

MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA WITAMINY C

MOLECULAR MECHANISMS OF VITAMIN C

Tomasz DZIKI

Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Streszczenie: Od czasu odkrycia witaminy C, liczba jej poznanych molekularnych mechanizmów działania stale się powiększa. Wszystkie znane fizjologiczne funkcje askorbinianu są związane z jego działaniem jako dawcy elektronów. Witamina C neutralizuje reaktywne formy tlenu i w ten sposób może chronić przed powstawaniem uszkodzeń oksydacyjnych ważne makrocząsteczki, takie jak lipidy, DNA i białka. Askorbinian jest istotnym kofaktorem dla wielu enzymów. Przykładem są hydroksylazy prolinowe, które biorą udział w potranslacyjnych modyfikacjach kolagenu oraz degradacji czynnika transkrypcyjnego indukowany hipoksją 1α , który reguluje aktywność wielu genów, odpowiedzialnych za wzrost nowotworu, bilans energetyczny komórki, funkcjonowanie neutrofilii i apoptozę. Niniejsza praca ukazuje biochemiczną naturę askorbinianu, związaną zarówno z jego właściwościami antyoksydacyjnymi, jak i pro-oksydacyjnymi oraz skupia się na jego roli w utrzymywaniu homeostazy redoks w kompartmentach komórkowych, włączając w to błonę komórkową, mitochondria i retikulum endoplazmatyczne. Dodatkowo, moim celem jest próba podsumowania niedawno odkrytych funkcji witaminy C, w szczególności w dealkilacji kwasów nukleinowych i deglikacji proteoglikanów oraz zaakcentowanie, że askorbinian posiada zdolność modulacji ekspresji genów i może korzystnie wpływać na funkcjonowanie układu odpornościowego.

Słowa kluczowe: kwas askorbinowy, reaktywne formy tlenu, hydroksylacja, glipikany, ekspresja genów, immunomodulacja

Summary: Since the discovery of vitamin C, the number of its known molecular mechanisms of action is incessantly expanding. All known physiological functions of ascorbate are due to its action as an electron donor. Vitamin C scavenges reactive oxygen species and may, thereby, prevent oxidative damage to important biological macromolecules, such as lipids, DNA and proteins. Ascorbate is an essential cofactor for various enzymes. Examples are prolyl hydroxylases, which play a role in post-translational modifications of collagen and in down-regulation of hypoxia-inducible factor 1α , a transcription factor that regulates many genes responsible for tumor growth, energy metabolism, neutrophil function and apoptosis. This review shows that the biochemical nature of ascorbate contribute to its antioxidant as well as its prooxidant properties and focuses on its role in the redox homeostasis of cellular com-

partments including cell membrane, mitochondria and endoplasmic reticulum. Furthermore, my aim in this paper is to summarize recently discovered functions of vitamin C in nucleic acid dealkylation and proteoglycan deglycanation and emphasize that ascorbate is able to modulate gene expression and has the positive effect on the immune system.

Key words: ascorbic acid, reactive oxygen species, hydroxylation, glypicans, gene expression, immunomodulation

Wykaz stosowanych skrótów: **•OH** – rodnik hydroksylowy; **AA** – kwas askorbinowy; **Asc•** – rodnik askorbylowy; **AscH•** – askorbinan; **CMT-1a** – choroba Charcota-Mariego-Tootha typu 1a; **DHA** – kwas dehydroaskorbinowy; **DOPA** – dihydroksyfenyloalanina; **EGF** – nabłonkowy czynnik wzrostu; **FIH-1** – czynnik hamujący HIF-1; **GLO** – oksydaza L-gulonolaktonowa; **GLUT** – transporter glukozy; **GSH** – glutation; **H₂O₂** – nadtlenek wodoru; **HIF-1α** – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją 1α; **HRE** – element odpowiedzi na hipoksję; **L•** – rodnik alkilowy; **LA** – kwas α-liponowy; **LH** – wielonienasycony kwas tłuszczowy; **LOO•** – wolny rodnik nadtlenkowy; **LOOH** – nadtlenek kwasu tłuszczowego; **MDA** – dialdehyd malonowy; **mtDNA** – mitochondrialny DNA; **NO** – tlenek azotu; **PDIs** – disulfidoizomerazy białek; **PHDs** – hydroksylazy prolinowe; **pVHL** – białko promotorowe transformacji nowotworowej; **RNS** – reaktywne formy azotu; **ROS** – reaktywne formy tlenu; **SVCT** – zależny od Na⁺ transporter witaminy C

WSTĘP

Witamina C została po raz pierwszy wyodrębniona z owoców i jarzyn oraz zidentyfikowana jako identyczna z kwasem heksuronowym w 1928 roku przez węgierskiego biochemika i noblistę Alberta Szent-Györgyi. Następnie, w roku 1932 Charles Glen King i William Waugh wyizolowali witaminę C w czystej, krystalicznej postaci z soku cytryny jako substancję antyszkorbutową (łac. *scorbutus*). Rok później, Walter Norman Howarth zsyntetyzował krystaliczną postać witaminy C, jeden z najpopularniejszych suplementów diety na świecie [4, 5, 46].

W 80 lat od wyizolowania witaminy C, liczba jej funkcji biologicznych stale się powiększa. Nadal, pomimo upływu wielu dekad, jej znaczenie w przebiegu procesów *in vivo* nie zostało w pełni wyjaśnione. Do całkowitego zrozumienia roli witaminy C w organizmie człowieka, niezbędne jest poznanie niekiedy bardzo złożonych, molekularnych mechanizmów jej działania. Celem pracy jest próba całościowego przedstawienia aktualnego stanu wiedzy na temat molekularnych mechanizmów, w które zaangażowana jest ta witamina.

SYNTEZA KWASU ASKORBINOWEGO

Witamina C (C₆H₈O₆; 2,3-dihydro-L-treo-heksono-1,4-lakton) jest powszechnie określana jako kwas askorbinowy (AA). Jest to forma enolowa γ-laktonu kwasu 3-ke-to-L-gulonowego. Większość roślin i zwierząt syntetyzuje kwas askorbinowy z D-glukozy lub D-galaktozy. Ludzie i inne naczelne, świnki morskie i kilka gatunków

jedzących owoce nietoperzy nie potrafi syntetyzować kwasu askorbinowego, ponieważ nie funkcjonuje u nich gen kodujący oksydazę L-gulonolaktonową (GLO), katalizującą przekształcenie L-gulono- γ -laktonu w kwas L-askorbinowy. Człowiek jest całkowicie zależny od kwasu askorbinowego, zawartego w świeżych owocach i warzywach oraz preparatach syntetycznych [5, 16, 36, 37, 69].

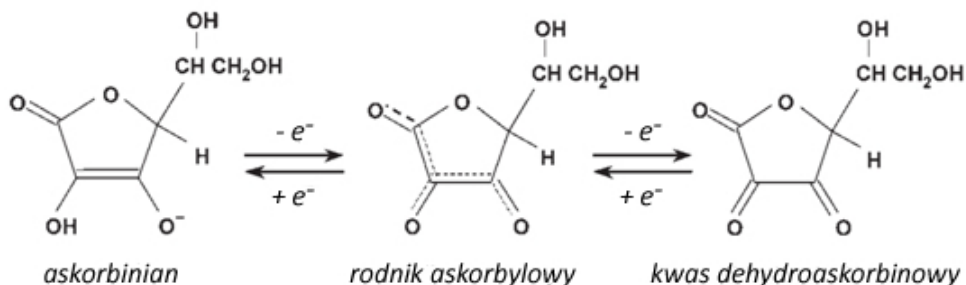
DOŚTĘPNOŚĆ I TRANSPORT WITAMINY C

Witamina C jest rozpuszczalna w wodzie i dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego. Średni poziom witaminy C w osoczu wynosi 50-60 μM u osób zdrowych, dobrze odżywionych i niepalących. Stężenie witaminy C w osoczu może być zwiększone do 100 μM poprzez zastosowanie długotrwałej diety wegetariańskiej oraz doustnych suplementów diety [46].

