Aktywność przeciwnowotworowa witaminy C

Małgorzata Woźniak, Alicja Bieńkowska, Natalia Stachowiak, Maciej Małecki

Zakład Farmacji Stosowanej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji: Alicja Bieńkowska, Zakład Farmacji Stosowanej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, e-mail: alicja.bienkowska@wum.edu.pl

Anticancer activity of vitamin C · In the recent years, the number of studies related to therapeutic function of vitamin C has been increasing. The interest is visible in experimental research in laboratories, as well as in the wide range of new vitamin C formulations in pharmacy. There is also a growing number of clinical trials in oncology that use vitamin C. In science, it is noticeable to extend both, the therapeutic characteristic of vitamin C and to propose solutions of new pharmaceutical formulation for patients. This study concerns the evaluation of biological activity of vitamin C in relation to cancer cells. Cell line B16-F10 (*melanoma malignum*) and NIH/3T3 (fibroblast) were used. Anticancer activity of vitamin C was assessed both *in vitro* and with the use laboratory animals. The study showed that vitamin C limits the survival of B16-F10 in dose-dependent manner. Furthermore, vitamin C at high doses inhibits tumor angiogenesis *in vivo*.

Keywords: vitamin C, melanoma, angiogenesis.

© Farm Pol, 2018, 74 (6): 380–383

Wprowadzenie

Kwas L-askorbinowy (*Acidum ascorbicum*), szeroko znany jako witamina C, jest pochodną sacharydów. W klasyfikacji chemicznej należy do grupy związków organicznych, jest sześciowęglowym ketolaktonem. W zakresie charakterystyki farmakologicznej witamina C to substancja stała w postaci białego proszku, krystaliczna, bezwonna, o lekko kwaśnym smaku. Jest witaminą z grupy rozpuszczalnych w wodzie [1–3].

Witamina C pełni istotne funkcje biologiczne w organizmach roślinnych, jak i zwierzęcych, jest powszechnie znanym donorem elektronów i wykazuje zdolność neutralizowania reaktywnych form tlenu – posiada zdolność „wymiatania” wolnych rodników, chroni składniki komórkowe przed utlenieniem oraz zmniejsza powstawanie uszkodzeń DNA [3, 4]. Witamina C jest niezbędna do biosyntezy kolagenu, a także posiada właściwości

pobudzania tego procesu. Kolagen w sposób istotny uczestniczy w procesach oddziaływań międzykomórkowych, również w relacji do mechanizmów karcynogenezy i angiogenezy nowotworowej [3, 5]. Angiogeneza – powstawanie nowych naczyń krwionośnych, jest procesem dostrzeganym w warunkach fizjologicznych, jak i w fazie powstawania oraz rozwoju chorób [3, 5, 7, 8]. W przebiegu choroby nowotworowej angiogeneza wynika przede wszystkim z ekspresji/sekrecji czynników proangiogennych przez komórki środowiska nowotworowego. Rozwijająca się sieć naczyń kapilarnych dostarcza tlen i substancje odżywcze do komórek nowotworowych, odprowadza metabolity [7, 9]. Ograniczenie procesu angiogenezy (terapia antyangiogenna) może hamować rozwój nowotworu [10]. Wskazuje się, że wysokie, dożylne dawki witaminy C mogą modulować ekspresję genów antyangiogennych regulujących procesy angiogenezy, a w konsekwencji ograniczyć neowaskularyzację nowotworową i tym samym rozwój nowotworu. W badaniach zwraca się uwagę na geny: *VEGF* (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu), *bFGF* (czynnik wzrostu fibroblastów), *MMP* (metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej) [10–12].

Rozwój prac nad zastosowaniem witaminy C w leczeniu nowotworów wynika z rosnących zainteresowań nad badaniami wzajemnego oddziaływania witaminy C z substancjami leczniczymi stosowanymi w chemioterapii oraz wpływem witaminy C na łagodzenie działań niepożądanych cytostatyków. Publikowane są wielośrodkowe prace wskazujące na zahamowanie rozwoju choroby nowotworowej w powiązaniu z zastosowaniem wysokich dawek witaminy C [13, 14]. Prace kliniczne opisują efektywność zastosowanych protokołów leczniczych, działania niepożądane, wpływ na przebieg chemioterapii, radioterapii [15, 16]. W zakresie prac nad witaminą C badaniami charakteryzującym potencjał terapeutyczny witaminy C towarzyszą

