

Wpływ β -karotenu, retinoidów i receptorów retinoidowych na proliferację i transformację nowotworową komórek

Katarzyna Staniaszek¹, Anna Goździcka-Józefiak²

¹Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

²Zakład Wirusologii Molekularnej, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

The influence of β -carotene, retinoids, RAR and RXR receptors on proliferation and neoplastic transformation of cells

Summary

Beta carotene is a member of a class of substances called carotenoids. Beta carotene, alpha carotene and beta cryptoxanthin can serve as dietary precursors of retinoids (RA, all-trans retinol or provitamin A). Biological effects of retinoids and expression of RA responsive gene are mediated by different receptors, namely RAR and RXR in homodimeric or heterodimeric form. Expression levels of the retinoic acid receptors are significantly different in neoplastic tissues compared with non-neoplastic tissues for many types of tumors.

Key words:

β -carotene, retinoids, RAR and RXR receptors, cancer.

Adres do korespondencji

Anna Goździcka-Józefiak,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Instytut Biologii
Eksperymentalnej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań.

1. Wstęp

Karotenoidy stanowią bardzo zróżnicowaną grupę związków pigmentowych, ważnych dla życia wielu mikroorganizmów, roślin i zwierząt.

W organizmach fotosyntetyzujących chronią one chlorofil przed fotooksydacją oraz absorbują światło i następnie przekazują energię wzbudzenia elektronowego na chlorofil. Ponadto,

odpowiadają za kolory czerwony, pomarańczowy, żółty i zielony kwiatów, owoców i warzyw. Związki te są pochodnymi fitoenu ($C_{40}H_{56}$), który ulega kolejno przemianie do fitofluenu i ζ -karotenu, przy udziale desaturazy fitoenu. Następnie z ζ -karotenu powstaje neurosporen, który jest prekursorem likopenu. Proces ten zachodzi przy udziale desaturazy ζ -karotenu. Przemianę likopenu do α - i β -karotenu katalizują odpowiednio cyklazy α - i β -likopenu. Do tej pory opisano ponad 600 związków z tej grupy, które powstają w wyniku odpowiedniej przemiany (uwodorowania, odwodorowania, cyklizacji/lub oksydacji) $C_{40}H_{56}$. Związki te możemy podzielić na dwie grupy: 1) do której zaliczamy β -karoten i 2) w skład której wchodzi α -karoten i likopen oraz karotenoidy zawierające tlen (ksantofile typu lutein, zeaksantyn β -kryptoksantyn) (1).

W przyrodzie β -karoten występuje w formie *all-trans* β -karotenu i 9-cis β -karotenu oraz w niewielkiej ilości w formie 13-cis β -karotenu. Syntetyczny β -karoten otrzymywany jest głównie w formie *all-trans* β -karoten z niewielką ilością 13-cis β -karotenu i znacznie mniejszą 9-cis β -karotenu.

W organizmach człowieka i zwierząt α -karoten, β -karoten i β -kryptoksantyn są prekursorami witaminy A oraz innych retinoidów. Związki te dostarczane są wraz z pożywieniem, stanowiąc ważne składniki w żywieniu człowieka z uwagi na obserwowane ich działanie prozdrowotne i przeciwnowotworowe. Dzienna dawka β -karotenu w diecie człowieka waha się od 1,3 do 2,9 mg. Największe jego ilości zawiera marchew, brokuły, szpinak, olej palmowy, oherżyna (2).

Wydajność absorpcji β -karotenu, z pożywienia przez organizm człowieka i zwierząt jest bardzo zróżnicowana i np. dla β -karotenu zawartego w marchwi oraz innych składnikach diety wynosi mniej niż 5%. Jednocześnie karoten podawany jako suplement diety może być absorbowany aż w 70%. Duży wpływ ma na to rodzaj spożywanego pokarmu czy stan metabolizmu w organizmie. W diecie karoten podawane są w formie rozpuszczonej w tłuszczu roślinnym lub w kompleksach, którego składnikami są białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz polisacharydy, nie zawsze trawione w przewodzie pokarmowym (3). Z kompleksów takich β -karoten uwalniany jest tylko w niewielkim procencie. Jako uzupełnienie diety związek ten podaje się najczęściej rozpuszczony w tłuszczach, w formie miceli, co ułatwia jego wnikanie do komórki. Wszystkie izomery karotenu są wychwytywane przez enterocyty w świetle jelita. W enterocytach część *all-trans* karotenu jest utleniana do retinalu i redukowana do retinolu. Retinol ulega następnie estryfikacji do estrów retinyłu. β -karoten i estry retinyłu są uwalniane z enterocytów do układu limfatycznego w chylomikronach i w ten sposób są przenoszone z jelita do innych tkanek w organizmie. Podczas tego procesu lipaza lipoproteinowa hydrolizuje większość triglicerydów w chylomikronach, co prowadzi do powstania pozostałości chylomikronowych, zawierających apolipoproteinę E i B_{48} na powierzchni, pobieranych głównie przez hepatocyty oraz w niewielkim stopniu przez komórki innych tkanek. Wewnątrz hepatocytów β -karoten jest włączany do lipoprotein i uwalniany do krwioobiegu w formie lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL, ang. *very low-density lipo-*

proteins) lub niskiej gęstości (LDL, ang. *low density lipoproteins*). Następnie, VLDL są przekształcane do LDL z udziałem lipazy lipoproteinowej. LDL stanowią główną formę, w jakiej β -karoten jest transportowany w ustroju (4-8). Około 10% karotenoidów zawartych w surowicy ulega przemianie do witaminy A.

2. Wpływ β -karotenu na komórki

Karotenoidy mogą oddziaływać na metabolizm komórek i ekspresję genów komórkowych bezpośrednio lub pośrednio, jako prekursorzy retinoidów.

Molekularny mechanizm ich aktywności biologicznej nie jest do końca wyjaśniony. Sugeruje się, że związane jest to z ich właściwościami antyoksydacyjnymi, oraz wpływem na ekspresję licznych genów w tym białek związanych z funkcjonowaniem połączeń międzykomórkowych, układu odpornościowego, apoptozą.

Silnym właściwościami antyoksydacyjnym karotenoidów i roli w usuwaniu wolnych rodników przypisuje się ich działanie przeciwnowotworowe. Właściwości antyoksydacyjne β -karotenu oraz zdolność do hamowania wzrostu komórek nowotworowych, m.in. raka: jelita grubego, czerniaka, prostaty, płuc, obserwowane w hodowli (w stężeniu 1-300 μ M), zadecydowały o tym, że związek ten, jak i jego pochodne stały się czynnikami zalecanymi zarówno w profilaktyce, jak i terapii licznych nowotworów (8-11). Mechanizm ten nie jest jednak do końca poznany. W badaniach eksperymentalnych wskazuje się, że aktywność antyoksydacyjna poszczególnych jego izomerów znacznie się różni (12,13). Niską aktywność mają pochodne karotenu – retinoidy, co jest prawdopodobnie przyczyną spadku aktywności antyoksydacyjnej β -karotenu *in vivo*. Ponadto, karotenoidy, z uwagi na obecność w cząsteczce licznych wiązań nienasyconych, łatwo ulegają degradacji pod wpływem temperatury, tlenu i światła.

W licznych danych epidemiologicznych wskazuje się także na znaczny spadek zachorowania na nowotwory wśród osób stosujących dietę bogatą w karotenoidy (8,12-14).

Na przykład osoby narażone na działanie czynników kancerogennych (azbestu, dymu tytoniowego), a spożywające profilaktycznie β -karoten, rzadziej chorują na nowotwory, aniżeli osoby bez takiej suplementacji. Jednakże, jest to uzależnione od jego dawki, czasu suplementacji oraz spożywania alkoholu czy palenia tytoniu (8,15-17). Obecność alkoholu hamuje aktywność dehydrogenazy alkoholowej, uczestniczącej w przemianie β -karotenu do retinoidów, oraz stymuluje hydrolizę kwasu retinowego, natomiast u palaczy tytoniu związek ten może działać jako czynnik prooksydacyjny i promować proces kancerogenezy płuc.

Danych epidemiologicznych o przeciwnowotworowym działaniu β -karotenu nie potwierdzają do końca badania kliniczne (18,19). Nie uwzględniają one jednak indywidualnej zmienności genetycznej, przyjmując, że każdy z badanych osobników w sposób podobny reaguje na czynniki środowiskowe. Standardowe badania toksy-

kologiczne nad właściwościami mutagennymi, teratogennymi i kancerogennymi karotenów, prowadzone na komórkach różnych linii, nie wskazują jednoznacznie na ich niekorzystny wpływ na komórce (12,18).