W warunkach fizjologicznych, witamina C występuje głównie w formie zredukowanej jako kwas askorbinowy oraz w śladowych ilościach, w postaci utlenionej jako kwas dehydroaskorbinowy (DHA). Istnieją dwa odrębne mechanizmy odpowiedzialne za transport witaminy C do komórki [34, 36]. Uniwersalnym systemem transportu witaminy C, obecnym we wszystkich komórkach, jest dyfuzja ułatwiona kwasu dehydroaskorbinowego, przebiegająca z udziałem kilku izoform transportera glukozy (GLUT). Po wnikięciu do komórki, DHA ulega natychmiastowej redukcji i gromadzi się w postaci askorbinianu. Drugi system transportu występuje w wyspecjalizowanych komórkach, do których witamina C przedostaje się bezpośrednio przy udziale Na^+ -zależnych transporterów SVCT1 (ang. *Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1*) i/lub SVCT2, w procesie zależnym od elektrochemicznego gradientu sodu [12, 17, 36, 56]. Ludzki transporter SVCT1 ($K_m \approx 65\text{-}240 \mu\text{M}$) znajduje się głównie na powierzchni kosmków jelitowych oraz komórek kanalików nerkowych, gdzie bierze udział w absorpcji i reabsorpcji witaminy C. Ze względu na ograniczone powinowactwo SVCT1 do askorbinianu, nie jest możliwe wchłonięcie dużych ilości witaminy C z przewodu pokarmowego. Druga izoforma transportera, SVCT2 ($K_m \approx 8\text{-}62 \mu\text{M}$) występuje m.in.: w układzie nerwowym, neuroendokrynnym, zewnątrzwydzielniczym, tkance nabłonkowej i osteoblastach [26, 60]. Stężenie witaminy C wpływa na ekspresję obu izoform SVCT [56]. Zaobserwowano, że wysoki poziom askorbinianu obniża ilość SVCT w ludzkich płytkach krwi i komórkach nabłonka jelit, natomiast niskie stężenie powoduje wzrost ilości SVCT [16].

ANTYOKSYDACYJNA AKTYWNOŚĆ WITAMINY C

Witamina C jest czynnikiem redukującym i przeciwutleniaczem. Ochronny wpływ witaminy C jest związany z jej działaniem jako donor elektronów i zdolnością do neutralizacji reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS)



RYCINA 1. Metabolizm redoks witaminy C (na podstawie [17]; zmodyfikowano). Jednoelektronowa reakcja utleniania askorbinianu powoduje powstanie rodnika askorbylowego ze zdelokalizowanym elektronem. Rodnik askorbylowy ulega następnie utlenieniu, tworząc kwas dehydroaskorbinowy (DHA). DHA jest związkiem niestabilnym, może ulec rozkładowi lub redukcji z powrotem do askorbinianu [17] **FIGURE 1.** Redox metabolism of vitamin C (based on [17]; modified). The one electron oxidation reaction of ascorbate produces the ascorbate free radical with one delocalised electron. The ascorbate free radical is subsequently oxidized to form dehydroascorbic acid (DHA). DHA is an unstable molecule and can be decomposed or reduced back to ascorbate [17]

oraz reaktywnych form azotu (ang. *Reactive Nitrogen Species*, RNS), np.: rodnika hydroksyowego, anionrodnika ponadtlenkowego, tlenu singletowego, rodników peroksywowych i nadtlenoazotynu [16,48,69]. W fizjologicznym pH witamina C występuje głównie w formie monoanionu (askorbinan, AscH^-), który łatwo ulega dwóm kolejnym, odwracalnym, jedno-elektronowym reakcjom utleniania. Po utracie jednego elektronu witamina C staje się kwasem semidehydroaskorbinowym (rodnikiem askorbylowym, $\text{Asc}^{\cdot-}$), ale z powodu stabilizacji rezonansowej niesparowanego elektronu $\text{Asc}^{\cdot-}$ jest stosunkowo mało reaktywny. Jego potencjał redoks jest znacznie niższy niż potencjały redoks większości ROS i RNS. Dodatkowo, rodnik askorbylowy jest związkiem niestabilnym, łatwo ulega dysmutacji tworząc askorbinian i kwas dehydroaskorbinowy (ryc. 1) [16, 17, 48], który dopóki nie jest z powrotem zredukowany do askorbinianu, może ulec nieodwracalnej hydrolizie do kwasu 2,3-diketogulonowego. Redukcja kwasu dehydroaskorbinowego do askorbinianu może zachodzić z udziałem glutationu lub enzymatycznie za pomocą zależnej od glutationu reduktazy DHA, glutaredoksyny lub zależnej od NADPH reduktazy tioredoksynowej [16, 36, 37, 69].

ROLA WITAMINY C W PEROKSYDACJI LIPIDÓW

Witamina C chroni przed spowodowanymi przez reaktywne formy tlenu uszkodzeniami wielu komponentów komórkowych. Głównym celem działania ROS jest błona komórkowa. W jej obrębie dochodzi do peroksydacji lipidów, która może być

uważana za przykład wolnorodnikowej reakcji łańcuchowej. Składa się ona z trzech etapów: inicjacji, propagacji i terminacji. ROS są wytwarzane przez różne źródła, m.in.: łańcuch oddechowy, oksydazę ksantynową, mieloperoksydazę i oksydazę NADPH. W fazie inicjacji reaktywna forma tlenu, np. rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) doprowadza do odłączenia atomu wodoru od łańcucha bocznego, wielonienasyconego kwasu tłuszczowego (LH), wynikiem czego powstaje woda i rodnik alkilowy ($\text{L}\cdot$). Po przejściu w formę dienolową $\text{L}\cdot$ reaguje z tlenem cząsteczkowym, powodując powstanie wolnego rodnika nadtlenkowego ($\text{LOO}\cdot$). Jeśli wolny rodnik nadtlenkowy nie zostanie zneutralizowany, jest w stanie odłączyć atom wodoru z łańcucha bocznego kolejnego LH i w ten sposób przyczynia się do powstania następnej cząsteczki $\text{L}\cdot$ oraz wyzwalając kontynuację reakcji łańcuchowej, w wyniku której powstaje nadtlenek kwasu tłuszczowego (LOOH). Następnie, nadtlenki lipidowe podlegają dalszej degradacji tworząc końcowe produkty peroksydacji lipidów, w szczególności aldehydy, a wśród nich najpopularniejszy, dialdehyd malonowy (MDA), hydroksykwasy, w tym 4-hydroksyalkenale, 2-alkenale oraz ketony [25, 71].

WITAMINA C JAKO KOFAKTOR REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

U ludzi, witamina C funkcjonuje jako specyficzny donor elektronów i pełni funkcję kofaktora dla wielu enzymów (tab. 1).

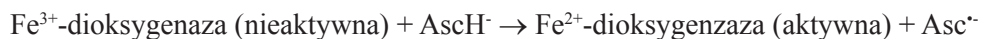
TABELA 1. Enzymy, dla których askorbinian pełni funkcję kofaktora

TABLE 1. Enzymes for which the ascorbate is a cofactor

Nazwa enzymu	Funkcja enzymu	Piśmiennictwo
Hydroksylaza prolinowa i lizynowa kolagenu	Potranslacyjna modyfikacja kolagenu	[36, 45, 53, 54]
Hydroksylaza prolinowa i asparaginianowa	Hydroksylacja HIF-1 α	[16, 36, 37]
β -hydroksylaza asparaginianowa	Hydroksylacja EGF	[37]
Dioksygenaza γ -butyrobetainy, dioksygenaza ϵ -N-trimetylolizyny	Synteza karnityny	[36, 55]
β -monooksygenaza dopaminy, hydroksylaza tyrozynowa	Synteza noradrenaliny	[14, 36, 39]
Peptydylowa monooksygenaza α -amidująca i α -hydroksylująca	Amidacja hormonów peptydowych	[14, 18, 36]
Dioksygenaza 4-hydroksyfenylopirogonianowa	Metabolizm tyrozyny	[43]

Hydroksylaza prolinowa i lizynowa kolagenu uczestniczą w syntezie kolagenu oraz zwiększają jego stabilność przez wprowadzenie grup hydroksylowych do reszt prolilowych i lizylowych. Istnieją, co najmniej trzy izoenzymy hydroksylaz prolinowych kolagenu u ludzi. Każdy posiada inną podjednostkę α , ale wszystkie zawierają te same disulfidoizomerazy białek (ang. *Protein Disulfide Isomerases*, PDIs), które pełnią funkcję podjednostek β i w czasie syntezy kolagenu katalizują powstawanie wiązań disiarczkowych [36, 45, 53, 54]. Dioksygenaza γ -butyrobetainy i dioksygenaza ϵ -N-trimetylolizyny są niezbędne do syntezy karnityny [36, 55]. β -monooksygenaza dopaminy katalizuje ostatni etap biosyntezy noradrenaliny [14, 36], natomiast hydroksylaza tyrozynowa odpowiada za przekształcenie L-tyrozyny do dihydroksyfenyloalaniny (DOPA), prekursora noradrenaliny [39]. Peptydylowa monooksygenaza α -amidująca i α -hydroksylująca uczestniczą w amidacji hormonów peptydowych [14, 18, 36], zaś dioksygenaza 4-hydroksyfenylopirogonianowa bierze udział w metabolizmie tyrozyny [43].

