

Branka Rozman¹, Mirjana Gašperlin², Julijana Kristl³

Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov

*Preventive Effects of Natural Antioxidants
On Ultraviolet – Induced Skin Cancer*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kožni rak, ultravijolično sevanje, oksidativni stres, antioksidanti, učinkovine naravnega izvora

Pogostost nemelanomskega kožnega raka narašča in primarna preventiva, vključno z uporabo varovalnih izdelkov za sončenje, se je pokazala kot neustrezna. Kožni rak je močno povezan s kronično izpostavljenostjo soncu. Ultravijolični B-žarki lahko sprožijo nastanek kožnih tumorjev z neposrednimi poškodbami DNA, mutacijami tumorsupresorskih genov in protoonkogenov, medtem ko ultravijolični A-žarki povzročajo kožnega raka predvsem posredno, preko nastanka reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin, kot so superoksidni anion, hidroksilni radikal, vodikov peroksid, dušikov oksid in drugi. Ultravijolično sevanje povzroča tudi vnetje in imunosupresijo v koži. Članek podaja pregled možnosti preventive kožnega raka s spojinami biogenega in naravnega izvora. Zanimiva možnost zaščite je krepitev endogenega sistema antioksidantov z nanosom na kožo bodisi encimskih bodisi neencimskih antioksidantov. Med pomembnejše encimske antioksidante sodijo glutation peroksidaza, katalaza, superoksid dismutaza in hem oksigenaza, med neencimске pa glutation, vitamina C in E, β -karoten, ubikinon in melanini. Močno antioksidativno delovanje izkazujejo tudi številne spojine, ki se nahajajo v užitnih rastlinah. V slednjo skupino uvrščamo mnoge polifenole, flavonoide in aciklične karotenoide. Nekatere naravne spojine, kot so na primer kurkumin, gingerol ali kapsaicin, sicer niso antioksidanti, vendar dokazano delujejo preventivno pri kožnem raku, saj zavirajo vnetje, mutacije genov in imunosupresijo. Rezultati predkliničnih testiranj naravnih antioksidantov v preventivi kožnega raka so sicer zelo obetajoči, podatki o klinični učinkovitosti pa niso vedno prepričljivi.

ABSTRACT

KEY WORDS: skin cancer, ultraviolet radiation, oxidative stress, antioxidants, active substances of natural origin

The incidence of non-melanoma skin cancer is rising and primary prevention, including the use of sunscreens, has been proven inadequate. Skin cancer strongly correlates with chronic sun exposure. Here we first describe the effects of ultraviolet light on skin: ultraviolet B light can initiate skin tumor development through direct DNA damage and mutation in tumor suppressor and prooncogenes whereas ultraviolet A light is particularly important in causing oxidative stress by inducing reactive oxygen and nitrogen species such as superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide and nitric oxide. Ultraviolet radiation also causes

¹ As. Branka Rozman, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana.

² Izr. prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana.

³ Prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana.

inflammation and immunosuppression in the skin. The possibilities for photoprotection of the skin are reviewed. A preventive strategy to support the endogenous antioxidant system by topical delivery of various enzymes or non-enzymatic antioxidants is described. The most important enzymatic antioxidants are glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase and haem-oxygenase. The representatives of non-enzymatic skin antioxidants are glutathione, α -tocopherol, ascorbate, β -carotene, ubiquinon and melanins. Numerous substances, particularly polyphenols, flavonoids and acyclic carotenoids, derived from nutrient plants demonstrate strong antioxidant activity, too. Some substances of the natural origin such as curcumin, capsaicin and gingerol have also been shown to reduce photocarcinogenesis, not only because of their antioxidant activity but also due to their capacity to prevent inflammation, gene mutation or immunosuppression. Although the results of preclinical studies are very promising, clinical evidence that natural antioxidants prevent skin cancer is not always convincing.

UVOD

Rak je eden najpogostejših vzrokov smrti v razvitem svetu. Z daljšanjem življenjske dobe in večanjem deleža mestnega prebivalstva ter posledičnih sprememb v življenjskem okolju in slogu je pričakovati, da se bo število obolelih še večalo (1). V Avstraliji in v državah zahodne Evrope je pri belopoltnih prebivalcih najpogostejša vrsta raka kožni rak (2). Samo v ZDA odkrijejo vsako leto več kot 700.000 primerov nemelanomskega kožnega raka. Malignega melanoma ne prištevamo h kožnemu raku v ožjem pomenu besede, saj je povezanost nastanka melanoma z izpostavljanjem soncu slabo poznana. Kožni rak se namreč praviloma pojavlja na mestih, izpostavljenih soncu, in danes vemo, da so UV-žarki najpomembnejši etiološki dejavnik kožnih karcinomov. Najpogostejši in klinično najpomembnejši obliki malignega tumorja kože sta bazocelularni karcinom (basal cell carcinoma – BCC), ki predstavlja več kot 80 % vseh kožnih rakov, in spinocelularni karcinom (squamous cell carcinoma – SCC), ki predstavlja približno 16 % malignomov kože (2). Tako pri BCC kot pri SCC pride do preobrazbe celic zarodne plasti kože, vendar je BCC počasi rastoč in redko metastazira, medtem ko je lahko SCC zelo invaziven in pogosto metastazira (3, 4).

Glavni vzrok za nastanek kožnega raka je torej tako pri ljudeh kot pri živalih UV-sevanje. Ultravijolični del svetlobe lahko, glede na valovno dolžino, delimo na tri dele:

- UVA-spekter z valovno dolžino 320–400 nm in energijo okoli 310 kJ/mol predstavlja 90–99 % UV-svetlobe, ki doseže površje

zemlje in je šibek iniciator raka, je pa močan tumor promotor. Prodira globoko v kožo in lahko povzroči tudi poškodbe usnjice.

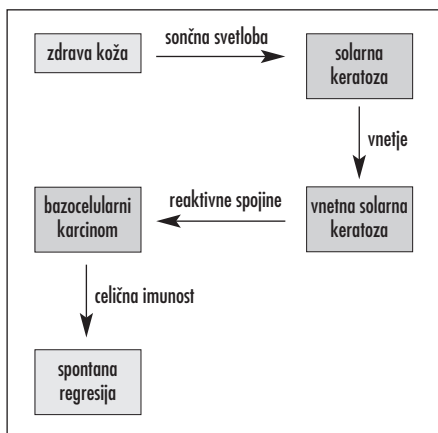
- UVB-spekter z valovno dolžino med 280 in 320 nm predstavlja 1–10 % UV-svetlobe in je najnevarnejši del spektra, saj je močan tumor iniciator, deluje pa tudi kot tumor promotor. Večina UVB-svetlobe se absorbira v pokožnici. Pri ljudeh z občutljivo kožo povzroča blage sončne opekline že po 15 minutah obsevanja.
- UVC-spekter z valovno dolžino 200–280 nm in energijo do 12000 kJ/mol zaradi ozonske plasti praktično ne doseže površja zemlje (4–7).