W badaniach prowadzonych na szczurach wykazano, że w płucach szczura β -karoten prowadzi do wzrostu aktywności enzymów I fazy kancerogenezy, w tym aktywatorów policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PAH) (19). β -karoten, w zależności od warunków oraz typu komórki, może także przyczyniać się do wzrostu stresu oksydacyjnego, który stanowi jeden z czynników odgrywających główną rolę w indukcji apoptozy. Poprzez zmiany w poziomie wolnych rodników w komórce może on regulować szlaki komórkowe zaangażowane w ten proces (20). Będzie to jednak zależę od biodostępności tego związku dla komórki, sposobu jego przygotowania, jak również dawki. W badaniach prowadzonych na komórkach ludzkich linii WiDr, wywodzących się z raka jelita grubego, wykazano, że komórki te tracą żywotność po inkubacji z β -karotenem, przy stężeniu 100 μM . Spadek żywotności komórek spowodowany był ich obumieraniem na drodze apoptozy, której indukcja zależała od czasu inkubacji. Na przykład, 12% komórek apoptotycznych obserwowano po 24 godzinach inkubacji z β -karotenem, natomiast 26% – po 72 godzinach, przy stężeniu β -karotenu 50 μM . Z kolei procent komórek apoptotycznych przy stężeniu β -karotenu o 50 μM i 100 μM wynosił odpowiednio 14 i 26% po 24 godzinach inkubacji. β -karoten w stężeniu 50-100 μM zwiększał również w komórce wytwarzanie wolnych rodników. Równocześnie, zaobserwowano zahamowanie ekspresji białka BCL-2, którego nadekspresję stwierdzono w licznych typach nowotworów, natomiast nie miało to wpływu na ekspresję białka proapoptycznego BAX. Proapoptyczne działanie β -karotenu za pośrednictwem wolnych rodników było hamowane w hodowlach, do których dodawano również α -tokoferol, natomiast ekspresja białka BCL-2 była na takim samym poziomie, jak w komórkach kontrolnych bez dodatku β -karotenu. Dane te wskazują, że stosowanie karotenu w wysokich dawkach może indukować apoptozę i w efekcie hamować proliferację komórek nowotworowych. Jego działanie prooksydacyjne i związane z tym stres oksydacyjny może przyczynić się do jej transformacji nowotworowej (20). Sugeruje się, że właściwości prooksydacyjne β -karotenu mogą być także wynikiem jego interakcji z błoną komórkową, a ponadto może on modulować aktywność enzymów związanych z cytochromem P₄₅₀ (21). W efekcie dochodzi do zmiany w metabolizmie β -karotenu, obniżenia poziomu jego pochodnych retinoidów, uszkodzenia szlaków metabolicznych regulowanych przez te czynniki i niekontrolowanej proliferacji.

β -karoten moduluje również funkcjonowanie układu odpornościowego. U osób zdrowych, niepalących stosujących dietę z zawartością karotenu 15 mg/dzień obserwowano znaczny wzrost monocytów z ekspresją cząsteczek kompleksu klasy II HLA-DR, wzrost cząsteczek odpowiedzialnych za adhezję komórek, ekspresję białek biorących udział w połączeniach międzykomórkowych oraz antygenów leukocytów 3 i wydzielanie TNF α (ang. *tumor necrosis factor*) przez monocyty krwi. Ponadto, wzbogacenie diety w β -karoten zwiększa aktywność komórek NK, odpowiedź limfo-

cytów na czynniki miogenne, a u osób z chorobą AIDS – liczbę limfocytów CD4. Mechanizm molekularny odpowiedzialny za aktywność immunomodulującą tego związku nie jest poznany (22-24). β -karoten oddziałuje także na ekspresję enzymu HMG-CoA reduktazy, który prawdopodobnie hamuje syntezę endogennego cholesterolu, być może proliferację komórek oraz ich transformację. W badaniach epidemiologicznych wskazuje się także na związek pomiędzy dietą a występowaniem chorób naczyniowych (8,22). Osoby spożywające β -karoten, ale nie lycopen, mają lipoproteidy niskocząsteczkowe mniej utlenione (22,25).

W badaniach ekspresji genów w komórkach śródbłonna pod wpływem β -karotenu, prowadzonych w układzie *in vitro* za pomocą mikromacierzy, wykazano, że dochodzi do spadku ekspresji koneksyny 43 i aktywacji enzymów biorących udział w przemianie ksenobiotyków, a także działających proangiogenicznie. Związek ten również w komórkach śródbłonna może zwiększać peroksydację lipidów (22,26). Wykazano, że karotenoidy mogą także regulować funkcje koneksyny 43 i zwiększać komunikację pomiędzy komórkami prawidłowymi oraz wpływać na wzrost poziomu enzymów detoksykujących, tj. transferazy S-glutationu (GST) i peroksydazy glutationu (12,19).

Zwierzęta, które otrzymywały duże dawki β -karotenu osiągały większą masę ciała w porównaniu z grupą kontrolną, a ponadto obserwowano u nich przerost białej tkanki tłuszczowej i nasilenie neoangiogenezy w podskórnej tkance tłuszczowej. Z kolei, suplementacja β -karotenem i jej pochodną – kwasem retinowym (witamina A), hamowała ekspresję restyny i proangiogenicznej leptyny. Wskazuje to na proangiogeniczne i proadipogeniczne działanie tego związku (22,25). Procesy te odgrywają istotną rolę w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Wpływają na rozwój płodu, przebudowę tkanek i naczyń krwionośnych w procesie niedokrwienia lub zapalnym, w proliferacji retinopatii cukrzycowej, czy w rozwoju i wzroście zmian nowotworowych. Rozwój naczyń krwionośnych ma także wpływ na funkcjonowanie tkanki tłuszczowej jako organu metabolicznego i endokrynnego (22,23).

Okolo 10% karotenoidów w organizmie człowieka ulega przemianie do witaminy A.

3. Retinol (witamina A) i jego metabolity

Zdolność β -karotenu do modulowania licznych procesów komórkowych może być także efektem jego przemiany do retinolu – witaminy A i jej metabolitów – retinoidów. Retinoidy regulują w komórkach ssaków proliferację, różnicowanie i kancerogenezę (26,27).

W nowotworach licznych typów obserwowano zmiany w metabolizmie retinolu, niski poziom transferazy acylretinolu i dehydrogenazy 2 retinoaldehydu, natomiast wysoki CYP26A1. Molekularny mechanizm działania retinoidów w komórkach różnych typów nie jest do końca poznany (28-35).

Dostarczany do organizmu β -karoten, pod wpływem tlenu i enzymu dioksygenazy, ulega rozszczepieniu do dwóch cząsteczek aldehydu retinowego, który podlega

przemianie do retinolu (witamina A) i kwasu retinowego (RA) – aktywnej formy witaminy A. Retinol jest metabolicznym prekursorem biologicznie aktywnych retinoidów, do których zaliczamy m.in. kwas całkowicie transretinowy (ATRA), kwas dihydroretinowy i kwas 9-cis retinowy (9c-RA). Uwolniony do osocza z wątroby retinol i kwas retinowy jest transportowany w organizmie człowieka, z udziałem białek RBP (ang. *retinol binding protein*), do komórek odpowiednich tkanek, gdzie wiąże się ze specyficznymi białkami komórkowymi (32).

Obecny w cytoplazmie kwas retinowy wychwytuje swoiste receptory RAR i RXR. Należą one do rodziny receptorów jądrowych, do której zaliczane są także receptory dla hormonów steroidowych, glikokortykoidów, witaminy D₃ oraz hormonów tarczycy (36).

Białka receptorowe wiążące retinoidy (RA's, ang. *receptor associated protein*) RAR i RXR są obecne w komórce w trzech izoformach: RAR α , RAR β i RAR γ , oraz RXR α , RXR β i RXR γ . Geny je kodujące – zlokalizowane na oddzielnych chromosomach. Produktami poszczególnych genów mogą być co najmniej dwa transkrypty, powstałe w wyniku inicjacji transkrypcji z różnych miejsc promotorowych, jak również w wyniku alternatywnego *splicingu* ich pre-mRNA.