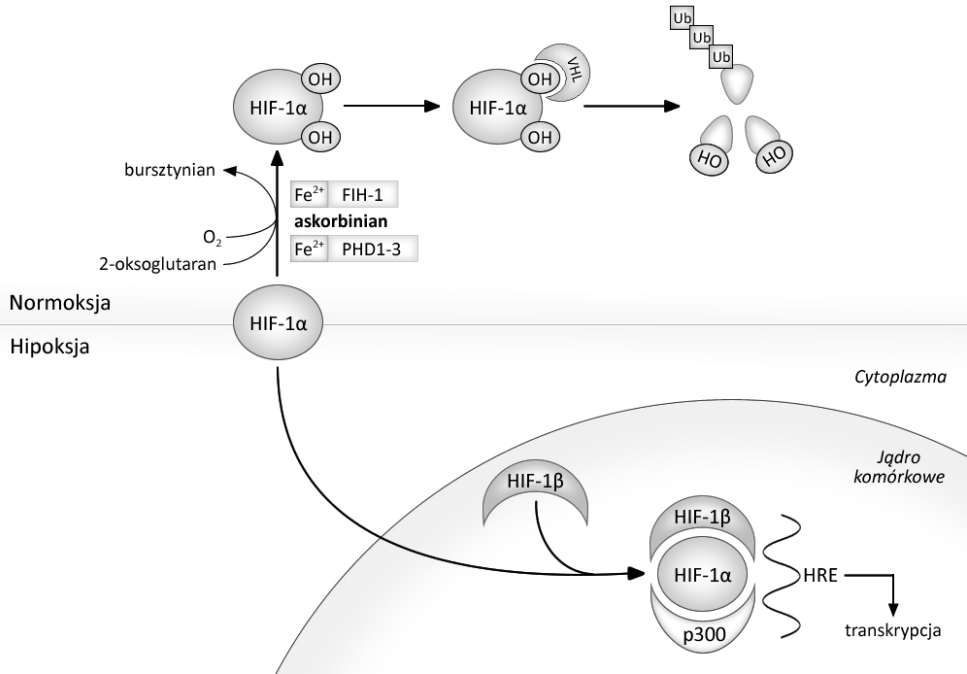
Hydroksylaza prolinowa, lizynowa i asparaginianowa należą do zależnej od Fe^{2+} , 2-oksoglutaranu i askorbinianu rodziny dioksygenaz [28, 45]. Dioksygenazy 2-oksoglutaranu służą jako substrat i źródło dwóch z czterech elektronów potrzebnych do redukcji O_2 . Przenoszą one jeden z atomów tlenu z O_2 do bursztynianu i jeden atom do substratu białkowego. Askorbinian jest niezbędny do utrzymywania żelaza w stanie Fe^{2+} , zachowując w ten sposób pełną aktywność enzymów tej klasy [16, 35, 37, 47].



Kilka pełniących różne funkcje białek może być potencjalnymi substratami w reakcjach katalizowanych przez dioksygenazy. Niemniej jednak, trudno jest wykazać fizjologiczne lub patologiczne znaczenie tych związków w reakcjach redoks. Dobrze zbadano natomiast rolę askorbinianu w hydroksylacji reszt prolilowych i lizylowych w cząsteczce kolagenu oraz jej związek z rozwojem szkorbutu [53]. Do tej pory opisano przynajmniej 27 typów kolagenu, z co najmniej 42 różnymi łańcuchami polipeptydowymi oraz ponad 20 dodatkowych białek zawierających kolagen. Hydroksylacja proliny odgrywa kluczową rolę w interakcji pomiędzy tymi białkami, ponieważ 4-hydroksyprolina jest najczęściej występującym aminokwasem w kolagenie [45].

ASKORBINIAN JAKO KOFAKTOR HYDROKSYLACJI HIF-1A

Czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją 1α (ang. *Hypoxia-Inducible Factor 1 α* , HIF-1 α) jest substratem dla dioksygenaz. Aktywność HIF-1 α może być regulowana przez zależną od askorbinianu hydroksylację (ryc. 2) [16, 36, 37].



RYCINA 2. Rola askorbinianu w degradacji czynnika HIF-1 α w warunkach normoksji (na podstawie [37]; zmodyfikowano). W czasie hipoksji HIF-1 α przenika do jądra komórkowego i tworzy dimer z HIF-1 β , który wiąże się z DNA za pomocą elementu odpowiedzi hormonalnej (ang. Hormone Response Element, HRE). W ten sposób, inicjowana jest transkrypcja genów zależna od tlenu. W warunkach normoksji, w obecności tlenu i askorbinianu, dwie reszty prolilowe i jedna reszta asparaginylowa czynnika HIF-1 α są hydroksylowane przez dioksygenazy zależne od Fe²⁺ i 2-oksoglutaranu, odpowiednio, za pomocą hydroksylaz prolinowych (ang. *Prolyl Hydroxylase Domain Proteins*, PHDs) oraz hydroksylazy asparaginianowej, zwanej czynnikiem hamującym HIF-1 (ang. *Factor Inhibiting HIF-1*, FIH-1). Hydroksylacja reszt prolilowych powoduje wiązanie się białka von Hippel-Lindau (VHL), które jest częścią kompleksu ligazy ubikwitynowej E3. Jest to warunek ubikwitynacji, która prowadzi do degradacji HIF-1 α . Ewentualnie, hydroksylacja reszty asparaginylowej zapobiega wiązaniu się koaktywatora transkrypcji p300 do HIF-1 α . W efekcie, dochodzi do zahamowania transaktywacji HIF-1 α oraz transkrypcji genów zależnych od tlenu [37]

FIGURE 2. Role of ascorbate in the degradation of HIF-1 α in normoxia (based on [37]; modified). During hypoxia, HIF-1 α penetrates into the nucleus and forms a dimer with HIF-1 β , which binds to DNA through the hypoxia response element (HRE). Hence, transcription of oxygen-dependent genes is initiated. In normoxia, in the presence of oxygen and ascorbate, two proline residues and one asparagine residue of HIF-1 α are hydroxylated by Fe²⁺ and 2-oxoglutarate (2OG)-dependent dioxygenases, as prolyl hydroxylase domain proteins (PHDs) and asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1 (FIH-1), respectively. Hydroxylation of prolyl residues results in the binding of the von Hippel-Lindau protein (VHL), which is part of the E3 ubiquitin ligase complex. This is the prerequisite for ubiquitination, which cause the degradation of HIF-1 α . Alternatively, hydroxylation of asparagine residue prevents the binding of p300 transcription coactivator protein to HIF-1 α . As a result, it inhibits the transactivation of HIF-1 α and the transcription of oxygen-dependent genes [37]