Učinki UV-žarkov na kožo so odvisni od njihove moči in časa obsevanja. Kratkotrajno izpostavljanje UV-sevanju deluje na kožo ugodno, saj poveča sintezo vitamina D, ki varuje pred genetskimi poškodbami in karcinogenezo. Visoki odmerki UV-sevanja povzročijo smrt celic kože, kar se odraža kot sončne opekline. Kronična izpostavljenost odmerkom UV-sevanja med obema skrajnostima pa:

- povzroča mutacije,
- povzroča vnetja in
- zavira imunski sistem kože,

kar vodi do nastanka kožnega raka – slika 1 (5).

Primarna preventiva, tj. uporaba varovalnih izdelkov za sončenje in nošenje zaščitnih oblačil, se je pokazala kot nezadostna, saj pojavnost kožnega karcinoma, predvsem zaradi pomanjkljive ozaveščenosti ljudi, raste. Rezultati raziskav učinkovitosti izdelkov za sončenje so si nasprotujoči. V nekaterih primerih so celo dokazali, da se po njihovi uporabi



Slika 1. Model razvoja spinocelularnega karcinoma. Sončna svetloba povzroči mutacije genov in imunosupresijo, kar vodi do nastanka benignih lezij solarne keratoze. Če se nadalje razvije vnetje, se v kožo infiltrirajo makrofagi in nevtrofilci, poveča se nastajanje prostih radikalov, kar vodi do preobrazbe benignega tumorja v maligni. V nekaterih primerih se okrepi imunski odziv v koži in tumor se spontano zmanjša (prirejeno po 5).

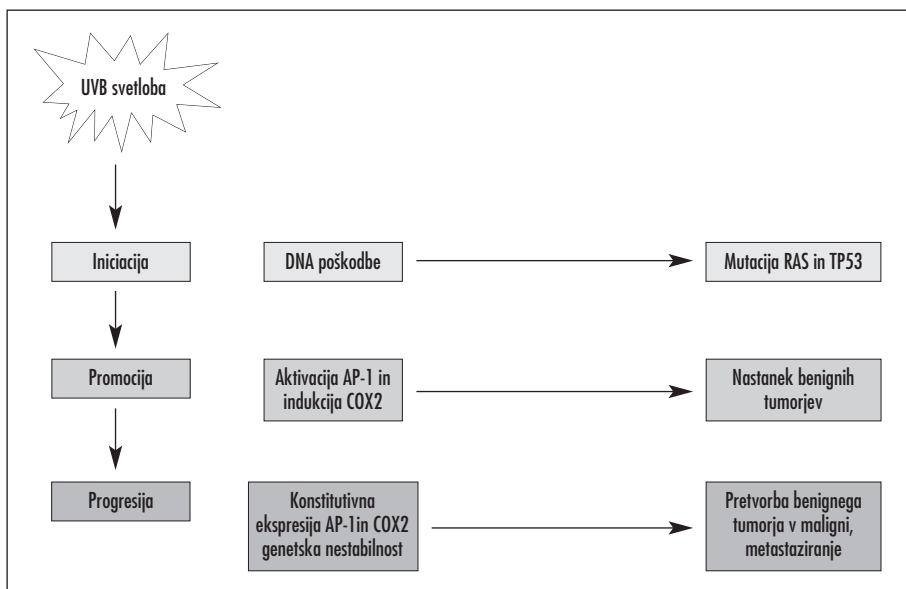
Ljudje dlje izpostavljajo soncu, zato se možnost nastanka raka poveča (4). Nove strategije preprečevanja kožnega raka poudarjajo predvsem osveščanje ljudi o nevarnosti sončnih žarkov in pomen učinkovitejše zaščite kože.

Izredno pomembno je, da pričnemo s preventivnim ravnanjem dovolj zgodaj, saj se bolezen pojavi po letih ali desetletjih delovanja škodljivih dejavnikov (3, 4).

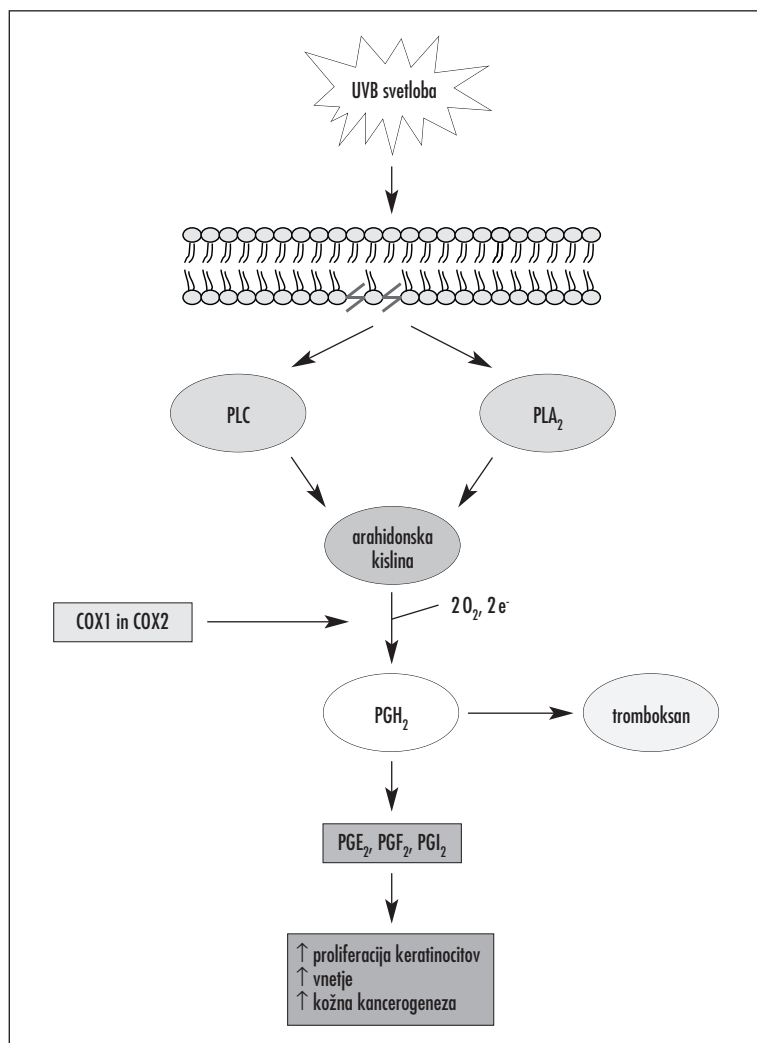
VPLIV ULTRAVIJOLIČNIH ŽARKOV NA NASTANEK IN RAZVOJ KOŽNEGA RAKA

Proces kožne kancerogeneze, ki jo sproži UVB-svetloba, je povzet na sliki 2.