Organizacja sekwencji kodującej poszczególne izoformy receptorów RAR i RXR jest bardzo zachowawcza. W cząsteczce ich produktów białkowych można wyróżnić sześć regionów (domen), oznaczonych literami od A do F, pełniących określone funkcje. Za aktywację transkrypcji odpowiadają sekwencje kodujące N-końcową domenę A, wraz z regionem B oraz fragmentem regionu C i większej części fragmentu E. Domena C zbudowana jest z około 80 aminokwasów i stanowi tzw. rejon zawiąsowy, który bierze udział w wiązaniu kompleksu receptor hormon z DNA. W wiązanie to zaangażowane są również moduły strukturalne helisa-zwrot-helisa, zlokalizowane w tym rejonie receptora. W dimeryzacji receptora biorą udział aminokwasy z domen E i F oraz pięcioaminokwasowy fragment z końca C modułu, o strukturze palca cynkowego. Receptory RAR i RXR wykazują wysoki stopień homologii sekwencji aminokwasowej (rzędu 60% w domenie wiążącej DNA).

Fragment z końca N cząsteczki A/D pełni funkcję aktywatora (AF-I), niezależnego od liganda (37). Ligandami dla receptorów RAR i RXR są retinoidy.

Kwas całkowicie transretinowy (ATRA) jest ligandem wiążącym się tylko z receptorami RAR, natomiast 9-cis retinowy – z receptorami RXR, jak również RAR. Białka RAR zwykle funkcjonują w heterodimerycznym kompleksie z RXR. RXR tworzy ponadto homodimery i heterodimery nie tylko z RAR, ale również z witaminą D₃ i receptorem dla hormonu gruczołu tarczowego oraz receptorem czynnika odpowiedzialnego za aktywację proliferacji peroksysomów (PPAR, ang. *peroxisome proliferators activated receptor*) i innymi. Heterodimery formowane przez ten receptor mogą być aktywowane ligandem specyficznym dla RXR, jak również dla jego partnera. Kompleksy takie wiążą się z określonymi elementami w DNA, zwanymi RARE (ang. *retinoic acid response element*) i RXRE (ang. *retinoic X response element*), zlokalizowanymi w rejonach 5' oskrzydlających określone geny i uczestniczą w regulacji ich eks-

presji (38). Specyficzność wiązania jest zależna od liczby nukleotydów przedzielających dwa elementy wiążące. Na przykład, heterodimer RAR : RXR wiąże się z elementami RARE, które przedzielone są dwoma lub pięcioma nukleotydami (DR2 lub 5), natomiast homodimer RXR – z elementami RXRE, rozdzielonymi pojedynczym nukleotydem (39).

Receptory kwasu retinowego aktywują transkrypcję po przyłączeniu specyficznych koaktywatorów. Jednym z nich jest acetylotransferaza histonowa (HAT). W wyniku działania tego enzymu zwiększa się dostępność chromatyny dla czynników transkrypcyjnych i inicjacji transkrypcji. Koaktywatorami takimi są także białka SWI/SNF (*SWItch/sucrose nonfermentable*) tworzące kompleks uczestniczący w remodelowaniu nucleosomu oraz oddziałujące z nimi czynniki BAF60c1 (ang. *bioaccumulation factor*) i BAF60c2. Prawdopodobnie biorą one udział w transkrypcji kontrolowanej przez retinol (40,41).

Aktywność receptorów dla retinoidów zmienia się również w wyniku ich fosforylacji (tab.) oraz oddziaływania korepresorów SMRT (ang. *silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*) i NCoR9 (ang. *nuclear receptor corepresor*) hamujących transkrypcję (42-49).

Tabela

Fosforylacja receptorów dla retinoidów (46,48,49)

Receptor	Kinaza	Miejsce fosforylacji	Wpływ na aktywność receptora
RAR	Cdk7/TFIIH PKA	reszta seryny 77 liczne miejsca	wzrost AF-1 transaktywacji aktywność zależna od RA
RXR	MAPK PKA	seryna 260 liczne miejsca	hamuje aktywację RXR i VDR zależną od liganda aktywacja zależna od RA

Receptor RXR w wyniku fosforylacji zmienia konformację tak, że nie jest rozpoznawany przez specyficzne przeciwciała. Zmiany te prowadzą do odmiennego jego powinowactwa do VDR i specyficznych koaktywatorów heterodimeru RXR/VDR (50). Aktywacja receptorów zachodzi po związaniu liganda. Pod nieobecność liganda proces ten jest hamowany przez wiązanie się do receptorów specyficznych represorów. Represor taki jest uwalniany przez wiązanie właściwego liganda (51).

Ekspresja receptorów dla retinoidów jest zróżnicowana w komórkach różnych tkanek oraz narządów i zmienia się w trakcie rozwoju organizmu. Duży wpływ na ten proces mają retinoidy. W badaniach nad rolą RA wykazano, że związek ten jest niezbędny na przykład w różnicowaniu komórek płuc i prowadzi do aktywacji receptora RAR β , ale nie α . Receptor RAR β indukuje ekspresję czynnika wzrostu fibroblastów FGF10 i rozwój pęcherzyków w płucach. Z kolei w badaniach nad rozwojem przewodu pokarmowego zwierząt wskazuje się na udział w nim głównie RAR α . Na podstawie tych da-

nych sugeruje się, że zrównoważony poziom, jak i aktywacja obu receptorów są niezbędne dla rozwoju płuc i różnicowania komórek endodermalnych (52). Receptory retinoidowe i RA biorą także udział w regulacji rozwoju tkanki nerwowej. W badaniach na komórkach linii PCC7 (ang. *embryonal carcinoma cell line*) wykazano wysoką ekspresję RXR α i RAR α , a niską RXR β i prawie niewykrywalną RAR β , RAR γ i RXR, natomiast w trakcie różnicowania tkanki nowotworowej obserwowano przede wszystkim ekspresję RAR α i RAR γ (53). Z kolei w badaniach prowadzonych na komórkach ludzkiego raka zarodkowego linii NT2, traktowanych retinoidami, wykazano, że w trakcie różnicowania się układu nerwowego zmienia się profil ekspresji receptorów RXR α , RAR α , RAR β i RAR γ , a główną rolę w tym procesie pełni RXR α (54-56).

Zróżnicowaną ekspresję receptorów dla retinoidów obserwowano także w komórkach szczurzych jąder traktowanych kwasem retinowym. RA oddziaływał na komórki przede wszystkim za pośrednictwem receptora RAR α , z wyjątkiem komórek Sertoliego, gdzie proces ten zachodzi z udziałem RAR β (57).

Receptory retinoidowe zaangażowane są również w regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie komórek wątrobowych. Dimer receptorów RAR α : RXR α jest represorem transkrypcji genu kodującego białko MRP3 (ang. *multidrug resistance-associated protein*), którego aktywatorem jest czynnik Sp1. Proces ten zależy od stężenia receptorów retinoidowych w komórce. Białko Sp1 wiąże się do kasety GC w rejonie -113 do -108 genu *MRP3*. W obecności heterodimeru receptora retinoidowego jego powinowactwo do tego elementu wiążącego w DNA znacznie spada.

MRP3 zapobiega akumulacji w wątrobie toksyn, związków bilirubinowych, żółci. Z tego powodu, ekspresja RAR α : RXR α w wątrobie uszkodzonej jest zminimalizowana lub zahamowana co prowadzi do nadekspresji MRP3 (58,59).

Receptory RAR/RXR są także zaangażowane w dojrzewanie komórek dendrytycznych, odgrywających główną rolę w odpowiedzi immunologicznej, a niedobór witaminy A może ułatwiać zakażenia licznymi patogenami (60). Receptory RAR i RXR oddziałują również z β -kateniną, która bierze udział w przekazaniu sygnału indukowanego przez czynnik WNT (ang. *wingless*), odpowiadający za proces wzrostu i różnicowanie komórek, morfogenezę tkanek, jak również ontogenezę (61-63). Brak receptorów, np. RXR α w komórkach zarodkowych powoduje, że są one odporne na różnicowanie, hamowanie proliferacji i apoptozę pod wpływem retinoidów (55,56). Nieprawidłowe funkcjonowanie receptorów retinoidowych może być także spowodowane brakiem odpowiednich ligandów.

Wykazano, że brak w organizmie witaminy A jest przyczyną spadku ekspresji genu kodującego karboksykinazę fosfoenolopirogronianu w wątrobie myszy. Ekspresja tego genu jest regulowana przez receptory retinoidowe RAR α i RXR α (54).

Retinoidy (RA i 9c-RA w 10 μ M stężeniu) biorą także udział w stymulacji promotora genu apolipoproteiny (apo) A1 w komórkach Caco2 i HepG2 (ang. *human intestinal and hepatoma cells*). W rejonie regulatorowym tego genu (-214-190pz) występuje 24-nukleotydowy motyw zawierający element RARE(64).

Podobnie ligandy RXR silnie wpływają na zahamowanie wzrostu komórek w licznych liniach komórkowych (55,56).