W warunkach niedotlenienia dochodzi do ekspresji czynników HIF we wszystkich komórkach jądrazstych, w których pełnią one funkcję uniwersalnych regulatorów skomplikowanej sieci zależnych od siebie procesów. Obecnie, zidentyfikowano ponad 800 docelowych genów dla czynników HIF, których ekspresja umożliwia uzyskanie ponad 60 produktów tych genów [42, 63, 64]. Produkty białkowe tych genów są zaangażowane m.in. w proces angiogenezy, proliferację komórek, wychwyt glukozy, glikolizę i erytropoezę. Czynniki HIF są heterodimerami, zawierającymi wrażliwe na tlen białka: HIF-1 α i HIF-1 β . Odkryto dwie niezależne dioksygenazy HIF-1 α : hydroksylazę prolinową i asparaginianową. Stwierdzono, że trzy hydroksylazy prolinowe HIF-1 α (PHD1, PHD2, PHD3) posiadają stałą sekwencję aminokwasów, która występuje dwukrotnie w HIF-1 α i hydroksylują dwie różne reszty prolinowe: Pro⁴⁰² i Pro⁵⁶⁴. W odróżnieniu od hydroksylaz prolinowych biorących udział w syntezie kolagenu, enzymy te nie posiadają podjednostki PDI. W czasie niedotlenienia dochodzi do indukcji HIF-1 α , który przedostaje się do jądra komórkowego, gdzie wraz ze stale tam występującym czynnikiem HIF-1 β , tworzy heterodimeryczny czynnik transkrypcyjny. W warunkach normoksji, z powodu zależnej od tlenu i askorbinianu hydroksylacji, czynniki HIF ulegają inaktywacji z następującą degradacją podjednostki α . Produkt hydroksylacji HIF-1 α łączy się z białkiem promotorowym transformacji nowotworowej pVHL (ang. *Von Hippel-Lindau tumor promoter*), co prowadzi do ubiquitynacji i natychmiastowej degradacji HIF-1 α w proteasomie 26S. Dodatkowo, hydroksylaza asparaginianowa, nazywana inaczej czynnikiem hamującym HIF-1 (ang. *factor inhibiting HIF-1*), poprzez hydroksylację C-końcowej domeny transaktywacyjnej może hamować funkcję koaktywatorów transkrypcji. Wynika z tego, że askorbinian wpływa na wrażliwość na tlen tych hydroksylaz i prawdopodobnie powoduje obniżenie katalitycznej aktywności żelaza [16, 41, 61].

Z drugiej strony, w niektórych przypadkach normoksji może dochodzić do indukowanej produkcji czynników HIF. Co²⁺ i Ni²⁺ w hodowlach komórkowych mogą wywoływać efekty porównywalne z tymi występującymi w warunkach hipoksji [38]. Ni²⁺ prowadzi do zmniejszenia stężenia wewnątrzkomórkowego askorbinianu, hamując hydroksylację HIF-1 α i HIF-2 α oraz powoduje powstanie stresu oksydacyjnego [58].

ASKORBINIAN JAKO KOFAKTOR HYDROKSYLACJI EGF

Rodzina dioksygenaz zależnych od 2-oksoglutaranu i Fe²⁺ została rozszerzona o nowe enzymy zależne od askorbinianu. β -hydroksylaza asparaginianowa potranslacyjnie hydroksyluje specyficzne reszty aspartyłowe i asparaginyłowe nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor*; EGF) i domeny EGF-podobne (ang. *EGF-like domains*). Obecność askorbinianu kilkukrotnie zwiększa szybkość przebiegu tych reakcji. β -hydroksylowane reszty aspartyłowe i asparaginyłowe wy-

stępują również w EGF-podobnych domenach kilku czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K (VII, IX i X) i innych białkach osocza (białkach C, S i Z oraz białkach układu dopełniacza C1r), jak również białkach Notch i Jageed, zaangażowanych w regulację aktywności genów, pozwalających na kontrolę proliferacji i różnicowania się komórek [37, 67].

Postulowano ostatnio rolę zależnych od 2-oksoglutaranu i Fe^{2+} dioksygenaz w demetylacji histonów i kwasów nukleinowych. Demetylazy histonów należą do rodziny białek jumonji. Katalizują one typowe reakcje z udziałem dioksygenaz, które prowadzą do powstawania produktów końcowych, takich jak bursztynian i formaldehyd. Aktywność zależnych od askorbinianu demetylaz była obserwowana w trakcie demetylacji trimetylowanej lizyny w histonie H3 [27, 37, 57, 70]. W ostatnim czasie opisano również demetylazy kwasów nukleinowych – *Escherichia coli* AlkB (ang. *Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB-like*) [19, 77] i ich ludzkie homologi ABH2 i ABH3 (ang. *AlkB homologues*) [62, 68, 30], które biorą udział w naprawie uszkodzeń, spowodowanych alkilacją DNA/RNA w bezpośrednim, zależnym od 2-oksoglutaranu, Fe^{2+} i askorbinianu mechanizmie oksydacyjnej dealkylacji DNA/RNA. AlkB i ABH3 powodują wybiórczą naprawę uszkodzeń jednoniciowego DNA i metylowanych zasad RNA. Natomiast ABH2 naprawia uszkodzenia głównie w dwuniciowym DNA. Dowiedziono niedawno, że podobny enzym (ang. *Fat mass and obesity-associated protein, Fto*) katalizuje dealkylację 3-metylotyminy w jednoniciowym DNA oraz poprzez nieznaną mechanizm wpływa na regulację bilansu energetycznego ssaków [31]. Modulatoryjna rola askorbinianu w naprawie kwasów nukleinowych i demetylacji histonów może ujawnić nową funkcję askorbinianu, zarówno w profilaktyce choroby nowotworowej, jak i procesie karcynogenezy [37].

GLIPIKANY I ASKORBINIAN

Glipikany stanowią rodzinę proteoglikanów, składających się z rdzenia białkowego połączonego kowalencyjnie z łańcuchami siarczanu heparanu. Funkcjonują one jako selektywne regulatory interakcji ligand-receptor, dzięki czemu kontrolują wzrost i rozwój. Mogą one migrować pomiędzy zewnętrzną błoną komórkową i błonami wewnątrzkomórkowymi oraz importować polikationy, związane z polianionowymi łańcuchami bocznymi siarczanu heparanu [21]. Jeden z członków tej rodziny, glipikan 1 migruje pomiędzy błoną komórkową aparatu Golgiego i błoną zewnętrzną. Cysteiny w glipikanie 1 mogą być nitrozylowane przez tlenek azotu w reakcjach zależnych od Cu^{2+} . W trakcie narażenia glipikanu 1 na działanie askorbinianu dochodzi do uwolnienia tlenku azotu (NO) z wewnętrznych grup S-nitrozowych rdzenia białkowego glipikanu 1. Tlenek azotu uczestniczy w rozszczepieniu siarczanu heparanu pod wpływem deaminacji przez heparanazę w miejscach, w których glukozaminy posiadają wolną grupę aminową [11, 21, 37].

U pacjentów cierpiących na chorobę Niemann-Picka typu C (lizosomalną chorobę spichrzeniową), charakteryzującą się akumulacją niezestryfikowanego cholesterolu, sfingolipidów oraz innych wewnątrzlizosomalnych lipidów, dochodzi w fibroblastach do wadliwej degradacji glipikanu 1. Podawanie askorbinianu pozwala na przywrócenie degradacji glipikanu 1 siarczaniu heparanu, co sugeruje, że wadliwe przekształcenie tego glipikanu może doprowadzić do uszkodzenia komórek w przebiegu choroby Niemann-Picka typu C [11, 37, 72].

ROLA WITAMINY C W UTRZYMYWANIU HEMEOSTAZY REDOKS W ORGANELLACH KOMÓRKOWYCH

Inną istotną funkcją askorbinianu jest utrzymywanie homeostazy redoks w komórce. Rola witaminy C w mitochondrium jest szczególnie interesująca, ponieważ łańcuch oddechowy jest głównym wewnątrzkomórkowym źródłem powstawania reaktywnych form tlenu. Co więcej, możliwe funkcje askorbinianu w oksydacyjnym zwijaniu białek i w utrzymywaniu środowiska oksydacyjnego sugerują jego szczególną rolę w procesach związanych z retikulum endoplazmatycznym [3, 37].

ROLA WITAMINY C W MITOCHONDRIMUM

W badaniach *in vivo* wykazano, że stężenie askorbinianu w mitochondriach ssaków można zwiększyć, podając witaminę C wraz z dietą [40]. Mimo to, mitochondrialny transport askorbinianu i jego funkcje wewnątrzmitochondrialne są nadal słabo poznane. Wyniki badań wskazują, że witamina C jako kwas dehydroaskorbinowy, w mechanizmie konkurującym z transportem D-glukozy, przenika do wnętrza mitochondrium [2, 33]. Wykazano, iż największa ilość receptorów GLUT1 występuje właśnie w mitochondrium [37]. Sugeruje to, że analogicznie do modelu wychwytu komórkowego, witamina C w stanie utlenionym przechodzi do mitochondriów za pomocą GLUT1 [2, 37, 69, 76].

