 73–81
- [54] Kwak M.K., Wakabayashi N., Kensler T.W.: Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.*, 2004; 555: 133–148
- [55] Landi S.: Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res.*, 2000; 463: 247–283
- [56] Lee J.M., Moehlenkamp J.D., Hanson J.M., Johnson J.A.: Nrf2-dependent activation of the antioxidant response element by *tert*-butylhydroquinone is independent of oxidative stress in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 280: 286–292
- [57] Li R., Bianchet M.A., Talalay P., Amzel L.M.: The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1995; 92: 8846–8850
- [58] Lohr J.W., Willsky G.R., Acara M.A.: Renal drug metabolism. *Pharmacol. Rev.*, 1998; 50: 107–141
- [59] Mahéo K., Morel F., Langouet S., Kramer H., Le Ferrec E., Ketterer B., Guillouzo A.: Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Res.*, 1997; 57: 3649–3652
- [60] Maliakal P.P., Coville P.F., Wanwimolruk S.: Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001; 53: 569–577
- [61] Marnett L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 361–370
- [62] McLellan L.I., Harrison D.J., Hayes J.D.: Modulation of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase by the anticarcinogen butylated hydroxyanisole in murine extrahepatic organs. *Carcinogenesis*, 1992; 13: 2255–2261
- [63] McLellan L.I., Judah D.J., Neal G.E., Hayes J.D.: Regulation of aflatoxin B1-metabolizing aldehyde reductase and glutathione S-transferase by chemoprotectors. *Biochem. J.*, 1994; 300: 117–124
- [64] Moon Y.J., Wang X., Moris M.E.: Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro*, 2006; 20: 187–210
- [65] Munday R., Munday C.M.: Induction of phase II detoxication enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 1867–1871
- [66] Munday R., Munday C.M.: Selective induction of phase II enzymes in the urinary bladder of rats by allyl isothiocyanate, a compound derived from Brassica vegetables. *Nutr. Cancer*, 2002; 44: 52–59
- [67] Munday R., Munday J.S., Munday C.M.: Comparative effects of mono-, di-, tri-, and tetrasulfides derived from plants of the Allium family: redox cycling *in vitro* and hemolytic activity and phase 2 enzyme induction *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 34: 1200–1211
- [68] Nakamura Y., Ohigashi H., Maruda S., Murakami A., Morimitsu Y., Kawamoto Y., Osawa T., Imagawa M., Uchida K.: Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res.*, 2000; 60: 219–225
- [69] Nho C.W., Jeffery E.: The synergistic upregulation of phase II detoxification enzymes by glucosinolate breakdown products in cruciferous vegetables. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2001; 174: 146–152
- [70] Oakley A.J.: Glutathione transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005; 15: 716–723
- [71] Piper J.T., Singhal S.S., Salameh M.S., Torman R.T., Awasthi Y.C., Awasthi S.: Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1998; 30: 445–456
- [72] Rauth A.M., Goldberg Z., Misra V.: DT-diaphorase: possible roles in cancer chemotherapy and carcinogenesis. *Oncol. Res.*, 1997; 9: 339–349
- [73] Ross D.: Quinone reductases multitasking in the metabolic world. *Drug Metab. Rev.*, 2004; 36: 639–654
- [74] Seo K.W., Kim J.G., Park M., Kim T.W., Kim H.J.: Effects of phenethyl isothiocyanate on the expression of glutathione S-transferases and hepatotoxicity induced by acetaminophen. *Xenobiotica*, 2000; 30: 535–545
- [75] Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A.: Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, 2001; 360: 1–16
- [76] Sherratt P.J., Manson M.M., Thomson A.M., Hissink E.A., Neal G.E., van Bladeren P.J., Green T., Hayes J.D.: Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem. J.*, 1998; 335: 619–630
- [77] Sies H.: Oxidative stress: quinone redox cycling. *JSJ Atlas Sci. Biochem.*, 1988; 1: 109–114
- [78] Singh S.V., Hu X., Srivastava S.K., Singh M., Xia H., Orchard J.L., Zaren H.A.: Mechanism of inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 1357–1360