Rast tumorjev je razdeljena v tri dele: iniciacijo, promocijo in progresijo. Za *iniciacijo* je dovolj subkancerogeni odmerek t. i. iniciatorja, ki nepovratno spremeni genski material celic, tako da se te začnejo drugače odzivati na tumor promotorje. UVB-svetloba prodira do bazalne plasti vrhnjice in neposredno povzroča poškodbe DNA, predvsem dimerizacijo timina. V procesu kožne kancerogeneze pride tako že v zgodnji fazi do mutacije tumor supresorskega gena *TP53*. Za razvoj raka so poleg mutacij tumorsupresorskih genov pomembne tudi mutacije proonkogenov, zlasti *RAS*. *Promocija* tumorja je posledica izpostavljenosti tkiva ponavljajočim se odmerkom t. i. promotorja. UVB-svetloba deluje kot tumor promotor predvsem preko



Slika 2. Stopnje kožne kancerogeneze, ki jo sproži UVB-svetloba (prirejeno po 4). *RAS* – proonkogen; *TP53* – tumor supresorski gen; *AP-1* – proteinski aktivator 1; *COX2* – ciklooksigenaza 2.



Slika 3. Vpliv UVB-sevanja na promocijo kožnega raka. COX1 je konstitutiven encim, ki je v nizkih koncentracijah izražen v številnih organih, med drugim tudi v koži, COX2 pa je inducibilen encim, katerega ekspresijo lahko v koži sproži UVB-svetloba (prirejeno po 4). PLC – fosfolipaza C; PLA – fosfolipaza A₂; PGH₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂ – prostaglandini.

aktivacije transkripcijskega faktorja, imenovanega proteinski aktivator 1 (AP-1) in preko izražanja gena za ciklooksigenazo 2 (COX2). AP-1 sproži sintezo matriks metaloproteinaz, citokinov, hem oksigenaze in ornitin dekarboksilaze (ODC). Povečano delovanje matriks metaloproteinaz ima za posledico poškodbe kolagena. Ornitin dekarboksilaza je najpomembnejši encim pri sintezi poliaminov, ki imajo v celicah številne funkcije in so nujno potrebni za rast in razvoj celic. V zdravi celi-

ci sprožijo delovanje ODC, hormoni in rastni faktorji, v tumorskih celicah pa je neprestano aktivna. Sinteza COX2 je verjetno posledica povečane količine arahidonske kisline v celicah, saj UV-svetloba poveča tudi delovanje fosfolipaze A₂. Vzroke in posledice aktivacije COX2 prikazuje slika 3.

V tej fazi nastanejo na koži benigni tumorji, imenovani papilomi. V stopnji *progresije* kožnega raka je AP-1 neprestano aktivirana, COX2 postane konstitutivni encim in posledično

se benigni tumorji preobrazijo v maligne. Maligni tumorji izkazujejo nestabilnost genetskega materiala (spremembe v številu kopij gena, mutacije, premikanje genov idr.) (2, 4, 5, 8, 9).

Medtem ko UVB povzroča neposredno škodo na celicah kože, pa UVA-svetloba povzroča kožnega raka predvsem posredno, preko nastanka reaktivnih spojin (RS – reactive species), ki med drugim povzročajo poškodbo DNA, kar vodi do mutacij in nenormalnega razvoja celic (8).

DEFINICIJA REAKTIVNIH SPOJIN, NJIHOV NASTANEK IN VLOGA PRI RAZVOJU RAKA

Tabela 1 podaja najpogostejše reaktivne spojine. ROS je skupno ime za kisikove radikale in nekatere kisikove spojine, ki sicer niso radikali, vendar se zlahka pretvorijo v radikale in/ali pa delujejo kot oksidanti. Reaktivne dušikove spojine (RNS – reactive nitrogen species) je skupno ime za dušikov oksid, njegove radikale in nekatere neradikalne dušikove spojine. Poleg ROS in RNS sodelujejo pri nastanku raka tudi reaktivne klorove spojine (reactive chlorine species) (6).

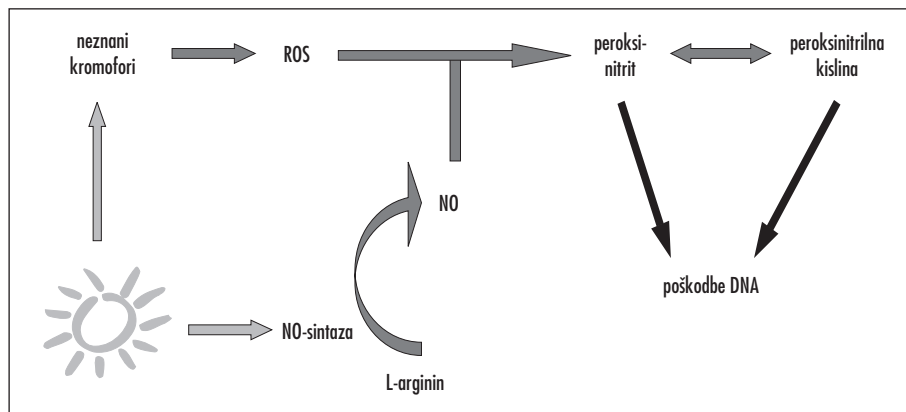
Slika 4 prikazuje učinke UVA-sevanja, ki je glavni vir RS v koži.

Številni kromofori (npr. porfirini, hem, mnogi viri pa so še neraziskani) lahko v prisotnosti UV-svetlobe tvorijo ROS. UVA-sevanje poveča tudi delovanje ksantin oksidaze v keratinocitih, s čimer se poveča količina superoksidnih radikalov. Tako UVA- kot UVB-svetloba

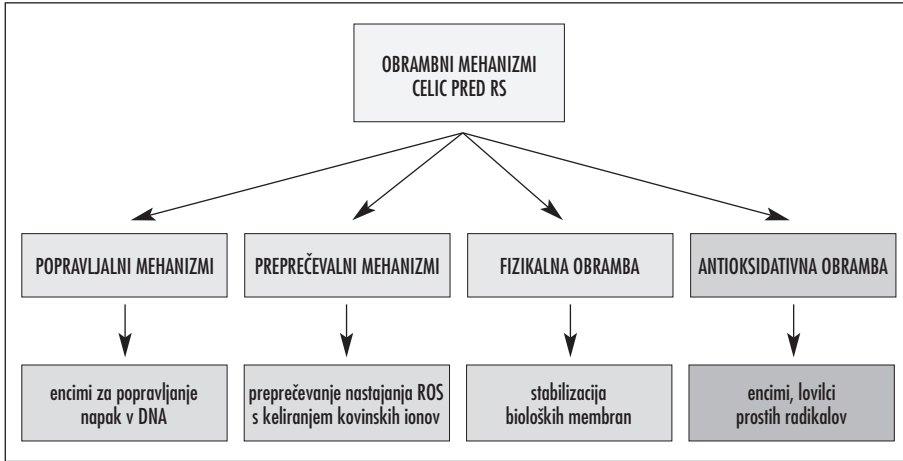
Tabela 1. Radikalne in neradikalne reaktivne spojine (10).