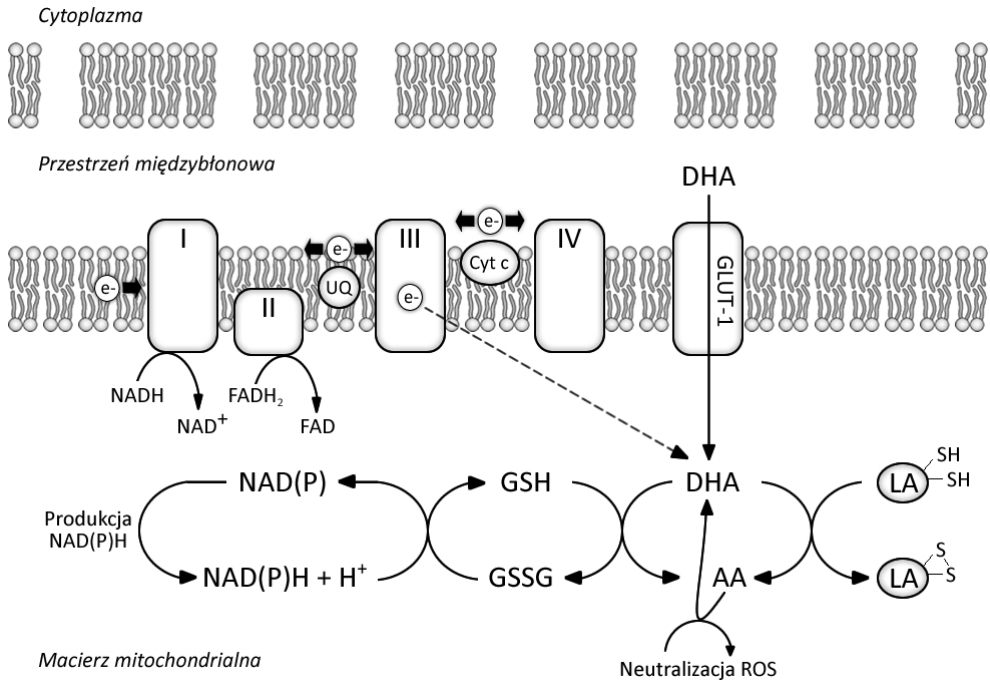
Mitochondria posiadają zdolność do ograniczenia przemiany kwasu dehydroaskorbinowego do askorbinianu w sposób zależny od kwasu α -liponowego (LA) [65]. Wprowadzenie kwasu dehydroaskorbinowego do mitochondriów skutkuje redukcją DHA przy udziale reduktazy tioredoksynowej i mitochondrialnym gromadzeniem się askorbinianu. Może to jednak być tylko niewielka składowa procesu redukcji mitochondrialnego DHA [20, 33, 36]. Dostarczenie kwasu dehydroaskorbinowego powoduje znaczny spadek mitochondrialnego stężenia glutationu. Ubytek mitochondrialnego GSH powoduje znaczne upośledzenie redukcji kwasu dehydroaskorbinowego do askorbinianu [36, 40]. Na podstawie tych wyników, zasugerowano, że za-

leżna od GSH redukcja kwasu dehydroaskorbinowego jest jedną z głównych reakcji zaangażowanych w produkcję askorbinianu w mitochondriach ssaków [33, 37].

Zaobserwowano, że w przypadku braku substratów w procesie oddychania komórkowego, mitochondria w hepatocytach tracą zdolność do utrzymywania lub zwiększania stężenia askorbinianu, co sugeruje, że łańcuch oddechowy przyczynia się do zmniejszenia stężenia DHA. Rzeczywiście, wykazano, że powstawanie askorbinianu z kwasu dehydroaskorbinowego może być zwiększone, za pomocą kilku substratów dla łańcucha oddechowego (bursztynianu, jabłczanu i fosforanu 3-glicerolu). Przy zastosowaniu specyficznych inhibitorów mitochondrialnego transportu elektronów łańcucha oddechowego, wykazano, iż kompleks III odpowiedzialny jest za ograniczenie nadmiernego zużycia askorbinianu (ryc. 3) [37].

Zaangażowanie łańcucha oddechowego w redukcję kwasu dehydroaskorbinowego, może przyczyniać się do stabilizacji mitochondrialnego bilansu redoks, na co najmniej dwa sposoby. Po pierwsze, poprzez dostarczanie elektronów do redukcji kwasu dehydroaskorbinowego, może zmniejszać zredukowany stan łańcucha oddechowego. W ten sposób ucieczka elektronów z łańcucha oddechowego i późniejsze tworzenie reaktywnych form tlenu, może również ulec obniżeniu. Po drugie, produkcja askorbinianu dostarcza zredukowanej witaminy C, która jest w stanie neutralizować reaktywne formy tlenu w miejscu ich wytwarzania [22, 37, 73].

Utrzymywanie wewnątrzmitochondrialnego poziomu askorbinianu, wydaje się mieć działanie antyapoptotyczne. Podwyższony poziom reaktywnych form tlenu może wywołać uszkodzenie błony mitochondrialnej potencjalnie prowadząc do apoptozy [32, 37]. W komórkach HL-60 narażonych na nadtlenek wodoru, wcześniejsza inkubacja z kwasem dehydroaskorbinowym redukuje wewnątrzkomórkowy poziom nadtlenu wodoru w sposób zależny od stężenia witaminy C. Zgodnie z tym, potencjał błony mitochondrialnej był także częściowo zachowany. Denaturacja i uwolnienie cytochromu c z mitochondriów może być również zahamowane w komórkach otrzymujących wcześniej kwas dehydroaskorbinowy [37]. Utrata potencjału błonowego mitochondriów, związana z indukowaną białkiem FAS (ang. *Apoptosis-Stimulating Fragment*) apoptozą monocytów, może być hamowana przez wcześniejsze podanie witaminy C [23]. Podczas niedotlenienia i reperfuzji łańcuch oddechowy, zwłaszcza kompleks III, jest głównym miejscem powstawania reaktywnych form tlenu i celem uszkodzeń w śródbłonku naczyniowym [24, 69]. Zależne od stężenia witaminy C zmniejszenie ilości reaktywnych form tlenu można było zaobserwować w poddanych niedotlenieniu i reperfuzji komórkach śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej i tętnic wieńcowych. Witamina C zapobiegała także uwolnieniu cytochromu c i stabilizowała potencjał błony mitochondrialnej w komórkach poddanych niedotlenieniu i reperfuzji. Wszystkie te procesy doprowadziły do hamowania apoptozy indukowanej hipoksją i reperfuzją. Uzyskane wyniki badań wskazują, że mitochondrialna witamina C utrzymuje potencjał błony mitochondrialnej oraz wywiera działanie antyapoptotyczne dzięki możliwości neutralizowania reaktywnych form tlenu [33, 37].



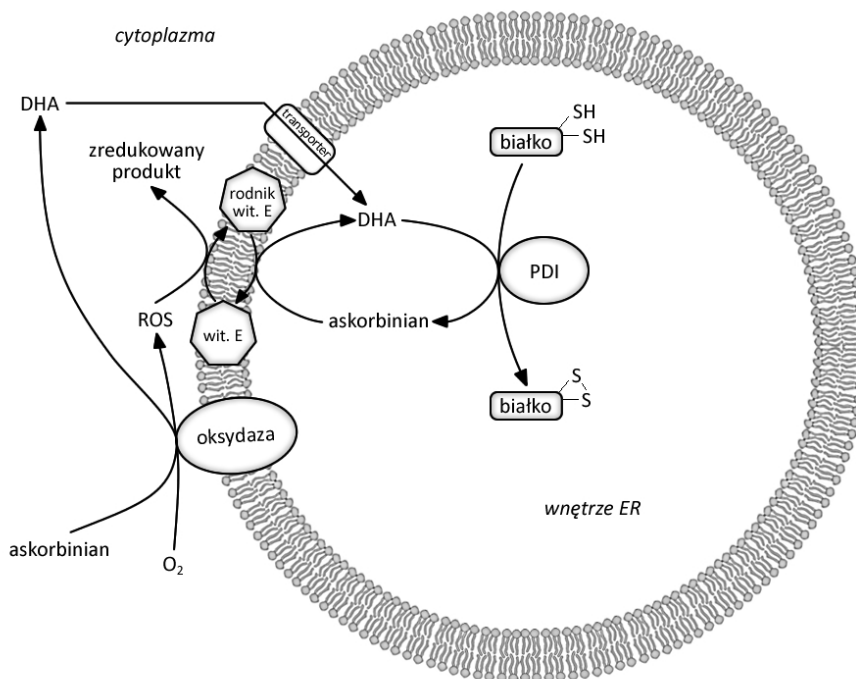
RYCINA 3. Wychwyt i recykling witaminy C w mitochondriach (na podstawie [37]; zmodyfikowano). Witamina C w postaci utlenionej jako kwas dehydroaskorbinowy jest transportowana za pomocą GLUT1 do mitochondriów. Transportowany DHA jest redukowany w mitochondriach. Łańcuch oddechowy może być dawcą elektronów do redukcji DHA. Miejscem redukcji DHA jest kompleks III. DHA jest redukowany do askorbinianu za pomocą reduktazy kwasu dehydroaskorbinowego i zredukowanej formy glutationu. Utleniona forma glutationu jest redukowana z powrotem przez reduktazę glutationową kosztem $NADPH$. Istnieje możliwość redukcji DHA za pomocą kwasu α -liponowego zawartego w kompleksach enzymatycznych. Witamina C neutralizuje reaktywne formy tlenu, przez co chroni genom mitochondrium i zapobiega depolaryzacji błony mitochondrialnej [37] **FIGURE 3.** Vitamin C uptake and recycling in mitochondria (based on [37]; modified). Vitamin C in its oxidized form as dehydroascorbic acid is transported into mitochondria via GLUT1. The transported DHA is reduced in the mitochondria. The respiratory chain can donate electrons for the reduction of DHA. The site of DHA reduction is complex III. DHA is also reduced back to ascorbate by dehydroascorbate reductase and reduced glutathione. The oxidized glutathione is reduced back by glutathione reductase at the expense of $NADPH$. DHA reduction can also be mediated by α -lipoic acid-containing enzyme complexes. Vitamin C neutralizes reactive oxygen species, hence protecting the mitochondrial genome and preventing mitochondrial membrane depolarization [37]