- [79] Singletary K., MacDonald C., Iovinelli M., Fisher C., Wallig M.: Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7, 12-dimethylbenzo[*a*]anthracene. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 1039–1043
- [80] Smitskamp-Wilms E., Hendriks H.R., Peters G.J.: Development, pharmacology, role of DT-diaphorase and prospects of the indoloquinone E09. *Gen. Pharmacol.*, 1996; 27: 421–429
- [81] Sohn O.S., Fiala E.S., Upadhyaya P., Chae Y.H., El-Bayoumy K.: Comparative effects of phenylenebis(methylene)selenocyanate isomers on xenobiotic metabolizing enzymes in organs of female CD rats. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 615–621
- [82] Song L.L., Kosmeder J.W.Jr, Lee S.K., Gerhäuser C., Lantvit D., Moon R.C., Moriarty R.M., Pezzuto J.M.: Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res.*, 1999; 59: 578–585
- [83] Sporn M.B., Liby K.T.: Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2005; 2: 518–525
- [84] Talalay P.: Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*, 2000; 12: 5–11
- [85] Talalay P., Dinkova-Kostova T., Holtzclaw D.W.: Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.*, 2003; 43: 121–134
- [86] Tanaka T., Kawabata K., Kakumoto M., Hara A., Murakami A., Kuki W., Takahashi Y., Yonei H., Maeda M., Ota T., Odashima S., Yamane T., Koshimizu K., Ohigashi H.: Citrus auraptenone exerts dose-dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis: the inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid peroxidation and with induction of phase II drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 1998; 58: 2550–2556
- [87] Tanaka T., Kawabata K., Kakumoto M., Makita H., Ushida J., Honjo S., Hara A., Tsuda H., Mori H.: Modifying effects of a flavonoid morin on azoxymethane-induced large bowel tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 1477–1484
- [88] Tew K.D.: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.*, 1994; 54: 4313–4320
- [89] Traver R.D., Horikoshi T., Danenberg K.D., Stadlbauer T.h., Danenberg P.V., Ross D., Gibson N.W.: NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res.*, 1992; 52: 797–802
- [90] Trull A.K., Facey S.P., Rees G.W., Wight D.G., Noble-Jamieson G., Joughin C., Friend P.J., Alexander G.J.: Serum alpha glutathione S-transferase- a sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation*, 1994; 58: 1345–1351
- [91] Tseng T.H., Hsu J.D., Lo M.H., Chu C.Y., Chou F.P., Huang C.L., Wang C.J.: Inhibitory effect of *Hibiscus protocatechuic* acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett.*, 1998; 126: 199–207

- [92] Uda Y., Price K.R., Williamson G., Rhodes M.J.: Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells *in vitro* by flavonoids. *Cancer Lett.*, 1997; 120: 213–216
- [93] van Lieshout E.M., Bedaf M.M., Pieter M., Ekkel C., Nijhoff W.A., Peters W.H.: Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 2055–2057
- [94] Vaubourdolle M., Chazouilleres O., Briaud i., Legendre C., Serfaty L., Poupon R., Giboudeau J.: Plasma alpha-glutathione S-transferase assessed as a marker of liver damage patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chem.*, 1995; 41: 1716–1719
- [95] Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L.: Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*, 2001; 21: 381–406
- [96] Yang Y., Cheng J.Z., Singhal S.S., Saini M., Pandya U., Awasthi S., Awasthi Y.C.: Role of glutathione S-transferase in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 19220–19230
- [97] Yang Y., Sharma R., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y.C.: Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Bioch. Pol.*, 2003; 50: 319–333
- [98] Yang Y., Sharma R., Zimniak P., Awasthi Y.C.: Role of alpha class glutathione S-transferases as antioxidant enzymes in rodent tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2002; 182: 105–115
- [99] Yu X., Hensler T.: Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat. Res.*, 2005; 591: 93–102