Poziom ekspresji receptorów retinoidowych wyraźnie zmienia się podczas rozwoju procesu nowotworowego. W badaniach prowadzonych na komórkach NSCLC (ang. *non-small cell lung cancer*), wywodzących się z raka płuc, wykazano znacznie obniżony poziom receptorów RAR i RXR w porównaniu z komórkami prawidłowymi (RAR α 75,1%, RAR β 59,1%, RAR γ 92%, RXR α 76%, RXR β 54,5%, RXR γ 88,6%) (65). Ponadto stwierdzono, że proliferację komórek można zahamować, dodając do hodowli ATRA.

W nowotworach licznych typów obserwowano również zmiany w metabolizmie retinolu – niski poziom transferazy acetyloretinolu i dehydrogenazy 2 retinoaldehydu, natomiast wysoki CYP 26A1 (66-69).

Na podstawie wielu danych wskazuje się również, że wraz z progresją procesu nowotworowego spada ekspresja RAR α w odpowiedzi na ligand (54,70). Z kolei Lord i wsp. (68) wykazali znaczny spadek poziomu ekspresji receptora RAR γ , natomiast wzrost RAR α i β w trakcie rozwoju nowotworu Barretta, wywodzącego się z komórek nabłonkowych przełyku, w porównaniu z tkankami prawidłowymi.

W licznych typach nowotworów (piersi, prostaty, jelita grubego, płuc) stwierdzono również obniżenie lub brak ekspresji RAR β (71-73). Aktywność różnych izoform tego receptora jest regulowana przez RA. Z kolei, w badaniach prowadzonych na komórkach wywodzących się z nowotworów głowy i szyi wskazuje się, że za zahamowanie ich wzrostu odpowiada nie RAR β , lecz RAR γ . Brak ekspresji RAR γ obserwowano także w rakach nabłonkowych (74-77).

Blaese i wsp. (75) badając odpowiedź komórek na retinoidy w 7 ludzkich liniach komórkowych: wywodzących się z komórek nabłonkowych szyjki macicy – HTB35, HTB43, ludzkich keratynocytów – SCC4, SCC9, raka piersi MDA-MB231, raka jelita grubego HCT116 i raka szyjki macicy – CaSki, jak również w prawidłowych fibroblastach ludzkich – HSF6, sugerują, że brak receptora RAR β w komórkach nowotworowych nie jest dobrym czynnikiem prognostycznym dla terapii retinoidami.

Wang i wsp. (71) wykazali, że zahamowanie ekspresji receptora RAR β w komórkach raka nerki RCC (ang. *renal cell carcinoma*) może być spowodowane przez czynniki epigenetyczne związane z acylacją i deacylacją histonów przy udziale acetylotransferazy histonowej i deacetylazy histonowej. Wyciszenie ekspresji izoform receptora RAR β w wyniku metylacji ich rejonu promotorowego stwierdzono także w raku płuc (78). Obniżenie ekspresji wszystkich izoform receptora RAR obserwowano również w zmianach nowotworowych szyjki macicy (77). Wyraźny spadek ekspresji receptorów RAR γ i RXR α zaobserwowano z kolei w czerniaku skóry, natomiast w nowotworach głowy i szyi za zahamowanie ich wzrostu odpowiada RAR γ (73,76,79).

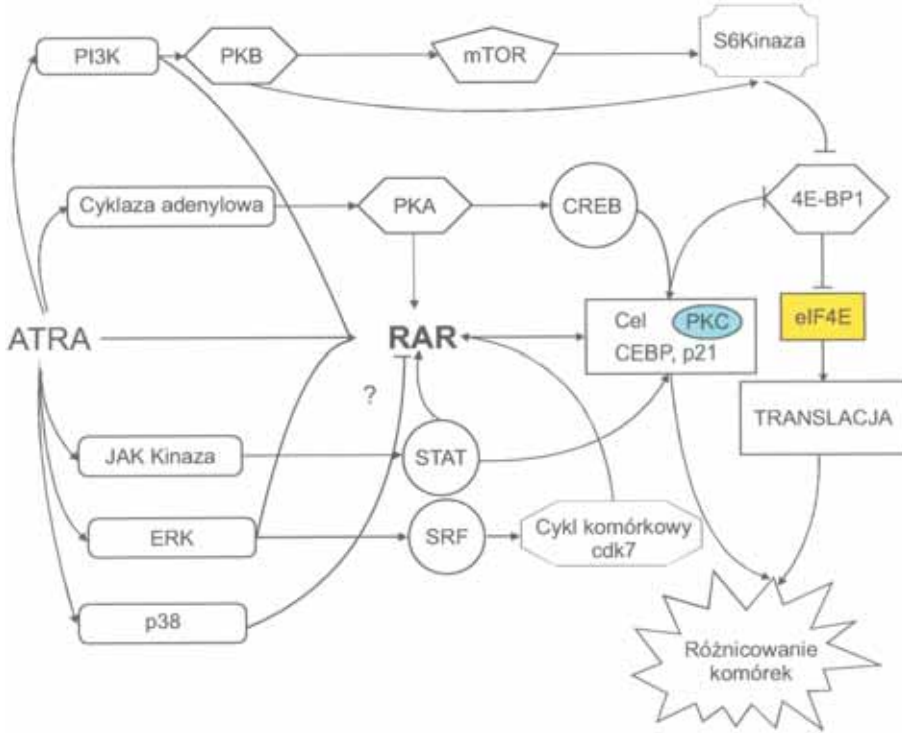
W badaniach na komórkach gruczolaków wykazano wyraźnie obniżoną ekspresję lub brak receptorów RXR β i RXR γ w trakcie rozwoju nowotworu, podczas gdy w komórkach prawidłowych obserwowano ekspresję wszystkich jego izoform (79).

Z kolei dodatek do hodowli komórek raka piersi MCF-7 (ang. *human breast cancer cells*) ATRA, w stężeniu 10^{-7} μ M, powodował spadek poziomu RAR α , RAR γ i RXR α w komórce w wyniku ich degradacji w proteosomach (80). Zmiany w ekspresji RXR obserwowano także w komórkach wywodzących się z raka jelita grubego: HCT-116, WiDr, Sw620, traktowanych retinoidami. Efektem tego była degradacja β -kateniny w proteosomach i zahamowanie wzrostu komórek (81).

ATRA hamował także wzrost komórek podścieliska gruczołu krokowego za pośrednictwem RAR α , ale nie RAR β (82). Przeciwnowotworowe działanie tego retinoidu obserwowano również w raku trzustki. Dodatek ATRA w stężeniu od 1 do 50 μ M do hodowli komórek MiaPaCa-2, wywodzących się z ludzkiego raka trzustki, hamował ich wzrost w fazie Go/G1, (przy stężeniu 40 i 50 μ M) oraz indukował apoptozę (82,83). Na podstawie wyników badań klinicznych, jak również na liniach komórkowych wywodzących się z raka szyjki macicy (SiHa) wskazuje się, że retinoidy w stężeniu 10^{-7} i 10^{-6} nie są efektywne terapeutycznie w komórkach szyjki macicy z zaawansowaną dysplazją, natomiast w stężeniu 10^{-4} i 10^{-5} ATRA hamował wzrost komórek SiHA (82,84).

Molekularny mechanizm zróżnicowanej aktywności retinoidów w komórkach różnych typów nie jest do końca poznany (32-39). Ivanova i wsp. (84) wskazują, że jednym z czynników odpowiedzialnych za ten proces może być metylacja DNA w rejonach kodujących receptor RAR β . Na podstawie wyników przeprowadzonych badań przez Zhu i wsp. (83) wykazano, że zahamowaniu wzrostu komórek raka piersi pod wpływem RA, towarzyszy spadek ekspresji białka p21, jak również cykliny D3 i CDK4. Z kolei dobre efekty terapeutyczne w leczeniu białaczek promielocytarnych APL (ang. *acute promyelocytic leukemia*) obserwowano stosując ATRA. Na rysunku przedstawiono postulowane szlaki komórkowe, które są regulowane przez ten retinoid (85,86). APL powstaje w wyniku translokacji pomiędzy genem PML zlokalizowanym na chromosomie 15 i receptorem RAR α na chromosomie 17. Wynikiem takiej translokacji jest fuzyjne białko PML-RAR α , które hamuje różnicowanie prekursorów limfocytów i jest odpowiedzialne za powstanie choroby (APL). Sugeruje się, że działanie lecznicze ATRA w przypadku białaczek może być także wynikiem bezpośredniego oddziaływania tego retinoidu na powstałe białko, prowadzące do jego inaktywacji. Białko PML-RAR α wiąże również korepresory deacylazy histonowej HDAC, które odpowiedzialne są za zahamowanie transkrypcji pod wpływem ATRA (87).