W przebiegu różnych chorób mitochondrialnych obserwuje się zwiększoną produkcję ROS [15]. Suplementacja witaminy C jest składową terapią tych chorób, ponieważ ogranicza występowanie stresu oksydacyjnego, dzięki czemu stabilizuje mitochondrialny bilans redoks, chroni mtDNA przed uszkodzeniami, oraz wykazuje działanie antyapoptotyczne [15, 66].

ROLA WITAMINY C W RETIKULUM ENDOPLAZMATYCZNYM (ER)

Retikulum endoplazmatyczne ma istotne znaczenie w metabolizmie askorbinianu. Ostatnie etapy syntezy witaminy C zlokalizowane są właśnie w świetle ER. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* wskazują, że askorbinian sprzyja oksydacyjnemu zwijaniu białek zachodzącemu w obrębie ER. Po pierwsze, jako donor elektronów, witamina C może wchodzić w zależną od aktywności oksydazy askorbinianu, jedno-elektronową reakcję z tlenem, wpływając na wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji ROS oraz kwasu dehydroaskorbinowego we wnętrzu ER. Po drugie, istnieje wiele enzymów mogących katalizować, zachodzącą w świetle pęcherzyka mikrosomalnego redukcję DHA do askorbinianu, włączając w to disulfidoizomerazę białek (PDI) (ryc. 4) [3, 36].

Oksydaza L-gulonolaktonowa (GLO) jest enzymem mikrosomalnym, katalizującym przemianę tlenową gulonolaktonu do askorbinianu, z wytworzeniem nadtlenku wodoru. Wymóg stosowania detergentów do solubilizacji oksydazy L-gulonolaktonowej z pęcherzyków mikrosomalnych sugeruje, że enzym ten usytuowany jest w błonie komórkowej. Sekwencja aminokwasów w GLO zawiera wiele silnie hydrofobowych regionów, tworzących strukturę β , zamiast typowej, międzybłonowej struktury helikalnej, która jest prawdopodobnie związana z błoną retikulum endoplazmatycznego. Orientacja miejsca katalitycznego wobec wnętrza ER w mikrosomach wątroby szczura, inkubowanych z gulonolaktonem, wskazuje na nagromadzenie askorbinianu i preferencyjną oksydację GSH (prawdopodobnie z udziałem nadtlenku wodoru) wewnątrz światła retikulum endoplazmatycznego [36, 37]. Obserwacja ta sugeruje, że produkowany w wątrobie askorbinian przechodzi do krążenia – przynajmniej częściowo – na drodze sekrecji. Należy zauważyć, że wymienione procesy są istotne tylko w przypadku gatunków syntetyzujących askorbinian. Jednakże, u gatunków nieposiadających oksydazy L-gulonolaktonowej, w tym ludzi, efektywne mechanizmy transportu ułatwiają napływ askorbinianu do wnętrza ER [37].



RYCINA 4. Wpływ metabolizmu witaminy C na proces oksydacyjnego związania białka w świetle ER (na podstawie [3]; zmodyfikowano). Dzięki obecności metaloprotein w błonie pęcherzyków mikrosomalnych, oksydaza askorbinianu utlenia witaminę C do kwasu dehydroaskorbinowego, prowadząc do powstania reaktywnych form tlenu, które (bezpośrednio lub przy udziale witaminy E) utleniają kolejne cząsteczki askorbinianu. Powstający w świetle ER lub transportowany do jego wnętrza DHA, może być zredukowany przez disulfidoizomerazę białek, której centrum aktywne ulega utlenieniu. Ta utleniona forma PDI reaguje ze zredukowaną formą białka, prowadząc do powstania wiązania disiarczkowego oraz katalitycznej regeneracji PDI [3, 36]

FIGURE 4. The effect of vitamin C on the oxidative protein folding in the lumen of the ER (based on [3]; modified). Due to the presence of metalloproteinases in microsomal membrane vesicles, vitamin C is oxidized by ascorbate oxidase to dehydroascorbic acid and generates ROS. ROS (directly or by the mediation of vitamin E) oxidize further ascorbate molecules. DHA, which is formed in or transported into the lumen of the ER, can be reduced by protein disulfide isomerase oxidizing the active center of the enzyme. This oxidized form of protein disulfide isomerase reacts with the reduced PDI, leading to the formation of a disulfide bond, and catalytically regenerating protein disulfide isomerase [3, 36]

Retikulum endoplazmatyczne jest wyposażone w łańcuch transportu elektronów. Jako wynik skażenia chemicznego, podczas cyklu redoks w układzie cytochromu P450, w ER mogą powstawać reaktywne formy tlenu [78]. Oksydaza końcowa, biorąca udział w oksydacyjnym związaniu białek Ero1 (ang. *ER oxidoreductin 1*), wytwarza nadtlenuk wodoru w świetle ER [8, 75].

PRO-OKSYDACYJNA AKTYWNOŚĆ WITAMINY C

Pro-oksydacyjna aktywność kwasu askorbinowego związana jest z katalizowaniem reakcji redoks jonów metali przejściowych (np. Cu^{2+} , Fe^{2+}), dzięki czemu mogą one wchodzić w reakcję z nadtlenkiem wodoru, prowadząc do wytworzenia rodnika hydroksylowego [10, 16]. Ta aktywność witaminy C nie została uznana jednak za pożądaną, ponieważ prowadzi do powstawania reaktywnych form tlenu [17] lub białek glikowanych [9]. Niemniej jednak, inne pro-oksydacyjne efekty działania askorbinianu wydają się być korzystne. Uważa się, że metaloproteiny obecne w pęcherzykach mikrosomalnych utleniają askorbinian do kwasu dehydroaskorbinowego, co prowadzi do wytwarzania reaktywnych form tlenu. Dalsze cząsteczki askorbinianu mogą być utleniane bezpośrednio lub pośrednio, poprzez znajdujący się w błonie α -tokoferol. Powstający w tym miejscu lub transportowany do światła retikulum endoplazmatycznego kwas dehydroaskorbinowy może być następnie zredukowany przez disulfidoizomerazę białek. Mimo, iż przedstawiony mechanizm jest zgodny w wynikami uzyskanymi w systemach mikrosomalnych *in vitro*, dyskusyjne jest czy odzwierciedla on sytuację w warunkach *in vivo*, dlatego potrzebne są dalsze badania w celu potwierdzenia istnienia transferu elektronów w warunkach *in vivo* [3, 36, 37].