Prosti radikali	Neradikalne reaktivne spojine
Reaktivne kisikove spojine	
Superoksid $O_2^{\cdot-}$	Vodikov peroksid H_2O_2
Hidroksil OH \cdot	Hipoklorna kislina HOCl
Hidroperoksil $HO_2\cdot$	Ozon O_3
Peroksil $RO_2\cdot$	Singletni kisik O_2^1
Alkoksil $RO\cdot$	Organski peroksidi ROOH
Karbonat $CO_3^{\cdot-}$	Peroksinitrit ONOO $^-$
Ogljikov dioksid $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitritna kislina ONOOH
Reaktivne dušikove spojine	
Dušikov oksid NO \cdot	Dušikova (III) kislina HNO_2
Dušikov dioksid $NO_2\cdot$	Nitrozilni kation NO^+
	Nitrozilni anion NO^-
	Didušikov tetroksid N_2O_4
	Didušikov trioksid N_2O_3
	Peroksinitrit ONOO $^-$
	Peroksinitritna kislina ONOOH
	Nitrilni kation NO_2^+
	Alkil peroksinitrit ROONO
	Nitrit klorid NO_2Cl
Reaktivne klorove spojine	
Atomarni klor Cl \cdot	Hipoklorna kislina HOCl
	Nitritni klorid NO_2Cl
	Kloramini
	Molekularni klor Cl_2

aktivirata NO-sintaze (NOS), ki iz L-arginina tvorijo NO. Nastali NO reagira s superoksidom, nastane peroksinitrit, ki je v ravnotežju s peroksinitritno kislino. Obe spojini povzročata



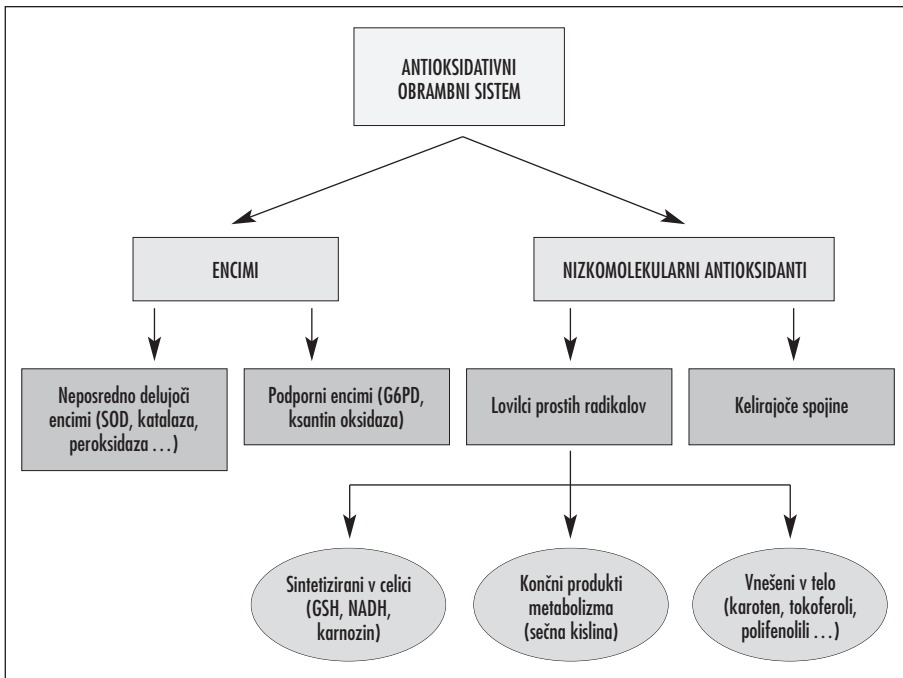
Slika 4. UV-svetloba sproži zaporedje oksidativnih poškodb v koži, kot je razloženo v besedilu (5).



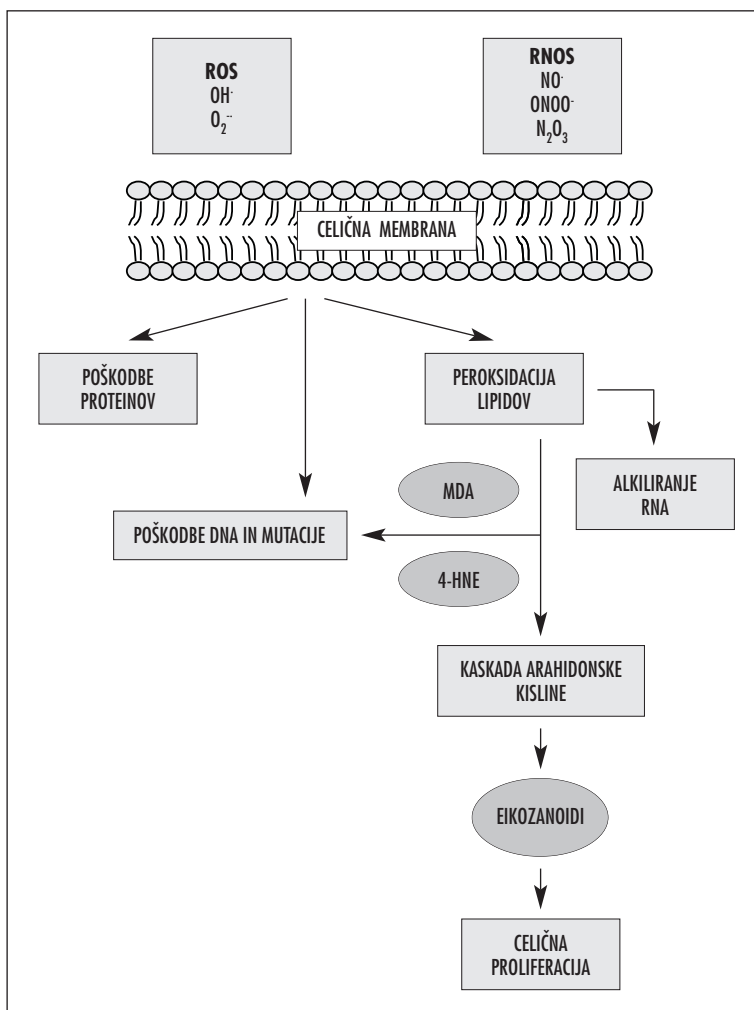
Slika 5 A. Pregled vseh obrambnih mehanizmov celic pred RS s primeri (11).

poškodbe DNA in proteinov ter začetnata peroksidacijo lipidov (8). V keratinocitih nastajajo RS tudi kot odgovor na vnetje, ki ga je sprožila UVB-svetloba. Rezultati raziskav nakazujejo, da UV-žarki sprožijo vdiranje nevtrofilcev in makrofagov v kožo, zaradi česar se poveča količina faktorja tumorske nekroze

(TNF) in interleukina 1 α (IL-1 α), kar še razširi vnetje in nastajanje prostih radikalov, med drugim tudi hipoklorne kisline, ki je močan oksidant. Aktivirani nevtrofilci v koži so tudi vir proteinaz in nekaterih drugih snovi, ki delujejo sinergistično z ROS in povzročajo oksidativne poškodbe celic (7, 8). Nastali



Slika 5 B. Antioksidativni obrambni sistem živih celic (11).