prace związane z opracowywaniem nowych postaci terapeutycznych. Projektowane są nowe formu-
lacje z witaminą C do stosowania zewnętrznego, jak
i wewnętrznego, wzrasta liczba dostępnych posta-
ci farmaceutycznych z witaminą C w aptekach [17].
W zakresie proponowanych dawek dominują pre-
paraty między 100–1000 mg, w zakresie postaci zaś
obecne są głównie kapsułki, tabletki musujące, kro-
ple, proszki, żele i kremy.

Materiały i metody

Hodowla komórek B16–F10 i NIH/3T3

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem ko-
mórek nowotworowych linii B16–F10 (ATCC® CRL-
6475™) i nienowotworowych NIH/3T3 (ATCC®
CRL-1658™). Komórki hodowane były w warun-
kach standardowych, w temperaturze 37°C, wilgot-
ności 95% i w obecności 5% CO₂. Do hodowli linii
zastosowano kompletne podłoże hodowlane DMEM
wzbogacone 10% FBS (płodowa surowica bydlęca).
Komórki pasażowano co 2–3 dni, żywotność i liczbę
komórek określano z wykorzystaniem automatycz-
nego licznika do komórek Countess II FL.

Badanie przeżywalności komórek in vitro – test MTT

Badania wykonano w oparciu o klasyczny test
oceny przeżywalności komórek eksponowanych
na substancje aktywne oparty na pomiarze spek-
trofotometrycznym absorbancji fioletowego roz-
tworu formazanu, produktu redukcji rozpuszczal-
nej w wodzie żółtej soli tetrazolowej (MTT) przez
enzymy oksydoredukcyjne aktywne w żywych ko-
mórkach. Ilość produktu reakcji jest proporcjonal-
na do liczby żywych i aktywnych metabolicznie
komórek w próbie. Komórki wysiewano na płyt-
kach 24-dółkowych w liczbie 7000/500 µl pożywki
dla komórek linii komórkowej B16–F10, i w liczbie
5000/500 µl pożywki dla komórek linii NIH/3T3.
Po 24-godzinnej hodowli, usuwano podłoże i zastę-
powano podłożem z odpowiednimi stężeniami wi-
tamin C. Badania wykonano w oparciu o preparaty
uzyskane po rozcieńczeniu wyjściowego stoku wi-
tamin C (Teva, 100 mg/ml). Zastosowano stężenia
w zakresie od 0,085 mg/ml do 16,6 mg/ml w pod-
łożu zgodnym z użytym do hodowli linii komór-
kowych. Komórki inkubowano przez 72 godziny
w temp. 37°C. Po inkubacji podłoże usuwano, mo-
nowarstwę komórek przemywano dwukrotnie ja-
łowym sterylnym PBS (buforowany roztwór soli),
w ilości 500 µl/dółek i do każdej studzienki do-
dawano po 500 µl roztworu MTT w RPMI-1640
(podłoże hodowlane), bez czerwieni fenolowej,
o stężeniu 0,5 mg/ml. Hodowlę inkubowano przez
3 godziny w standardowych warunkach (w temp.
37°C, 95% wilgotności i w obecności 5% CO₂). Po

inkubacji do każdej studzienki dodawano po 500 µl
alkoholu izopropylowego w celu rozpuszczenia
kryształów formazanu. Przed oznaczeniem płytkę
umieszczano na wstrząsarce (160 rpm) na pół go-
dziny w celu dokładnego rozpuszczenia kryształów
formazanu. Żywotność określano, odnosząc warto-
ści absorbancji do wartości komórek kontrolnych;
przyjmując absorbancję roztworu dla komórek kon-
trolnych za 100%. Pomiaru dokonywano przy uży-
ciu czytnika płytek BioTek™ Epoch™ przy długości
fali w zakresie 540–690 nm. Od wartości odczy-
tów dla długości 540 nm odjęto wartości odczytów
dla tła (690 nm) i obliczono liczbę żywych komór-
rek. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ±
odchylenie standardowe z co najmniej trzech prób.