Retinoidy poza tworzeniem kompleksów z RAR i RXR indukują także szereg szlaków komórkowych, w które zaangażowane są liczne kinazy komórkowe odpowiedzialne za aktywację lub hamowanie transkrypcji wielu genów komórkowych (85,88). Efektem tego może być zahamowanie ekspresji czynnika AP1, wzrost ekspresji TGF β 2 (ang. *transforming growth factor beta2*) oraz IGFBP3 (ang. *insulinlike growth factor binding protein3*), modulacja acylacji histonów, indukcja apoptozy (89,90). Białko AP1 jest homodimerem onkogenu Jun lub heterodimerem Jun/Fos i jako czynnik transkrypcyjny indukuje ekspresje czynników aktywujących transkrypcję, białek on-



Rys. Szlaki komórkowe aktywowane w komórce przez ATRA (85,86).

ATRA jest nie tylko ligandem dla receptorów retinoidowych, ale może także oddziaływać na liczne białka biorące udział w przekazie sygnału w komórce, prowadzące do aktywacji lub hamowania translacji białek odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego i różnicowanie komórek. Związek ten za pośrednictwem kinazy Jak stymuluje fosforylację i aktywację białka STAT, które jest nie tylko przekaźnikiem sygnału w komórce, ale także aktywatorem transkrypcji białek w tym CEBP odpowiedzialnego za różnicowanie komórek. ATRA może aktywować zarówno kinazy p38 jak i p42/44 MAP. W badaniach z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów tych kinaz wskazuje się, że do różnicowania komórek potrzebna jest dodatkowo aktywność kinazy zewnątrzkomórkowej ERK, natomiast p38 może blokować sygnały odpowiedzialne za ten proces.

ATRA jest także aktywatorem cyklazy adenylowej, która za pośrednictwem przekaźników komórkowych, tj. cAMP lub cGTP aktywuje serynowo/treoninową kinazę PKA, która fosforyluje białka, wiążące się z elementem CREB w DNA (*cAMP*, ang. *response element binding*), regulując w ten sposób transkrypcję genów licznych białek (w tym RAR, CEBP, kinazy PKC, p21), odpowiedzialnych za różnicowanie się komórek.

W komórkach APL wykazano także wzrost aktywności kinazy p70S6 pod wpływem ATRA. W badaniach z wykorzystaniem specyficznych receptorów wskazuje się, że proces ten jest poprzedzony wzrostem aktywności kinazy PI3K oraz toru rapamycyny (mTOR). mTOR rapamycyny jest kinazą treonino-serynową, należącą do rodziny PI3K. Białko to bierze udział w regulacji wzrostu i proliferacji poprzez integrację sygnałów indukowanych przez czynnik wzrostu, czynniki żywieniowe oraz zależne od energii. Aktywacja kinazy S6 prowadzi do fosforylacji i inaktywacji czynnika elongacyjnego 4E-BP1 i zahamowania translacji RNA przez mechanizm zależny od modyfikacji na końcu 5' nici mRNA (kapu). Stosując inhibitory kinazy PI3K stwierdzono także brak w komórce aktywnego receptora RAR. Aktywność receptora RAR może być stymulowana w wyniku fosforylacji domeny N-końcowej receptora przez liczne kinazy w tym PKA, cdk7, p38 i ERK. Z kolei kinaza ERK w obecności ATRA może przekazywać sygnał na białko SRF (ang. *serum response factor*), stymulując aktywność białek regulujących cykl komórkowy.

kogennych oraz innych czynników odpowiedzialnych za promocję kancerogenezy. Receptory retinoidowe uniemożliwiają formowanie AP1 i jego wiązanie z DNA. W proces ten zaangażowane są przede wszystkim RAR α i RAR β (91). Taki efekt obserwowano w komórkach BGC-823, zawierających oba receptory, natomiast nie w komórkach MKN-4, w których RAR β nie ulega ekspresji (81).

Wskazuje się także na synergistyczne działanie retinoidów z cytokinami. Czynniki wzrostu hepatocytów HGF (ang. *hepatocyte growth factor*) i jego receptor c-Met ulegają nieprawidłowej ekspresji w licznych złośliwych nowotworach mózgu (ang. *gliomas*), wywierając bardzo silne autokrynne działanie proliferacyjne. W badaniach prowadzonych na liniach komórkowych U87 (ang. *human astrocytoma cell line*), w których obydwa białka ulegają ekspresji, wykazano, że niektóre ligandy dla receptora RAR, jak i RXR hamują wzrost tych nowotworów w licznych komórkach. Efekt taki obserwowano przy stężeniu mikromolarnym ATRA (92). Działanie to zachodzi na poziomie transkrypcji. W badaniach na komórkach SiHa (ang. *human cervical cancer*) wykazano, że w hodowlach z dodatkiem ATRA, w stężeniu 10 μ M do 96 godzin, gwałtownie spada wiązanie do białek zewnątrzkomórkowej macierzy (fibronektyny, laminy i kolagenu IV). Ponadto, po 15. dniach wzrostu w obecności ATRA wiązanie komórek SiHa do fibronektyny i fibrynonektyny było hamowane, natomiast adhezja komórek do laminy i kolagenu była podobna jak 3-7 dnia. ATRA zmniejszała także ekspresję receptorów integrynowych (α 5 β 1 i α 3 β 3). Traktowanie komórek ATRA hamuje aktywność kolagenu (93).

ATRA jest także głównym regulatorem ekspresji cyklooksygenazy COX-2 w ludzkiej tkance nerwowej, poprzez mechanizm zależny od RAR i ERK1/2 (94). Związek ten w komórkach SH-SY5Y, wywodzących się z nerwiakowłókniaka, powoduje wzrost ekspresji COX-2 za pośrednictwem RAR β , natomiast nie COX-1. Ekspresji COX-2 towarzyszy synteza prostoglandyny-PGE2. Ponadto wykazano, że komórki SH-SY5Y, do których przed dodaniem ATRA dodano związki hamujące aktywność receptora RAR jak i kinazę MAP promotor genu COX-2 nie był aktywny. Efektów takich nie obserwowano gdy do komórek dodano antagonistę receptora RXR, inhibitor kinazy p38 MAPK jak również inhibitor kinazy c-Jun (95). W rejonie promotora RAR β występuje element RARE. Wykazano także, że RAR i RXR może hamować aktywność promotora COX-2 w innych liniach komórkowych. Aktywację COX-2 przez RAR obserwowano również w komórkach nerki szczura (95,96). Ponadto na podstawie wyników badań na komórkach z nerki szczura wykazano, że ATRA może także oddziaływać na komórki niezależnie od RAR, za pośrednictwem ERK1/2. Udział receptora RXR w aktywności przeciwnowotworowej jest słabo poznany. Wykazano, że homodimer receptora po związaniu liganda ułatwia zatrzymanie cyklu w fazie G1, poprzez wzrost syntezy p21 w komórkach: MDA-MB-231 (ang. *mammary gland tumor cell line*), H12999 raka płuc i COS-1. W promotorze genu kodującego białko p21 występuje element RXRE, który wiąże RXR. Na podstawie tych obserwacji wskazuje się, że p21 może być celem terapii przeciwnowotworowej (97). RXR α indukował transkrypcję z promotora genu białka p21 znacznie silniej niż RXR β i RXR γ . Wykaza-

no także, że indukowana ekspresja p21 przez RXR spada, gdy ekspresji ulega receptor RAR. RAR, podobnie jak RXR, jest zdolny do aktywacji promotora genu p21, w odpowiedzi na specyficzny ligand.

Retinoidy (RA i ATRA) wpływają także na wzrost ekspresji genu kodującego receptor immunoglobulinowy – pIgR9 (ang. *human polymeric immunoglobulin receptor*). W komórkach HT-29 (ang. *human colonie adenocarcinoma cell line*), traktowanych RA i ATRA, obserwowano wzrost TNF- α oraz RAR α (93).

Retinol hamuje także wzrost komórek jelita: HCT-116 i SW620 opornych na ATRA, poprzez mechanizm niezależny od receptora RAR. W wyniku działania na komórki retinolem spada w nich poziom ekspresji mRNA metaloproteiny – MM-P1, a MMP-2 w linii SW620 oraz MMP-7 i 9 w komórkach HCT-116. Ponadto, obniża się także poziom tych białek, natomiast zwiększa stężenie inhibitora MMP-1 (98). Na podstawie tych danych wskazuje się, jak bardzo zróżnicowany i odmienny jest mechanizm oddziaływania na komórki β -karotenu i jego pochodnych. Mimo przeprowadzonych licznych badań molekularnych mechanizm tych oddziaływań nie został do końca poznany. Jedną z przyczyn jest brak odpowiedniego modelu badawczego.