Slika 6. Vpliv reaktivnih spojin na celične makromolekule. MDA (malondialdehid) in 4-HNE (4-hidroksinonenol) sta stranska produkta kaskade arahidonske kisline, ki lahko poškodujeta DNA (povzeto po 12).

prosti radikali lahko preko aktivacije transkripcijskih dejavnikov, ki nadzirajo prepisovanje genov, sodelujočih pri delitvah celic, povečajo celično rast in sprožijo rast tumorja. Tako je na primer raziskovanje mehanizma delovanja ROS pokazalo, da fosforilacija in poliADP-ribozilacija jedrnih proteinov, ki ju sprožijo kisikovi radikali, aktivirata protoonkogen c-FOS (2, 8). Možno je, da prav povečana količina ROS v celicah kože sproži preobrazbo benignega tumorja (npr. solarne keratoze) v maligni (npr. SCC). Imunosupresivno delovanje ROS še raziskujejo, obstaja pa čedalje več pokazateljev, da so tudi

za imunosupresijo v koži, ki omogoča širjenje tumorja, najbolj odgovorni ravno ROS (8).

OBRAMBA TELESA PRED REAKTIVNIMI SPOJINAMI

Prosti radikali nastajajo v organizmu tudi v normalnih fizioloških procesih (npr. v procesu celičnega dihanja), zato je telo razvilo številne obrambne sisteme, ki celice bodisi varujejo pred radikali (jih lovijo ali preprečujejo njihov nastanek) bodisi popravljajo poškodovano DNA, kar prikazujeta sliki 5 A in 5 B.

Pri izpostavitvi kože UV-svetlobi pride poleg povečanega nastajanja prostih radikalov istočasno tudi do zaviranja delovanja pomembnejših encimov, ki odstranjujejo proste radikale. Ko pride do porušanja ravnotežja med nastajanjem radikalov in antioksidativno obrambo v prid prvih, lahko pride do potencialnih poškodb organizma. Tako stanje imenujemo *oksidativni stres*, katerega posledica so *oksidativne poškodbe celic*, ki so podane na sliki 6 (8, 5).

MERJENJE PROSTIH RADIKALOV IN ANTIOKSIDATIVNE SPOSOBNOSTI KOŽE

Da bi lahko ugotovili učinke prostih radikalov na celice, jih je treba znati pravilno določiti. Večina RS je *in vivo* zelo neobstojevnih, zato jih praktično ne morejo neposredno meriti (10). Z razvojem stabilnih nitroksidov sicer lahko z *elektronsko spinsko resonanco (ESR)*, imenovano tudi *elektronska paramagnetna resonanca (EPR)*, na živalih merijo tudi zelo neobstoje RS, vendar metoda zaradi nedokazane varnosti ni primerna za uporabo na ljudeh. Pri ljudeh pa za merjenje RS v splošnem uporabljajo dva pristopa:

- poskušajo »uloviti« RS in nato meriti koncentracije »ujetih molekul«,
- določijo stopnjo oksidativne poškodbe (9, 10).

Prvi pristop uporabljajo predvsem v raziskovalne namene, klinično pa se učinke RS meri posredno, torej preko določanja oksidativnih poškodb. Ko RS zreagira z biološko makromolekulo, nastane nova spojina, ki jo imenujemo biooznačevalec. Biooznačevalci oksidativne poškodbe lipidov so izoprostani, končni produkti peroksidacije polinenasičenih maščobnih kislin. Za ugotavljanje stopnje oksidativne poškodbe DNA najpogosteje določajo 8-hidroksi-2'-deoksivanozin (8OHdG). Najbolj uporabljeni preskus za določevanje oksidativnih poškodb proteinov pa je t. i. karbonilni test, kjer merimo število karbonilnih skupin na proteinih (10). Čeprav pride pri obsežnem oksidativnem stresu do sočasnega porasta številnih biooznačevalcev, pa za določevanje oksidativnega stresa ne zadostuje določitev enega biooznačevalca, saj so mehanizmi odstranjevanja poškodovanih bioloških makromolekul

zelo različni in pri različnih boleznih različno prizadeti (10).

Včasih se za določanje oksidativnega stresa poslužijo tudi drugih pristopov. S pomočjo *ciklične voltametrije*, s katero merimo redukcijske sposobnosti kože, lahko tako ocenimo celokupno antioksidativno učinkovitost lovilcev prostih radikalov v koži (10, 11).

PREPREČEVANJE KOŽNEGA RAKA

Novejše smernice za preventivo kožnega raka izhajajo iz hipoteze, da če so oksidativne poškodbe keratinocitov glavni vzrok za nastanek kožnega raka, potem bi morale ustrezno antioksidativno zdravljenje preprečiti ali vsaj odložiti začetek bolezni. Antioksidativni obrambni sistem kože lahko krepimo z dermalnim dajanjem bioloških antioksidatov ali pa z dajanjem eksogenih spojin, ki delujejo kot lovilci prostih radikalov oz. vzpodbujajo delovanje endogenega sistema (1, 3, 10).

ENDOGENI ANTIOKSIDANTI

Zanimiv pristop k zaščiti pred škodljivimi vplivi svetlobe in razvojem kožnega raka je krepitev endogenega sistema antioksidantov, kar lahko dosežemo z dermalnim dajanjem encimov, ki delujejo antioksidativno. Druga, tudi precej učinkovita možnost fotoprotekcije, pa je dodajanje neencimskih nizkomolekularnih antioksidantov (LMWA – low molecular weight antioksidants – glej sliko 5 B) (10).

Encimski antioksidativni sistem

- Glutation peroksidaza (GSH-Px) katalizira razgradnjo H_2O_2 v lipidnih peroksidov z glutationom. Je najpomembnejši obrambni mehanizem pred UV-poškodbami v koži. Za delovanje omenjenega encima je nujen selen in dokazano je, da pomanjkanje selen na poveča peroksidacijo lipidov v kulturah fibroblastov in verjetnost kožnega raka pri miši. Jemanje selen je smiselno le pred izpostavitvijo soncu, saj se v encim ne more vgraditi posttranslacijsko, za sintezo novih encimov pa je potreben določen čas (11, 14).
- Katalaza (CAT) lovi H_2O_2 v koži. Raziskave dokazujejo, da se delovanje tega encima močno zmanjša po izpostavitvi

kože UV-žarkom, kar je verjetno posledica nepovratne oksidativne poškodbe encima. Ker se CAT v celici nahaja v peroksisomih, lahko dosežemo povečanje njene aktivnosti tudi z uporabo zdravil, ki povečajo njihovo proliferacijo. Proliferacija peroksisomov je eden od stranskih učinkov inhibitorjev HMG-CoA reduktaze (11, 14, 15).

- Superoksid dismutaza (SOD) katalizira pretvorbo superoksidnega radikala v H_2O_2 . V koži se nahaja v dveh oblikah: Cu/Zn-SOD in Mn-SOD. Podobno kot pri CAT se tudi aktivnost tega encima močno zmanjša ob izpostavitvi UV-svetlobi zaradi oksidativne poškodbe. Produkt delovanja SOD je vodikov peroksid, ki je strupen, zato je nujno, da sledi povečanju aktivnosti SOD tudi povečanje aktivnosti GSH-Px in CAT (14, 15).
- Aktivnost hem oksigenaze (HO), ki katalizira razpad hema do dveh močnih antioksidantov, biliverdina in bilirubina, se v nasprotju s prej omenjenimi encimi ob izpostavitvi UV-svetlobi poveča. HO je zlasti pomembna pri zaščiti kože ob kronični izpostavitvi kože majhnim odmerkom UV-svetlobe (14, 15).