Test skórnej angiogenezy

Do badań wykorzystano 6–8 tygodnio-
we myszy C57BL/6J (samce). Badanie wykona-
no w oparciu o zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej
w Warszawie (Uchwała nr 163/2016). Zwierzęta
usypiano 3,6% roztworem wodzianu chlorału i go-
lono po obu bokach. Następnie wykonano śród-
skórne iniekcje komórek B16–F10 eksponowanych
i nieeksponowanych na witaminę C. Podawano na-
stępujące preparaty: C ↓ – witamina C w dawce
1 mg / 0,1 ml 0,9% roztworu NaCl / punkt iniek-
cyjny; B16 – kontrolne komórki B16–F10 w liczbie
5×10⁵ / 0,1 ml 0,9% roztworu NaCl / punkt iniek-
cyjny; B16+C ↓ – komórki B16–F10 w liczbie 5×10⁵
+ witamina C w dawce 1,0 mg / 0,1 ml 0,9% roz-
tworu NaCl / punkt iniekcji; B16+C ↑ – komór-
ki B16–F10 w liczbie 5×10⁵ + witamina C w dawce
3,0 mg / 0,1 ml 0,9% roztworu NaCl / punkt iniek-
cyjny; 0,1 ml 0,9% roztworu NaCl / punkt iniekcyj-
ny. W celu ułatwienia wizualizacji miejsca wstrzyk-
nięcia, preparaty podbarwiano 0,1% roztworem
błękitu trypanu. Po 72 godzinach zwierzęta uspio-
no mieszaniną pentobarbitalu i pentobarbitalu sodowe-
go, a miejsca wstrzyknięcia analizowano pod lupą
laboratoryjną (32×) – liczono nowe naczynia zgod-
nie z kryteriami zaproponowanymi przez Sidky’ego
i Auerbacha [18]. Wyniki podano w postaci warto-
ści średnich i odchylenia standardowego (SD) uży-
skanych z 15–30 punktów pomiarowych. Analizę
statystyczną wykonano z użyciem programu Gra-
phPad Prism 7; różnice między badanymi grupami
znamiennie statystycznie przyjęto dla p<0,05.

Wyniki

Ocena wpływu witamin C na przeżywalność komórek linii komórkowych B16–F10 i NIH/3T3 in vitro – wyniki testu MTT

Do badań wykorzystano komórki nowotwo-
rowe linii B16–F10 (*melanoma malignum*) oraz

Rycina 1. Przeżywalność komórek linii B16-F10 eksponowanych na witaminę C. Wyniki testu MTT. Stężenie [mg/ml] witaminy C w medium hodowlanym. K-0 – kontrola, komórki nieeksponowane na witaminę C (100% przeżywalność)

Rycina 2. Przeżywalność komórek linii NIH/3T3 eksponowanych na witaminę C. Wyniki testu MTT. Stężenie [mg/ml] witaminy C w medium hodowlanym. K-0 – kontrola, komórki nieeksponowane na witaminę C (100% przeżywalność)

Rycina 3. Wpływ preparatów witaminy C na proces angiogenezy *in vivo* w skórze myszy. Zastosowano preparat stymulujący angiogenezę – komórki nowotworowe B16-F10 oraz preparaty komórek B16-F10 wzbogacone małą (1,0 mg, B16+C↓) i dużą dawką witaminy C (3,0 mg, B16+C↑). Wyniki są istotnie statystycznie ($p < 0,0001$)

nienowotworowe linii NIH/3T3 (fibroblasty) eksponowane na preparaty witaminy C. Przeżywalność komórek oceniano za pomocą testu MTT. W badaniach stosowano preparaty witaminy C w zakresie stężeń od 0,0425 mg/ml do 8,3 mg/ml. Wyniki przedstawiono na **rycinach 1 i 2**. Badania wykazały, że ze wzrostem stężenia witaminy C w medium hodowlanym spada przeżywalność komórek. Dla komórek nowotworowych B16-F10 najwyższy spadek przeżywalności odnotowano dla stężenia 0,85 mg/ml, dla komórek nienowotworowych NIH/3T3 dla stężenia 0,725 mg/ml. Na wykresach zaznaczono stężenia o najwyższej aktywności.