Linia komórkowa Caco2 – wywodząca się z raka jelita grubego – jest najczęściej stosowanym systemem komórkowym do badań nad transportem nowych leków, składników pokarmowych, ksenobiotyków, jak również nad biodostępnością β -karotenu oraz jego metabolizmem (99-104). Komórki Caco2, mimo że są komórkami pochodzenia nowotworowego, pod względem strukturalnym i funkcjonalnym wykazują duże podobieństwo do prawidłowego nabłonka jelitowego i z tego względu stosuje się je jako komórkowy model jelita w licznych badaniach (101). Zostały one także wykorzystane jako model do badań nad rolą β -karotenoidów zawartych w soku z marchwi na proliferację komórek oraz do analizy ekspresji receptorów dla retinoidów. W tym celu komórki Caco2 traktowano świeżym sokiem z marchwi oraz po odpowiedniej obróbce termicznej i enzymatycznej, zawierającym różne stężenie β -karotenu, a następnie mierzono proliferację komórek, apoptozę oraz ekspresję wszystkich izoform receptorów retinoidowych. Na podstawie wyników badań wykazano, że świeży sok marchwi zawierający β -karoten w stężeniu 0,017-0,195 μ M obniża proliferację komórek CaCo2, co jest spowodowane ich obumieraniem na drodze apoptozy o czym świadczył wzrost aktywności proapoptycznych kaspaz. Z kolei, sok z marchwi zawierający β -karoten w stężeniu wyższym miał efekt odwrotny. Zahamowanie wzrostu komórek oraz ich apoptozę pod wpływem ATRA w innych komórkach linii HCT-15 i Colo21, wywodzących się z raka jelita grubego, stwierdziła także Lee i wsp. (105). W regulację tych procesów zaangażowany jest RAR β , a traktowanie komórek HT-29 1 mM ATRA powodował wzrost poziomu RAR α i RAR γ , ale nie RAR β . Lampen i wsp.(106) w swoich badaniach wskazują na wzrost ekspresji genu *CYP26* w komórkach Caco2 traktowanych ATRA. W regulacji ekspresji tego genu brał raczej udział RAR α niż RAR β . Ponadto, proces ten jest regulowany przez heterodimeryzację RXR/RAR. Wzrost ekspresji RXR α i RXR γ RNA w HT-29 obserwowano po dodaniu do hodowli 9cRA. Palozza i wsp. (107) wykazali, że w ko-

mórkach HT-29 traktowanych β -karotenem indukowana jest synteza kaspaz proapoptycznych oraz dochodzi do spadku poziomu białka BCL-2.

W komórkach Caco2, do których dodano sok z marchwi, zmieniała się także ekspresja poszczególnych izoform receptorów retinoidowych. We wszystkich badanych próbach stwierdzono obniżenie ekspresji receptora RAR α (co najmniej o 50% względem próby kontrolnej), natomiast pięciokrotny wzrost RAR β , RAR γ , spadek RXR α i RXR β oraz brak ekspresji RXR γ . RXR może formować homo-, jak i heterodimery, stanowiąc główny regulator licznych szlaków komórkowych. Jako homodimer, w obecności 9cRA, wiąże się z elementami RXRE w DNA. Oddziaływania te są hamowane przez RAR, który może tworzyć z nim dimer. Z tego względu RXR jest aktywny w odpowiedzi na ligand, jeżeli stosunek RXR/RAR jest wysoki. W formie heterodimeru RXR nie wiąże liganda, a funkcjonuje jedynie jako partner RAR w odpowiedzi na ATRA i 9cRA. Kompleks taki wiąże się z rejonami regulatorowymi promotorów genów zawierających RARE. Ponadto, RXR może tworzyć dodatkowe kompleksy z innymi receptorami, dla których ligandami są witamina D, hormony tarczycy i czynnik odpowiedzialny za proliferację peroksysomów (108). Obniżony poziom receptorów RXR stwierdza się w różnych rakach nabłonkowych. W komórkach prawidłowych ulegają one ekspresji na stałym poziomie, podobnie jak szereg genów odpowiedzialnych za podstawowy metabolizm komórkowy. Ekspresję tę można stymulować podając do hodowli ATRA (109). Zróżnicowany wpływ RA na wzrost komórki oraz funkcjonowanie RAR i receptorów sierocych PPAR β/δ zależy może również od białek wiążących lipidy CRABP-II i FABP5 (110,111). Suruga i wsp. (112) na podstawie wyników badań sugerują, że ekspresja genu *CRBP11* może zachodzić w obecności RXR/PPAR, które wiążą się z jego rejonem promotorowym. Wykazali także, że w komórkach traktowanych retinoidami zmienia się poziom autokrynowego IGF-I oraz białek go wiążących. Dodanie do hodowli komórek Caco2 1 μ M ATRA, po 48 godzinach powodował spadek poziomu IGFBP-2 i IGFBP-6, natomiast przeszło 200-krotny wzrost IGF-BP-6. Sugeruje to, że czynnik ten może być odpowiedzialny za zahamowanie wzrostu komórek pod wpływem ATRA (113). Na podstawie innych danych literaturowych wskazuje się, że RA jest także regulatorem ekspresji IGF-I i IGF-II i może wpływać na różnicowanie oraz funkcjonowanie osteoblastów i kości (114).

Dodatek RA do hodowli osteoblastów powoduje spadek ekspresji IGF-I, natomiast wzrost IGF-II. IGF-1 jest to 70-aminokwasowy peptyd, stymulujący proliferację komórek różnych typów. Białko to jest syntetyzowane głównie w wątrobie i wydzielane do krwiobiegu. Wysoki surowiczy poziom IGF-I obserwowano w nowotworach licznych typów (piersi, płuc, prostaty, jelita grubego) (115,117). Funkcjonowanie IGF-I jest regulowane przez białka je wiążące, przede wszystkim IGF-BP3. Białko to decyduje o biodostępności IGF-I, ma działanie proapoptyczne oraz chroni przed rozwojem nowotworu jelita grubego (114,116).

Ikezoe i wsp. (117) sugerują, że efekt ten zachodzi poprzez wzrost sygnalizacji komórkowej za pośrednictwem RXR/RXR, natomiast spadek RAR/RXR.

Retinoidy (retinol, retinal i RA) wyraźnie hamowały proliferację komórek nabłonkowych stymulowaną przez IGF-I. Przy stężeniu 10 mg/ml proliferacja komórek hamowana była do 71% (118).

4. Podsumowanie

Na podstawie wyników licznych badań wskazuje się na zróżnicowany i bardzo złożony mechanizm aktywności karotenoidów i ich pochodnych – retinoidów w komórce. Związki te wpływają na szereg procesów komórkowych, w wyniku ich bezpośredniego oddziaływania na komórki, jak również za pośrednictwem receptorów retinoidowych, prowadząc do aktywacji lub zahamowania ekspresji określonych genów. Balmer i Blomhoff (119) sugerują, że genów takich jest co najmniej 532 i można je podzielić na 4 grupy. Wśród nich znajdują się geny, których transkrypcja jest regulowana w sposób bezpośredni przez retinoidy, za pośrednictwem specyficznych receptorów retinoidowych, geny białek uczestniczących w metabolizmie RA (*CRABP2*, *ADH1C*), oraz należące do rodziny białek rodopsynowych, zawierające domenę homeo box, tj. *Hoxa 1*, *HOXA 4*, *Cdx 1* czy *Pit 1*, jak również antygenów różnicowania CD38. Zrozumienie sposobu w jaki retinoidy regulują liczne procesy komórkowe ma ważne znaczenie dla terapii retinoidami jak również ich odpowiedniej suplementacji.

β -karoten jak i jego pochodne – retinoidy mogą odmiennie oddziaływać na komórki różnych typów, co zależy nie tylko od ich stężenia, ale również licznych czynników komórkowych z nim współdziałających. Istotną rolę w tym procesie pełnią receptory retinoidowe. O ważnym znaczeniu tych białek w regulacji procesów komórkowych wskazuje ich duża zachowawczość. Zmiany w sekwencji kodującej receptora RAR obserwowano jedynie w białaczkach (120). Analiza poziomu ekspresji izoform tych receptorów w komórkach nowotworowych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi, może być ważnym czynnikiem prognostycznym dla terapii nowotworów retinoidami. Istotne znaczenie w tym procesie ma także stężenie karotenoidów. Wykazano, że β -karoten w stężeniu 1-3 μ M ma korzystne działanie na komórki prawidłowe, natomiast stężenie wyższe jest toksyczne. Ważne znaczenie ma także biodostępność β -karotenu, która zależy od sposobu jego podawania w diecie, oddziaływania z innymi karotenoidami, absorpcji, czasu transportu przez jelita, statusu żywieniowego poszczególnych osobników.