Neencimski antioksidativni sistem

- Glutation (GSH) je endogeni tripeptid, ki ima najpomembnejšo vlogo pri obrambi celic pred oksidativnimi poškodbami praktično v vseh tkivih. Deluje neposredno kot lovilce prostih radikalov in tudi kot proton donor za številne druge endogene antioksidante, npr. askorbat. Oksidiran GSH (GSSG) obnovi GSH-reduktaza v reakciji, kjer deluje NADPH kot proton donor. Aktivnost kožne GSH-reduktaze je izjemno visoka, saj lahko obnovi ves v koži prisoten GSH hitreje kot v eni minuti. Zadostna količina GSH v koži je torej nujna za delovanje antioksidativnega sistema kože. Zdravljenje z dermalnimi pripravki z glutationom ni uspešno, saj zaradi velikosti in naboja molekule zelo slabo prehaja v keratinocite. Z uporabo estrov glutatio- na, npr. etilnega, metilnega, izopropilnega, se prehod GSH v celico močno poveča, dokazan je tudi povečan varovalni učinek. Nivo GSH v koži lahko povečajo tudi z dodajanjem substratov za encime, ki

sodelujejo pri sintezi GSH. Najpogosteje dodajajo cistein, ki je omejujoč dejavnik pri sintezi GSH. Ker se le-ta nahaja v obliki ionov dvojčkov in tako zelo težko vstopa v keratinocite, pogosto uporabljajo N- in S-acetil derivate. Derivati se po prihodu v celico metabolizirajo do cisteina. S pomočjo derivatov cisteina pa lahko povečamo raven GSH v celicah le do določene meje. Z naraščajočo koncentracijo GSH v celici je namreč povratno inhibirana γ -glutamilmcistein sintetaza, prvi encim pri sintezi GSH. To inhibicijo lahko obidemo z uporabo γ -glutamilmcisteina, substrata za GSH-sintetazo, ki deluje neodvisno od znotrajcelične koncentracije GSH (14, 15, 17).

- Vitamin E (α -tokoferol, α -TOC), lipofilni endogeni antioksidant, zagotavlja zaščito pred oksidativno poškodbo membran in je dokazano učinkovit pri preprečevanju lipidne peroksidacije in tvorbe tumorjev kože. Omenjeni učinki so bolj izraženi po lokalni kot po sistemski aplikaciji. Njegova aktivnost se z izpostavitvijo soncu zmanjša, saj je molekula na svetlobi nestabilna. Pri razpadu vitamina E na svetlobi se tvorijo tokoferoksilni radikali, ki se odstranjujejo s pomočjo vitamina C in GSH (kar pomeni trošenje drugih antioksidantov), v presežku pa lahko celo povzročijo lipidno peroksidacijo. Temu problemu se lahko izognemo z uporabo bolj stabilnih derivatov vitamina E, kot je α -tokoferol acetat, ki je sicer biološko neaktiven, vendar se v koži počasi hidrolizira. Tako je količina vitamina E v koži le malo višja od fiziološke in presežek deluje varovalno. Ker se oksidiran vitamin E regenerira z vitaminom C, GSH ali β -karotenom, je priporočljivo kombinirano dajanje (5, 8, 14, 15).
- Količina vitamina C (askorbinske kisline) se z izpostavitvijo kože svetlobi zmanjšuje. Raziskave učinkovitosti vitamina C kot fotoprotektanta so si nasprotujoče – v nekaterih študijah so potrdili zaščitno vlogo pred UV-svetlobo, v drugih ne. Zaradi večje stabilnosti sta učinkovitejša njegova derivata askorbat 2-fosfat in askorbilpalmitat. Mehanizem delovanja je dvojen: askorbat neposredno reagira s singletnim kisikom, hidroksilnim radikalom in superoksidnim anionom, hkrati pa sodeluje pri

obnavljanju vitamina E. Pri višjih koncentracijah deluje ob prisotnosti kovinskih ionov prooksidativno (5, 12, 14).

- β -karoten, predhodnik vitamina A in najpomembnejši predstavnik karotenoidnih antioksidantov, dokazano štiti pred z UV-svetlobo induciranim rakom. Lovi singletni kisik in odstranjuje produkte lipidne peroksidacije. Dolgotrajno jemanje, tudi v visokih odmerkih, je relativno neškodljivo (5, 11, 14).
- Melanini: Njihova glavna vloga pri zaščiti kože je absorpcija in sipanje svetlobe, vendar pa eumelanin in njegova prekurzorja 5-S-cisteinildopa (SCD) ter 5,6-dihidroksim-dol (DHI) delujejo tudi kot antioksidanti. Slednja lahko, če sta prisotna v večjih količinah, delujeta tudi prooksidativno. DHI in SCD se nahajata v melanosomih, strukturah, prisotnih le v melanocitih. Ti dve spojini sta, če se nahajata izven melanosomov, zelo strupeni, zato jih ne moremo, vsaj ne v večjih količinah, uporabljati za dermalno uporabo (14).
- Ubikinon (koencim Q), lipofilni antioksidant, ki se nahaja v večini celičnih organel, je učinkovit pri nevtralizaciji različnih radikalov in obnavlja vitamin E. Po nanosu na kožo prehaja v celice kože, zato ga uvrščajo med spojine, ki zmanjšujejo oksidativne poškodbe (14, 15).