WITAMINA C A EKSPRESJA GENÓW

Sugeruje się, że oprócz możliwości wpływania na procesy redoks, witamina C jest w stanie modulować ekspresję genów. Z doświadczeń przeprowadzonych na hodowlach komórkowych i myszach wynika, że w chorobie Charcota-Mariego-Tootha typu 1a (CMT-1a), dziedzicznej neuropatii obwodowej, askorbinian poprzez zmiany poziomu ekspresji genów korzystnie wpływa na promowanie mineralizacji [74]. CMT-1a jest to choroba wywołana nadekspresją genu PMP22, kodującego białko osłonki mielinowej nerwów obwodowego układu nerwowego. Terapia witaminą C powoduje zmniejszenie ekspresji genu PMP22. Sugeruje się również istnienie grupy genów w komórkach macierzystych, które odpowiadają na terapię witaminą C [6]. Większość z tych nadaktywnych genów zaangażowana jest w procesy neurogenezy, dojrzewania i neuroprzeżywalności. Niedawno, Park et al. opublikowali analizę proteomiczną komórek nowotworowych leczonych witaminą C [49]. Większość efektów spowodowana była nadekspresją genu dla białka RKIP (ang. *Raf Kinase Inhibitor Protein*) i aneksyny A5. Co więcej, w roku 2010, Belin et al. opublikowali artykuł opisujący zmianę ekspresji genów w komórkach zdrowych i nowotworowych, które poddano działaniu wzrastających stężeń witaminy C [7]. Okazało się, że pod wpływem kwasu askorbinowego zmniejszeniu uległa ekspresja tylko 30 genów. Spośród nich, 12 należało do grup uczestniczących w podziale komórkowym, m.in.: syntetaz

tRNA i czynników inicjacji translacji. Autorzy uznali, że w dużych stężeniach witamina C zatrzymuje proliferację komórek *in vitro* i *in vivo* oraz niszczy dzielące się komórki [6].

Jest dobrze znanym faktem, że stan redoks komórki wpływa na aktywność pewnych czynników transkrypcyjnych. W istocie, NFκB (ang. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i AP-1 (ang. *Activator Protein 1*) są dobrze znanymi mediatorami odpowiedzi redoks, wpływającej na ekspresję genów [44]. Reaktywne formy tlenu mogą aktywować NFκB prawdopodobnie powodując uwolnienie podjednostki hamującej (IκB) od kompleksu NFκB. Natomiast regulacja redoks wiązania się z AP-1 może nastąpić poprzez zachowanie cysteiny obecnej w podjednostkach Jun i Fos [1]. W pewnych warunkach hodowli komórkowych wykazano, że ze względu na swoje właściwości antyoksydacyjne, witamina C może modulować wiązanie się z DNA zależnych od potencjału redoks jądrowych czynników transkrypcyjnych AP1 i NFκB [17].

Jedynym zaproponowanym mechanizmem, w którym witamina C może modulować ekspresję genów jest modulacja ilości wewnątrzkomórkowego cAMP. Ilość wewnątrzkomórkowego cAMP ulega zmniejszeniu w komórkach inkubowanych z wzrastającymi stężeniami witaminy C. Ten rodzaj hamowania jest charakterystyczny tylko dla kwasu askorbinowego i nie jest powodowany przez żaden inny antyoksydant. Wynika z tego, że dzięki możliwości wpływania na szlaki zależne od cAMP, witamina C może tłumić ekspresję genów [6].

IMMUNOMODULUJĄCE WŁAŚCIWOŚCI WITAMINY C

Dowiedziano, że istnieją mechanizmy, dzięki którym witamina C może wpływać stymulująco na układ odpornościowy. Zdolność kwasu askorbinowego do neutralizacji reaktywnych form tlenu i wynikająca z tego ochrona przed uszkodzeniami DNA komórek układu immunologicznego jest jednym z możliwych mechanizmów, dzięki którym witamina C może poprawiać funkcjonowanie układu odpornościowego [46]. Zaobserwowano, że witamina C ma zdolność hamowania trzech różnych szlaków, zaangażowanych w śmierć aktywowanych i spoczynkowych limfocytów T i potwierdzono, że efektorowe limfocyty T poddane działaniu witaminy C częściej wchodzą w fazę S [52].

Inne potencjalne mechanizmy stymulujące kwasu askorbinowego wskazują na wzrost ilości nukleotydów wewnątrzkomórkowych, modulację syntezy cytokin pro-oksydacyjnych oraz antagonizm immunosupresyjnego współdziałania histaminy i leukocytów [51]. Zwiększenie aktywności komórek NK (ang. *Natural Killers*) pod wpływem witaminy C jest kolejnym potencjalnym mechanizmem, dzięki któremu kwas askorbinowy może stymulować układ immunologiczny [29]. Wykazano, że witamina C, dzięki zwiększeniu ekspresji białka Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*) i zmianie proporcji pomiędzy białkiem Bcl-2 i Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*), działa

stymulująco na różne typy komórek i zapobiega ich apoptozie [50]. Dowiedziono, że wzmożony stres oksydacyjny uwrażliwia limfocyty T na apoptozę [59], co potwierdzają wyniki licznych badań [13, 52]. Dzięki nasilaniu ekspresji białka Bcl-2 i zwiększeniu stosunku białek: Bcl-2/Bax, witamina C może poprawić funkcjonowanie limfocytów T w warunkach stresu oksydacyjnego. Witamina C i inne antyoksydanty poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu eliminują stres oksydacyjny, powstały wskutek osłabienia ekspresji białka Bcl-2 i w ten sposób mogą chronić limfocyty T przed śmiercią. Ponadto, wykazano u ludzi, że dzięki zwiększeniu przeciwbakteryjnej aktywności komórek NK, nasileniu proliferacji limfocytów oraz zwiększeniu zdolności chemotaktycznych, witamina C jest w stanie intensyfikować odpowiedź układu immunologicznego, co wskazuje na istotną rolę tej witaminy w regulacji odpowiedzi immunologicznej [52].

PODSUMOWANIE

Nieustający postęp technologiczny oraz coraz dotkliwiej odczuwalne dla zwykłego człowieka negatywne skutki zanieczyszczenia środowiska naturalnego wpływają na wzrost zachorowalności na choroby cywilizacyjne, w kontekście których nowo poznane mechanizmy działania witaminy C, a w szczególności jej rola w ekspresji genów oraz jej właściwości immunomodulujące, wydają się być bardzo obiecujące. Niezbędne zatem jest przeprowadzenie dalszych i bardziej szczegółowych badań w celu dokładnego poznania roli witaminy C w organizmie człowieka oraz możliwości jej zastosowania w medycynie.

LITERATURA

- [1] ALLEN RG, TRESINI M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**: 463-99.
- [2] AZZOLINI C, FIORANI M, CERIONI L, GUIDARELLI A, CANTONI O. Sodium-dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. *IUBMB Life* 2013; **65**: 149-53.
- [3] BÁNHÉGYI G, CSALA M, SZARKA A, VARSÁNYI M, BENEDETTI A, MANDL J. Role of ascorbate in oxidative protein folding. *Biofactors* 2003; **17**: 37-46.
- [4] BARON JH. Sailors' scurvy before and after James Lind – a reassessment. *Nutr Rev* 2009; **67**: 315-32.
- [5] BASNET P. Vitamin C: Prevention of chronic diseases and clinical doses. *NFT* 2010; **9**: 20-4.
- [6] BELIN S, KAYA F, BURTEY S, FONTES M. Ascorbic Acid and gene expression: another example of regulation of gene expression by small molecules? *Curr Genomics* 2010; **11**: 52-7.
- [7] BELIN S, KAYA F, DUISIT G, GIACOMETTI S, CICCOLINI J, FONTÉS M. Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression. *PLoS One* 2009; **4**: e4409.
- [8] BENHAM AM, VAN LITH M, SITIA R, BRAAKMAN I. Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; **368**: 20110403.
- [9] BIRLOUEZ-ARAGON I, TESSIER FJ. Antioxidant vitamins and degenerative pathologies. A review of vitamin C. *J Nutr Health Aging* 2003; **7**: 103-9.
- [10] BUETTNER GR, JURKIEWICZ BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 1996; **145**: 532-41.