Ocena aktywności antyangiogennej witaminy C w teście skórnej angiogenezy

Wyniki badań odpowiedzi komórek na witaminę C *in vivo* przedstawia **rycina 3**. W badaniach wykorzystano preparaty komórkowe B16-F10 oraz B16-F10 wzbogacone zdefiniowanymi dawkami witaminy C. Poziom kontrolny dla 0,9% roztworu NaCl lub preparatu witaminy C wynosił mniej niż 4 naczynia w obszarze liczenia (punkt). Zastosowane preparaty komórkowe stymulują procesy powstawania nowych naczyń krwionośnych w skórze myszy. Podanie śródskórnie 5×10^5 komórek nowotworowych B16-F10 powoduje powstanie po 4 dniach średnio 12 nowych naczyń krwionośnych (**rycina 3**). Po zastosowaniu preparatu komórkowego B16-F10 wzbogaconego w dużą dawkę witaminy C (3,0 mg) liczba powstałych naczyń jest niższa o ok. 50% (**rycina 3**), wynik jest istotnie statystycznie ($p < 0,0001$, test Dunnett). Jak pokazuje **rycina 3**, śródskórne podanie komórek B16-F10 łącznie z małą dawką witaminy C (1,0 mg) powoduje wzrost o ok. 40% w stosunku do preparatu B16-F10. Przeprowadzone badania pozwalają wnioskować, iż aktywność biologiczna (proangiogenna/antyangiogenna) witaminy C zależna jest od dawki kwasu askorbinowego. Hamujący efekt przeciwnowotworowy – antyangiogeny (znoszący proangiogenną aktywność komórek B16-F10) obserwowany był przy wysokich dawkach witaminy C.

Dyskusja i wnioski

W pracy przeprowadzono ocenę aktywności biologicznej witaminy C w stosunku do komórek wybranych linii komórkowych, nowotworowych i nienowotworowych. Wykonano badania w warunkach *in vitro*, jak i z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych. Uzyskane wyniki wskazują, iż witamina C posiada właściwości przeciwnowotworowe; w miarę wzrostu zastosowanych stężeń witaminy C przeżywalność komórek nowotworowych B16-F10, jak i fibroblastów NIH/3T3 malała. Wyniki przedstawiają **ryciny 1 i 2**.

Kwas askorbinowy wobec linii B16–F10 ogranicza przeżywalność komórek w zakresie stężeń od 0,425 mg/ml do 1,0 mg/ml. Największy spadek przeżywalności zaobserwowano przy stężeniu 0,85 mg/ml. Warto jednocześnie zwrócić uwagę, że dawki 0,17 mg/ml i 0,2125 mg/ml powodowały wzrost przeżywalności komórek czerniaka (**rycina 1**). Wykazano również, że w stosunku do nienowotworowych komórek linii NIH/3T3 witamina C wykazuje aktywność antyproliferacyjną, ale w zakresie niższych stężeń (od 0,2125 mg/ml do 1,0 mg/ml; **rycina 2**). Największy spadek przeżywalności obserwuje się przy stężeniu 0,725 mg/ml (**rycina 2**). Z przedstawionych danych wynika, że komórki nienowotworowe są wrażliwsze na antyproliferacyjną aktywność witaminy C w porównaniu do linii komórkowej B16–F10; zauważono również, że kwas askorbinowy w niskich stężeniach (**rycina 1**) może zwiększać przeżywalność komórek nowotworowych *in vitro*.

W niniejszej pracy podjęto również próbę charakteryzowania w warunkach *in vivo* aktywności przeciwnowotworowej (przeciwiangiogennej) kwasu askorbinowego. Badania wykonano z udziałem myszy laboratoryjnych C57BL/6J, na modelu angiogenezy nowotworowej B16–F10. Powszechnie wiadomo, że angiogeneza w sposób kluczowy determinuje rozwój wielu typów nowotworów [7–10]. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że witamina C ogranicza stymulację angiogenezy przez komórki nowotworowe B16–F10 (**rycina 3**). Po zastosowaniu dużej dawki witaminy C zauważono spadek o ok. 50% liczby nowych naczyń krwionośnych indukowanych w skórze myszy. Ciekawe, że przy zastosowaniu niskiej dawki witaminy C obserwowano wzrost liczby nowych naczyń krwionośnych w skórze myszy (**rycina 3**), co wydaje się być zbieżne z wynikami badań nad rolą witaminy C w procesach modelowania funkcją białek macierzy zewnątrzkomórkowych, w tym głównie z rodziny kolagenów [19].