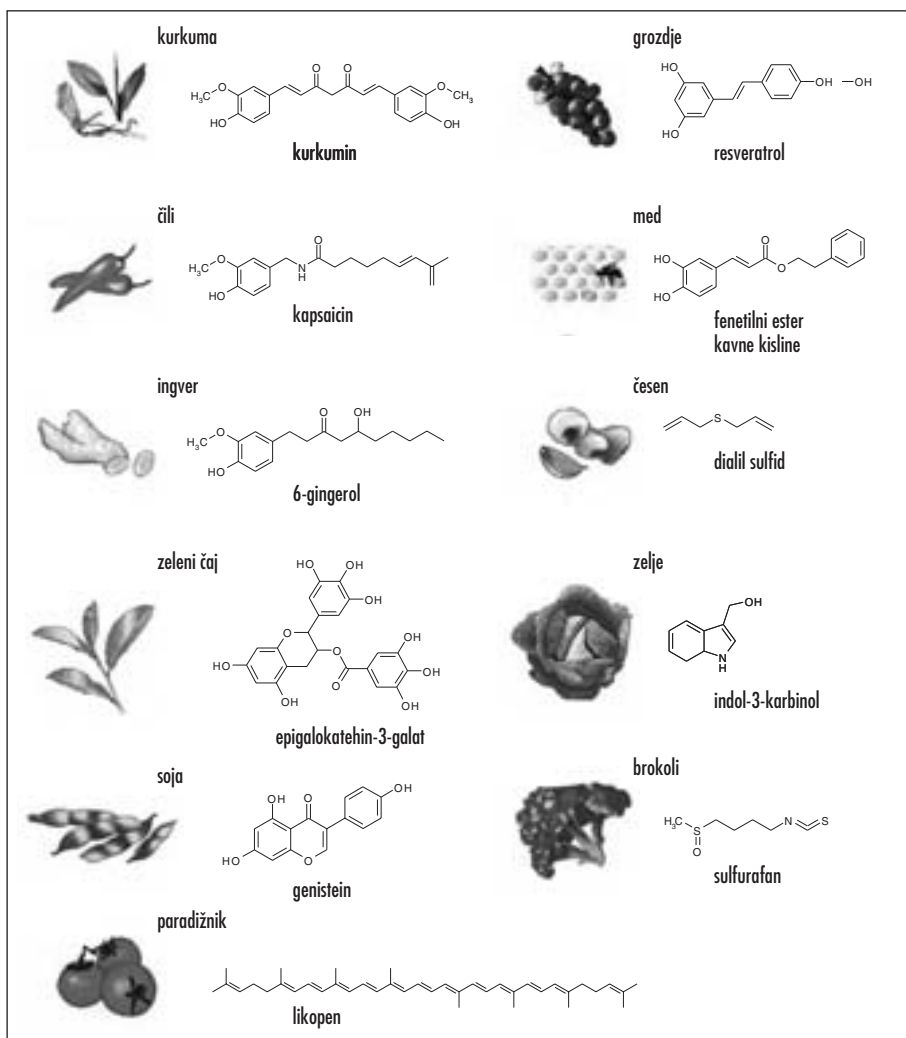
ANTIOKSIDANTI NARAVNEGA IZVORA

Populacijske raziskave so dokazale, da vsebujejo sadje in zelenjava številne antioksidante. Slika 7 prikazuje najpomembnejše učinkovine naravnega izvora, ki preprečujejo nastanek raka in njihove vire (1).

Polifenoli so zelo raznolike učinkovine, ki se nahajajo v sadju, zelenjavi, vinu, čaju, olivnem olju, pridobljenem s hladnim stiskanjem, čokoladi in drugih kakavovih izdelkih. Mnogi polifenoli *in vitro* dokazano delujejo kot antioksidanti, zato so številne učinkine, ki jih izkazujejo *in vivo*, pripisali njihovi redukcijski sposobnosti. Podatkov, da je njihovo delovanje dosti bolj zapleteno, je čedalje več. Poleg neposrednega učinka (lovljenja prostih radikalov) polifenoli najverjetneje delujejo tudi posredno, preko aktivacije endogenih obrambnih sistemov proti raku. Podatki naj-

novejših poskusov kažejo na to, da se na genih, ki kodirajo endogene antioksidante in ki jih inducira oksidativni stres, nahajajo v promotorskem delu t. i. antioksidant responsive elements (ARE), na katerega se lahko vežejo polifenoli. Po tej poti lahko torej polifenoli vzpodbudijo prepisovanje genov za endogene antioksidante in razstrupljevalne obrambne mehanizme (13).

- Resveratrol, glavni antioksidant rdečega vina, preprečuje nastanek raka tudi z zaviranjem aktivacije AP-1 in NF- κ B. NF- κ B je podobno kot AP-1 transkripcijski faktor, posledica njegove aktivacije pa je zaščita poškodovanih celic pred apoptozo in vzpodbujanje delitve malignih celic (1).
- Epigalokatehinalat je polifenol zelenega čaja, katerega učinkovitost pri preprečevanju raka kože je bila dokazana na celičnih kulturah, živalskih modelih in na človeški koži, vendar pa so molekularni mehanizmi njegovega delovanja še vedno nerazjasnjeni. Poleg lovljenja prostih radikalov mu pripisujejo še številne druge učinke. V kulturi keratinocitov je povečal izražanje genov za encime, ki sodelujejo v antioksidativni obrambi – glutation peroksidaze, γ -glutamilcistein sintetaze, hem oksigenaze. V kulturi celic mišje povrhnjice je zaviral maligno preobrazbo celic, najverjetneje preko inhibicije AP-1. Zelo verjetno se vpleta tudi v pot, ki jo sproži NF- κ B. Razvoj kožnega raka naj bi, po rezultatih raziskav na kulturah keratinocitov, preprečeval tudi z vzpodbujanjem diferenciacije keratinocitov (1, 14, 15).
- Enostavni fenoli (hidroksitirozol, tirozol), sekoiridoidi (oleuropein, aglikon ligestrozida) in lignani (pinorezinol in 1-acetoksipinorezinol) so glavne tri skupine antioksidantov olivnega olja, pridobljenega s hladnim stiskanjem. Ker je njihovo antioksidativno delovanje zelo močno izraženo, naj bi uživanje olivnega olja imelo zaščiten učinek tudi proti raku kože. Učinkovitost olivnega olja v preventivi kožnega raka so dokazovali s poskusi na miših. Olje, nanešeno na kožo tik po izpostavitvi UV-sevanju, je zmanjšalo pojavnost kožnega raka, medtem ko isto olje, nanešeno na kožo pred obsevanjem, ni imelo nobenega zaščitnega učinka. Navadno olivno olje se je izkazalo za neučinkovito (1, 16).



Slika 7. Najpomembnejše učinkovine naravnega izvora, ki preprečujejo razvoj raka in njihovi viri (1).

- Polifenolna diterpena karnozol in karnozoična kislina, najznačilnejša predstavnik antioksidantov v rožmarinu, imata dokazano antikancerogeno delovanje. Delujeta kot lovilca prostih radikalov in kot modulatorja ekspresije encimov, ki sodelujejo pri presnovi ksenobiotikov (17).

Silimarín, **flavonoid** izoliran iz pegastega badlja, je močan antioksidant, ki deluje kot lovilec prostih radikalov. Njegova uporaba v zdravljenju jetrnih bolezni je že ustaljena, skupina kanadskih znanstvenikov pa je dokazala pozitiven učinek tudi pri preventivi

kožnega raka. Znano je, da se v keratinocitih kot posledica oksidativnega stresa poveča izražanje receptorja za epidermalni rastni dejavnik (epidermal growth factor receptor – EGFR), kar je eden prvih znakov pospešene celične rasti in razmnoževanja, ki vodi do nastanka novotvorb. V študijah na celičnih kulturah keratinocitov so dokazali, da silimarín z antioksidativnim delovanjem moti pot EGFR, zaradi česar ima varovalno delovanje (18).

Likopen, aciklični karotenoid z 11 konjugiranimi dvojnimi vezmi, je najmočnejši antioksidant med karotenoidi. Nahaja se v paradizniku in nedavno so dokazali, da je dnevno

uživanje paradižnikove mezge v obdobju 10 tednov ščitilo kožo pred z UV-sevanji povzročeni rdečinami (21).

V posamezni rastlini se pogosto nahaja več različnih antioksidantov s sinergističnim delovanjem, zato namesto izolacije posamezne spojine pogosteje pripravljajo izvlečke. Tak primer je izvleček cvetov vrbe *Salix caprea*, ki vsebuje luteolin, kvercetin, dihidrokamferol, katehin in izoramnetin, ki vsi delujejo antioksidativno. Izvleček izkazuje *in vitro* močne antioksidativne sposobnosti, na miškah pa so dokazali tudi njegovo učinkovitost pri preprečevanju kožnega raka (19).