Literatura

1. Nawrot R., Goździcka-Józefiak A., (2002), *Biotechnologia*, 57, 88-101.
2. Burns J., Fraser P. D., Bramley P. M., (2003), *Phytochemistry*, 62, 939-947.
3. Garrett D. A., Faille M. L., Sarma R. J., Draft N., (1999), *J. Nutr. Biochem.*, 10, 573-581.
4. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D., (2004), *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 100-110.

5. Kopsell D. A., Kopsell D. E., (2006), Trends in Plant Sciences, 11, 499-507.
6. Yen S. L., Hu M. L., (2000), J. Nutr. Biochem., 11, 548-554.
7. Den J., van der Wonde H., Alink G. M., Koeman J. H., (2002), Environmental Toxicology and Pharmacology, 11, 321-333.
8. Paiva S. A. R., Russell R. M., (1999), J. Am. Coll. Nutr., 18, 5, 426-433.
9. Kakizoe T., (2003), Jpn. J. Clin. Oncol., 9, 421-442.
10. Palozza P., Calviello G., Serini S., Maggiano N., Lanza P., Ranelletti F. O., Bartoli G. M., (2001), Free Radical Biology & Medicine., 30, 1000-1007.
11. Ben-Dor A., Steiner M., Gheber L., Danilenko M., Dubi N., Linnewiel K., Zick A., Sharoni Y., Levy J., (2005), Mol. Cancer Ther., 1, 177-186.
12. van Poppel G., (1996), Eur. J. Clin. Nutr., 50, 557-560.
13. Russel R. M., (2000), Am. J. Clin. Nutr., 71, 878-884.
14. Romney S. L., Ho G. Y., Palan P. R., (1997), Gynecol. Oncol., 65, 483-492.
15. Perocco P., Paolini M., Mazzullo M., Biagi G. L., Cantelli-Forti G., (1999), Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 440, 83-90.
16. Marshall K. M., (2003), Alternative Medicine Review, 8, 156-170.
17. Alique M., Herrero J. F., Lucio-Cazana J. F., (2007), Journal of Neuroinflammation, 4, 1-9.
18. Pinheiro Sant H. M., Stringheta P. C., Brandao C. C., Cordeiro de Czeredo R. M., (1998), Food Chemistry, 61, 145-151.
19. Pryor N. A., Sthal W., Rock C., (2000), Nutr. Res., 58, 39-53.
20. Zhang P., Omaye P., (2001), Toxicology in Vitro, 15, 13-24.
21. Gonzales der Mejia E., Quintanar-Hernandez J. A. Loarca-Pina G., (1998), Mutation Research, 416, 11-19.
22. Kieć-Wilk B., Dudek W., Dembińska-Kieć A., (2006), Acta Angiol., 4, 141-148.
23. Kensler T. W., (1997), Environ Heath Perspect., 105, 965-970.
24. McDevit R., Tchao R., Harrison E. H., Morel D. W., (2005), J. Nutr., 135, 160-164.
25. Niles R. M., (2000), Nutrition, 16, 573-576.
26. Smith W., Saba N., (2005), Crit. Rev. Oncol. Hematol., 55, 143-152.
27. Chambon P., (1994), Semin. Cell Biol., 5, 115-125.
28. Wu Q., Chen Z., Su W., (2002), International Journal Biochemistry and Cell Biology, 34, 1102-1114.
29. Ohashi E., Miyajima N., Nakagawa T., Takahashi T., Kagechika H., Mochizuki M., Nishimura R., Sasaki N., (2006), J. Vet. Med. Sci., 68, 797-802.
30. Hong S. H., Kadosawa T., Nozaki K., Mochizuki M., Matsunaga S., Nishimura R., Sasaki N., (2000), Am. J. Vet. Res., 61, 69-73.
31. Ohashi E., Hong S. H., Takahashi T., Nakagawa T., Mochizuki M., Nishimura R., Sasaki N., (2001), J. Vet. Med. Sci., 63, 83-86.
32. Myga M., Goździcka-Józefiak A., (2003), *Na pograniczu chemii i biologii*, Wyd. UAM, Poznań, t. VIII, 117-136.
33. Fisher C., Blumenberg M., Tomic-Canic M., (1995), Crit. Rev. Oral Biol. Med., 64, 284-301.
34. Feart C., Vallortigara J., Higuere D., Gattain A., Enderlin V., Higuere P., (2005), Journal of Molecular Endocrinology, 34, 849-858.
35. Desvergne B., Michalik I., Wahli W., (2006), Physiological Reviews, 86, 465-514.
36. Holdener E. E., Bellag W., (1994), Retinoids. Curr. Opin. Oncol., 5, 1059-1066.
37. Moehren U., Eckey M., Baniahmad A., (2004), Essays Biochem., 40, 89-104.
38. Flajollet S., Lefebvre B., Cudejko C., Staels B., Lefebvre P., (2007), Mol. Cell. Endocrinol., 27, 23-32.
39. Privalsky M. L., (2004), Annu. Rev. Physiol., 66, 315-360.
40. Mangelsdorf D., (1994), Nurt. Rev., 52, S32-44.
41. Gronemeyer H., Mitorski R., (2001), Cell. Mol. Biol. Lett., 6, 3-52.
42. Chen J. D., Evans R. M., (1995), Nature, 377, 454-457.
43. Rochette-Egly C., Adams S., Rossingnd M., Egly J. M., Chambon P., (1997), Cell, 90, 97-107.
44. Crove D. L., Kim R., (2002), Cancer Cell International, 2, 1, 15- <http://www.cancerei.com/content/2/1/15>
45. Lee M. O., Kang H. J., (2002), Biol. Pharm. Bull., 25 (10), 1298-1302.