Prowadzone obecnie przez wiele ośrodków badawczych na świecie prace kliniczne wskazują na efektywność terapeutyczną (przeciwnowotworową) witaminy C w zakresie dużych stężeń witaminy C osiaganych we krwi pacjentów [13, 20]. W badaniach klinicznych promowane są postaci dożylnie. Stężenie witaminy C u ludzi po podaniu dożylnym jest około 200 razy większe niż po podaniu doustnym [5]. Wyniki badań otrzymane w niniejszej pracy są zbieżne z danymi klinicznymi. Praca wnosi, iż witamina C może mieć również istotne znaczenie w stosunku do nowotworów skóry (czerniak) jako przeciwnowotworowy środek wspomagający

leczenie onkologiczne, głównie na zasadzie ograniczania funkcji proangiogennej komórek nowotworowych i środowiska okolonowotworowego. Niezbędne są dalsze badania nad precyzowaniem aktywności przeciwnowotworowej witaminy C, definiowaniem molekularnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej witaminy C, np. na poziomie ekspresji genów. Konieczne jest również prowadzenie intensywnych badań w kierunku opracowywania nowoczesnych, efektywnych formułacji farmaceutycznych zwiększających dostępność witaminy C dla pacjentów.

Otrzymano: 2018.05.15 · Zaakceptowano: 2018.06.13

Piśmiennictwo

1. Moszczyński P., Pyć R.: Biochemia witamin. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy. Część II. Warszawa: Wydawnictwo naukowe PWN, 1999: 112–136.
2. Farmakopea Polska XI. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, 2017.
3. Janda K., Kasprzak M., Wolska J.: Witamina C – budowa, właściwości, funkcje i występowanie. *Pom J Life Sci.* 2015, 61(4): 419–425.
4. Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M.: Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003, 22: 18–35.
5. Szymańska -Pasternak J., Janicka A., Bo-ber J.: Witamina C jako oręż w walce z rakiem. *Onkol Prakt Klin.* 2014, 7(1): 9–23.
6. Jones D.T., Trowbridge I.S., Harris A.L.: Effects of transferrin receptor blockade on cancer cell proliferation and hypoxia-inducible factor function and their differential regulation by ascorbate. *Cancer Res.* 2006, 66: 2749–2756.
7. Szala S.: Komórki mikrośrodowiska nowotworowego; cel terapii przeciwnowotworowej. *Nowotwory.* 2007, 57: 633–645.
8. Kurzyk A.: Angiogeneza – możliwości, problemy, perspektywy. *Post Bioch.* 2015, 61(1): 25–34.
9. Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971, 285: 1182–1186.
10. Malecki M., Kolsut P., Proczka R.: Angiogenic and antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther.* 2005, 12: 59–69.
11. Chung A.S., Lee J., Ferrara N.: Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2010, 10: 505–514.
12. Dvorac H.F.: Tumours: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986, 315: 1650–1659.
13. Padayatty S.J., Riordan H.D., Hewitt S.M., Katz A., Hoffer L.J., Levine M.: Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ.* 2006, 174: 937–942.
14. Ernst E., Cassileth B.R.: The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: a systematic review. *Cancer.* 1998, 83(4): 777–782.
15. Cameron E., Campbell A.: The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem Biol Interact.* 1974, 9: 285–315.
16. Ma Y., Chapman J., Levine M., Polireddy K., Drisko J., Chen Q.: High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Sci Transl Med.* 2014, 6: 222ra218.
17. Sheraz M.A., Ahmed S., Ahmad I., Shaikh R.H., Vaid F.H.M., Iqbal K.: Formulation and stability of ascorbic acid in topical preparations. *Sys Rev Pharm.* 2011, 2: 86–90.
18. Sidky Y.A., Auerbach R.: Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-vs-host reaction. *J Exp Med.* 1975, 141: 1084–1100.
19. D'Aniello C., Cermola F., Patriarca E.J., Minchiotti G.: Vitamin C in stem cell biology: impact on extracellular matrix homeostasis and epigenetics. *Stem Cells Int.* 2017, 2017: 8936156.
20. Wilson M.K., Baguley B.C., Wall C., Jameson M.B., Findlay M.P.: Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2014, 10(1): 22–37.