OSTALE UČINKOVINE NARAVNEGA IZVORA

Nekatere učinkovine naravnega izvora sicer ne izkazujejo močnega antioksidativnega delovanja, pa kljub temu preprečujejo nastanek raka. Čeprav za nekatere učinkovine vemo, da delujejo preko neposredne inhibicije ornitin dekarboksilaze in sinteze DNA, pa so mehanizmi delovanja pogosto nepoznani. Običajno delijo te učinkovine v dve skupini:

- snovi, ki preprečujejo nastanek in razvoj maligne novotvorbe (cancer blocking agents) s preprečevanjem:
 - dostopa kancerogenov do tarčnih mest,
 - metabolične aktivacije kancerogenov,
 - interakcije kancerogenov s celičnimi makromolekulami,
- snovi, ki zavirajo maligno transformacijo iniciarnih celic v fazi promocije ali progresije raka (suppressing agents)
 - s sodelovanjem pri popravljanju DNA,
 - s spodbujanjem celične diferenciacije in apoptoze,
 - z uravnavanjem izražanja tumorsupresorskih genov, angiogeneze ... (1, 23).

Delitev zdravilnih učinkovin naravnega izvora na dve skupini se je z novimi dognanji izkazala kot preveč poenostavljena. V resnici je namreč učinek omenjenih naravnih spojin pogosto posledica njihovega delovanja na več mestih v celicah (1). Pomembnejši predstavniki omenjenih spojin:

- Kurkumin, rumeni pigment, ki se nahaja v koreniki rastline *Curcuma longa* in sorodnih vrst, deluje na AP-1 in NF-κB (1).

- Gingerol, fenolni derivat, ki je odgovoren za pikanten okus ingverja, naj bi zaviral promocijo tumorja in delovanje ornitin dekarboksilaze v koži miši (1).
- Kapsaicin, sestavina čilija, naj bi po izsledkih nekaterih študij zaviral razmnoževanje malignih celic melanoma. Druge študije ga nasprotno uvrščajo med kancerogene, saj naj bi na živalih zaradi močno dražečega učinka deloval prokancerogeno (1).

Številni viri navajajo, da je vnetje eden bistvenih vzrokov pri nastanku raka, zato je smiselna tudi uporaba protivnetnih zdravil. Ker povzroča UV-svetloba tudi vnetje preko povečane sinteze PGE₂, je dokazano smiselno jemanje ribjega olja, ki verjetno zmanjša nastajanje PGE₂ (8). Saleem in soavtorji so dokazali, da imajo protitumorno delovanje tudi učinkovine številnih zdravilnih rastlin, ki so sicer znane po svojem protivnetnem delovanju: *Mentha spicata*, *Tephrosia purpurea*, *Cheiranthus cheiri*, *Lawsonia alba*, *Myrica nagi* (23). Nikotinamid, nanešen na kožo, zavira NOS v keratinocitih in tako zmanjšuje nastanek kožnega raka (8).

ZAKLJUČEK

Preventiva ima velik pomen v boju s kožnim rakom. Kljub večjemu ozaveščanju ljudi o nevarnosti UV-sevanja in hitremu razvoju varovalnih izdelkov za sončenje, je pojavnost kožnega raka v porastu. Pričakujemo lahko, da bo v prihodnosti več poudarka na aktivni zaščiti kože z antioksidanti, protivnetnimi učinkovinami in krepitevjo imunskega sistema. Predklinične raziskave jasno nakazujejo učinkovitost naravnih spojin v preventivi kožnega raka, rezultati kliničnih raziskav pa so nekoliko manj prepričljivi, zlasti pri uživanju enega antioksidanta. Možno je, da so odmerki antioksidantov premajhni, da bi lahko le-ti izkazovali učinek v koži, zavedati pa se moramo tudi, da je antioksidantni sistem *in vivo* zelo kompleksen ter da lahko s prekomernim dajanjem le ene spojine še bolj porušimo fiziološko ravnotežje med antioksidanti. Prevelike koncentracije nekaterih antioksidantov lahko delujejo celo prooksidativno. Uporaba učinkovin naravnega izvora kot podpornega zdravljenja v preprečevanju kožnega raka je torej smiselna predvsem, če nanašamo na kožo ustrezno kombinacijo učinkovin.

LITERATURA

1. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Cancer* 2003; 3: 768–80.
2. Ichihashi M, Ahmed NU, Budiyo A et al. Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice. *J Derm Sci* 2000; 23: 45–50.
3. Bratenjević I, Rogl Butina M. Kožni rak – skrajna posledica prekomernega sončenja. In: Kristl J ed. *Koža-sonce-zdravje-lepota*, zbornik referatov. Ljubljana: SFD; 2004. p. 103–9.
4. Bowden GT. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-signalling. *Cancer* 2004; 4: 23–35.
5. Fuchs J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 848–73.
6. Raghavan R, Joseph JC. Ultraviolet and visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis. In: Swarbrick J, Boylan JC, eds. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Vol. 15. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 292–5.
7. Osterwalder U, Herzog B. Designing Broad-Spectrum UV Absorbers. *Cosmet Toil* 2004; 119: 61–8.
8. Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mut Res* 2005; 571: 107–20.
9. Tiberio L, Maier JAM, Schiaffonati L. Down-modulation of c-myc expression by phorbol ester protects CEM T leukaemia cells from starvation-induced apoptosis: role of ornithine decarboxylase and polyamines. *Cell Death Differ* 2001; 8: 967–76.
10. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231–55.
11. Kohen R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation. *Biomed & Pharmacother* 1999; 53: 181–92.
12. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Cancer* 2003; 3: 276–85.
13. Jurković P, Šentjurc M, Gašperlin M, et al. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsion. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; 43: 37–42.
14. Steenvoorden DPT, Beijersbergen van Henegouven GMJ. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol* 1997; 41: 1–10.
15. Manček B, Pečar S. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farm Vest* 2001; 52: 133–44.
16. Fočo A, Gašperlin M, Kristl J. Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. *Int J Pharm* 2005; 291: 21–9.
17. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. V tisku 2005.
18. Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, et al. Inhibition of UV-B mediated activation of nuclear factor κ B in normal human epidermal keratinocytes by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Oncogene* 2003; 22 (7): 1035–44.
19. Eckert RL, Crish JF, Efimova T, et al. Antioxidants regulate normal human keratinocyte differentiation. *Biochem Pharm* 2004; 68: 1125–31.
20. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology* 2000; 1: 107–12.
21. Offord EA, Gautire JC, Avanti O, et al. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1293–303.
22. Ahmad N, Gali H, Javed S, et al. Skin Cancer Chemopreventive Effects of a Flavonoid Antioxidant Silymarin Are Mediated via Impairment of Receptor Tyrosine Kinase Signalling and Perturbation in Cell Cycle Progression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 294–301.
23. Sultana S, Saleem M. Salix caprea inhibits skin carcinogenesis in murine skin: inhibition of oxidative stress, ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis. *J Eth Pharm* 2004; 91: 267–76.

Prispelo 18. 10. 2005