46. Rochette-Egly C., Plassat J. L., Taneja R., Chambon P., (2000), *Molecular Endocrinology*, 14 (19), 1398-1410.
47. Rochette-Egly C., (2003), *Cell Signaling*, 15, 355-366.
48. Shao D., Lazar M. A., (1999), *J. Clin. Invest.*, 103, 1717-1618.
49. Solomona C., White J. H., Kremer R., (1999), *J. Clin. Invest.*, 103, 1729-1735.
50. Desai T. J., Chen F., Lu J., Qian J., Dolle P., Chambon P., Cardoso W. V., (2006), *Dev. Biol.*, 292, 12-24.
51. Zechel C. H., (2005), *Molecular Endocrinology*, 6, 1629-1645.
52. Scribner K. B., Odom D. P., McGrane M. M., (2007), *J. Nutr. Biochem.*, 3, 206-214.
53. Clifford J., Chiba H., Sobieszczuk D., Metzger D., Chambon P., (1996), *EMBO J.*, 15, 4142-4155.
54. Balasubramanian S., Chandraratna R. A., Eckert R. L., (2004), *Carcinogenesis*, 25, 1377-1385.
55. Livera G., Rouiller-Fabre V., Habert R., (2001), *Biology and Reproduction*, 64, 1307-1314.
56. Chen W., Cai S. Y., Xu S., Denson L. A., Soroka C. J., Boyer I. L., (2007), *A. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292, 1222-1227.
57. Suzui M., Shimizu M., Masuda M., Lim J., Yoshimi N., Einstein B., (2004), *Mol. Cancer Ther.*, 3, 309-316.
58. Geissmann F., Revy P., Brousse N., Lepelletier Y., Durandy A., Chambon P., Dy M., (2003), *J. Exp. Med.*, 4, 623-634.
59. Easwaran V., Pishvaian M., Salimuddin N., Byers S., (1999), *Curr. Biol.*, 9, 1415-1418.
60. Xiao J. H., Ghosn C., Hinchman C., Forbes C., Wang J., Snider N., Cordrey A., Zhao Y., Chandvaratna R. A., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 299954-299962.
61. Giller T., Hennes U., Kempen H. J., (1995), *J. Lip. Res.*, 36, 1021-1028.
62. Song S., Lippman S. M., Zou Y., Ye X., Ajani J. A., Xu X. C., (2006), *Oncogene*, 24, 8268-8276.
63. Dillard A. C., Lane M. A., (2007), *Mol. Carcinog.*, 4, 315-329.
64. Napoli J. L., (1996), *FASEB J.*, 10, 993-1001.
65. Nadi L., Murray M., (1999), *Biochem. Pharmacol.*, 58, 1201-1208.
66. Lampen A., Meyer S., Arnhold T., Nau H., (2000), *J. Pharm. Exp. Therap.*, 295, 679-985.
67. Wang X. D., Liu C., Bronson R. T., Smith D. E., Krinsky N. I., Russell M., (1999), *Journal of The National Cancer Institute*, 91, 60-66.
68. Lord R. V., Tsai P. I., Danaenberg K. D., Peters J. H., DeMeester T. R., Tsa-Wei D., Groshen S., Salonga D., Park J., Crookes P. F., Kiyabu M., Chandrasoma P., Danenberg P. V., (2001), *Surgy*, 129, 267-276.
69. Pascussi J. M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Maurel P., Vilarem M. J., (2003), *Biochem. Biophys. Acta*, 1619, 243-253.
70. Fitzgerald P., Teng M., Chandraratna R. A., Heyman R. A., Allegretto E. A., (1997), *Cancer Res.*, 57, 2642-2650.
71. Wang X., Qian D. Z., Ren M., Kato Y., Wei Y., Hang L., Fansler Z., Clark D., Nakanishi Q., (2005), *Clin. Cancer. Res.*, 9, 3535-3542.
72. Klaassen I., Brakenhoff R. H., Smeets S. J., Snow G. B., Braakhuis B. J., (2002), *Int. J. Cancer*, 92, 661-665.
73. Klassen I., Braakhuis B. J., (2002), *Oral Oncology*, 38, 532-542.
74. Xu X. Ch., Mitchell M. F., Silva E., Jetten A., Lotan R., (1999), *Clinical Cancer Research.*, 5, 1503-1508.
75. Blease M. A., Santo-Hoeltje L., Rodemann H. P., (2003), *Strahlenther Onkol.*, 179, 401-409.
76. Thacher S. M., Vasudevan J., Chandraratna R. A. S., (2000), *Current Pharmac. Design.*, 6, 55-58.
77. Chakravarti N., El-Naggar A. K., Lotan R., Anderson J., Diwan A. H., Saadati H. G., Diba R., Prieta V. G., Esmaeli B., (2006), *J. Cutan Pathol.*, 33, 10-17.
78. Virmani A. K., Rathi A., Zochbauer-Muller S., Sacchi N., Fukuyama Y., Bryant D., Maitra A., Heda S., Fong K. M., Thunnissen F., Minna J. D., Gadar A. F., (2000), *J. Natl. Cancer Inst.*, 93, 66-68.
79. Dillard A. C., Lane M. A., (2007), *Mol. Carcinog.*, 4, 315-329.
80. Guo J. M., Xiao B. X., Lou Y. R., Wang D. H., Yan C. H., Zhan L., Zhao W. H., (2006), *Med. Chem.*, 5, 457-461.
81. El-Metwally T. H., Pour P. M., (2007), *J. Pancreas*, 3, 268-278.
82. Arany I., Whitehead W. E., Grattendick J. K., Ember I. A., Tying S. K., (2002), *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 5, 1102-1106.

83. Zhu W. Y., Jones C. S., Amin S., Matsukuma K., Haque M., Vuligonda V., Chandrartna R. A., de Luca L. M., (1999), *Cancer Res.*, 59, 85-90.
84. Ivanova T., Petrenko A., Gritsvo T., Vinokourova S., Eshiler E., Kobzeva V., Kissel'jov T., Kissel'jov N., (2002), *BMC Cancer*, 2, 4, <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/2/4>
85. Lal L., Li Y., Smith J., Sassano A., Uddin S., Parmar S., Tallman M. S., Minucci S., Hay N., Plataniias L. C., (2005), *Neoplasia*, 105, 1669-1677.
86. Licht J. D., Zelent A., (2005), *Neoplasia*, 105, 1381-1382.
87. Naoe T., (2001), *Nagoha J. Med. Sci.*, 64, 103-108.
88. Wu Q., Chen Z., Su W., (2003), *Int. J. Biochem & Cell Biol.*, 34, 112-114.
89. Chattopadhyay N., Butters R. R., Brown E. M., (2001), *Mol. Brain Res.*, 87, 100-108.
90. Robert C., Delva L., Balitrand N., Nahajevszky S., Masszi T., Chomienne Ch., Papp B., (2006), *Cancer Res.*, 66, 6336-6344.
91. Chattopadhyay N., Ray S., Biswas N., Chatterjee A., (1999), *Gyneocologic Oncology*, 75, 215-221.
92. Romero-Sandoval E. A., Alique M., Moreno-Manzano V., Molina C., Lucio F. J., Herrero J. F., (2004), *Inflam Res.*, 53, 297-303.
93. Park E. Y., Wilder E. T., Lane M. A., (2007), *Nutr. Cancer*, 57, 66-77.
94. Alique M., Herrero J. F., Lucio-Cazana F. J., (2007), *Journal of Neuroinflammation* doi:10.1186/1742-2094-4-1
95. Alique M., Lucio-Cazana F. J., Moreno V., Xu Q., Kontra N., Nakayama K., Furusu A., Sepulveda J. C., Kitamura M., (2007), *Pharmacology*, 79, 75-64.
96. Aliguq M., Moreno-Manzano V., Xu Q., Kitamura M., Lucio F. J., (2006), *Br. J. Pharmacol.*, 149, 215-225.
97. Tanaka T., Suh K. S., Lo A. M., de Luca L. M., (2007), *J. Biol. Chem.*, 282, 29987-29997.
98. Furr H. C., Clark R. M., (1997), *Nutrional. Biochemistry*, 8, 364-377.
99. van Breemell R. B., Li Y., (2005), *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, (2005), 2, 175-185.
100. Garrett D. A., Faillo M. L., Sarama R. J., Craft N., (1999), *Nutr. Bioch.*, 10, 573-581.
101. Palozza P., Serini S., Torsello A., Nicuolo F. D., Maggiano N., Ranelletti F. O., Wolf F., Calviello G., (2003), *Nutr. Cancers.*, 47, 76-87.
102. Liu Ch., Glahn R., Liu R., (2004), *J. Agri. Food. Chem.*, 52, 4330-4337.
103. Doring A., Hussain M., Morel D. W., Harrison J., (2002), *J. Lip. Res.*, 43, 1086-1095.
104. Baltes S., Nau H., Lampen A., (2004), *Develop. Growth Differ.*, 46, 503-514.
105. Lee M. O., Han S. Y., Jiang S., Park J. H., Kim S. J., (2000), *Biochem. Pharmacol.*, 59, 485-496.
106. Lampen A., Meyer S., Nau H., (2003), *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 742-747.
107. Palozza P., Serini S., Torsello A., Nicuolo F. D., Maggiano N., Ranelletti F. O., Calviello G., (2003), *Nutr. Cancers.*, 47, 76-87.
108. Willy P. J., Umesono K., Ong E. S., Evans R. M., Heyman R. A., Mangelsdorf D. J., (1995), *Genes&Develop.*, 9, 1033-1045.
109. Li G., Yin W., Chamberlain R., Hewett-Emmett D., Roberts J. N., Yang X., Lippman S. M., Clifford J. L., (2006), *Gene*, 10, 371-327.
110. Schug T. T., Berry D. C., Shaw N. S., Travis S. N., Noy N., (2007), *Cell*, 129, 723-733.
111. Suzuki R., Suruga K., Goda T., Takase S., (1998), *Life Science*, 10, 861-871.
112. Suruga K., Mochizuki K., Suzuki R., Goda T., Takase S., (1999), *Eur. J. Bioch.*, 1, 70-78.
113. Kim E. J., Kang Y. H., Schaffer B. S., Bach L. A., McDonald R. G., Park J. H. Y., (2001), *Journal of Cellular Physiology*, 190, 92-100.
114. Gabbitas B., Canalis E., (1997), *Journal of Cellular Physiology*, 172, 253-264.
115. Pollak M., (2000), *Eur. J. Cancer*, 36, 1224-1228.
116. Jenkins P. J., Khalaf S., Ogunkolade W., McCarthy K., David T., Hands R. E., Davies D., Bustin S. A., (2005), *Endocrine-Related Cancer*, 12, 891-901.
117. Ikezoe T., Tanski S., Krug U., Liu B., Cohen P., Taguchi H., Koeffler H., (2004), *Blood*, 104, 237-242.
118. Purup S., Jansen S. K., Sejrnsen K., (2001), *J. Dairy Res.*, 68, 157-164.
119. Balmer J. E., Blomhoff R., (2002), *J. Lip. Res.*, 43, 1773-1808.
120. Mistry A. R., Pedersen E. W., Solomon E., Grimwade D., (2003), *Blood Reviews*, 17, 71-97.