- [11] CHENG F, CAPPAI R, CICCOTOSTO GD, SVENSSON G, MULTHAUP G, FRANSSON LÅ, MANI K. Suppression of amyloid beta A11 antibody immunoreactivity by vitamin C: possible role of heparan sulfate oligosaccharides derived from glypican-1 by ascorbate-induced, nitric oxide (NO)-catalyzed degradation. *J Biol Chem* 2011; **286**: 27559-72.
- [12] CORPE CP, TU H, ECK P, WANG J, FAULHABER-WALTER R, SCHNERMANN J, MARGOLIS S, PADAYATTY S, SUN H, WANG Y, NUSSBAUM RL, ESPEY MG, LEVINE M. Vitamin C transporter Slc23a1 links renal reabsorption, vitamin C tissue accumulation, and perinatal survival in mice. *J Clin Invest* 2010; **120**: 1069-83.
- [13] DAS A, DEY N, GHOSH A, DAS S, CHATTOPADHYAY DJ, CHATTERJEE IB. Molecular and cellular mechanisms of cigarette smoke-induced myocardial injury: prevention by vitamin C. *PLoS One* 2012; **7**: e44151.
- [14] DILIBERTO EJ JR, DANIELS AJ, VIVEROS OH. Multicompartmental secretion of ascorbate and its dual role in dopamine beta-hydroxylation. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 1163S-1172S.
- [15] DIMAURO S, MANCUSO M. Mitochondrial diseases: therapeutic approaches. *Biosci Rep* 2007; **27**: 125-37.
- [16] DU J, CULLEN JJ, BUETTNER GR. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1826**: 443-57.
- [17] DUARTE TL, LUNEC J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res* 2005; **39**: 671-86.
- [18] EIPPER BA, MILGRAM SL, HUSTEN EJ, YUN HY, MAINS RE. Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. *Protein Sci* 1993; **2**: 489-97.
- [19] FALNES PØ, ROGNES T. DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Res Microbiol* 2003; **154**: 531-8.
- [20] FANG J, ZHONG L, ZHAO R, HOLMGREN A. Ebselen: a thioredoxin reductase-dependent catalyst for alpha-tocopherol quinone reduction. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; **207**: 103-9.
- [21] FRANSSON LA, BELTING M, CHENG F, JÖNSSON M, MANI K, SANDGREN S. Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 1016-24.
- [22] GALLEY HF. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Crit Care* 2010; **14**: 230.
- [23] GONZÁLEZ MJ, ROSARIO-PÉREZ G, GUZMÁN AM, MIRANDA-MASSARI JR, DUCONGE J, LAVERGNE J, FERNANDEZ N, ORTIZ N, QUINTERO A, MIKIROVA N, RIORDAN NH, RICART CM. Mitochondria, Energy and Cancer: The Relationship with Ascorbic Acid. *J Orthomol Med* 2010; **25**: 29-38.
- [24] GUZY RD, SCHUMACKER PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006; **91**: 807-19.
- [25] HALLIWELL B, CHIRICO S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; **57**: 715S-724S.
- [26] HARRISON FE, MAY JM. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med* 2009; **46**: 719-30.
- [27] HATZIMICHAEL E, CROOK T. Cancer epigenetics: new therapies and new challenges. *J Drug Deliv* 2013; **2013**: 529312.
- [28] HEWITSON KS, MCNEILL LA, ELKINS JM, SCHOFIELD CJ. The role of iron and 2-oxoglutarate oxygenases in signalling. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 510-5.
- [29] KIM JE, CHO HS, YANG HS, JUNG DJ, HONG SW, HUNG CF, LEE WJ, KIM D. Depletion of ascorbic acid impairs NK cell activity against ovarian cancer in a mouse model. *Immunobiology* 2012 Sep; **217**: 873-81.
- [30] KONG Q, LIN CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**: 1817-29.
- [31] LARDER R, CHEUNG MK, TUNG YC, YEO GS, COLL AP. Where to go with FTO? *Trends Endocrinol Metab* 2011; **22**: 53-9.
- [32] LEE WJ. The prospects of vitamin C in cancer therapy. *Immune Netw* 2009; **9**: 147-52.
- [33] LEE YC, HUANG HY, CHANG CJ, CHENG CH, CHEN YT. Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 3721-33.

- [34] LIANG WJ, JOHNSON D, JARVIS SM. Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol* 2001; **18**: 87-95.
- [35] LIMA CC, PEREIRA AP, SILVA JR, OLIVEIRA LS, RESCK MC, GRECHI CO, BERNARDES MT, OLÍMPIO FM, SANTOS AM, INCERPI EK, GARCIA JA. Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rats. *Braz J Biol* 2009; **69**: 1195-201.
- [36] LINSTER CL, VAN SCHAFTINGEN E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J* 2007; **274**: 1-22.
- [37] MANDL J, SZARKA A, BÁNHEGYI G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 2009; **157**: 1097-110.
- [38] MAXWELL P, SALNIKOW K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 2004; **3**: 29-35.
- [39] MAY JM, QU ZC, MEREDITH ME. Mechanisms of ascorbic acid stimulation of norepinephrine synthesis in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **426**: 148-52.
- [40] MEISTER A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994; **54**: 1969s-1975s.
- [41] METZEN E. Enzyme substrate recognition in oxygen sensing: how the HIF trap snaps. *Biochem J* 2007; **408**: e5-6.
- [42] MOLE DR, BLANCHER C, COPLEY RR, POLLARD PJ, GLEADLE JM, RAGOISSIS J, RATCLIFFE PJ. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 2009; **284**: 16767-75.
- [43] MORAN GR. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* 2005; **433**: 117-28.
- [44] MORGAN MJ, LIU ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res* 2011; **21**: 103-15.
- [45] MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 2004; **20**: 33-43.
- [46] NAIDU KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2003; **2**: 7.
- [47] OZER A, BRUICK RK. Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nat Chem Biol* 2007; **3**: 144-53.
- [48] PADAYATTY SJ, KATZ A, WANG Y, ECK P, KWON O, LEE JH, CHEN S, CORPE C, DUTTA A, DUTTA SK, LEVINE M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003; **22**: 18-35.
- [49] PARK S, AHN ES, LEE S, JUNG M, PARK JH, YI SY, YEOM CH. Proteomic analysis reveals upregulation of RKIP in S-180 implanted BALB/C mouse after treatment with ascorbic acid. *J Cell Biochem* 2009; **106**: 1136-45.
- [50] PAVLOVIC V, PAVLOVIC D, KOCIC G, SOKOLOVIC D, SARAC M, JOVIC Z. Ascorbic acid modulates monosodium glutamate induced cytotoxicity in rat thymus. *Bratisl Lek Listy* 2009; **110**: 205-9.
- [51] PAVLOVIC V, SARAC M. A short overview of vitamin C and selected cells of the immune system. *Cent Eur J Phys* 2011; **6**: 1-10.
- [52] PAVLOVIC V, SARAC M. The role of ascorbic acid and monosodium glutamate in thymocyte apoptosis. *Bratisl Lek Listy* 2010; **111**: 357-60.
- [53] PETERKOFSKY B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 1135S-1140S.
- [54] PROCKOP DJ, KIVIRIKKO KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 403-34.
- [55] REBOUCHE CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 1147S-1152S.
- [56] RIVAS CI, ZÚÑIGA FA, SALAS-BURGOS A, MARDONES L, ORMAZABAL V, VERA JC. Vitamin C transporters. *J Physiol Biochem* 2008; **64**: 357-75.
- [57] ROTILI D, MAI A. Targeting Histone Demethylases: A New Avenue for the Fight against Cancer. *Genes Cancer* 2011; **2**: 663-79.
- [58] SALNIKOW K, KASPRZAK KS. Ascorbate depletion: a critical step in nickel carcinogenesis? *Environ Health Perspect* 2005; **113**: 577-84.
- [59] SANZARI JK, WAMBI C, LEWIS-WAMBI JS, KENNEDY AR. Antioxidant dietary supplementation in mice exposed to proton radiation attenuates expression of programmed cell death-associated genes. *Radiat Res* 2011; **175**: 650-6.

- [60] SAVINI I, ROSSI A, PIERRO C, AVIGLIANO L, CATANI MV. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* 2008; **34**: 347-55.
- [61] SCHOFIELD CJ, RATCLIFFE PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 343-54.
- [62] SEDGWICK B. Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 148-57.
- [63] SEMENZA GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012; **33**: 207-14.
- [64] SEMENZA GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 721-32.
- [65] SHAY KP, MOREAU RF, SMITH EJ, SMITH AR, HAGEN TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 1149-60.
- [66] SICILIANO G, VOLPI L, PIAZZA S, RICCI G, MANCUSO M, MURRI L. Functional diagnostics in mitochondrial diseases. *Biosci Rep* 2007; **27**: 53-67.
- [67] SILBERMANN E, MOSKAL P, BOWLING N, TONG M, DE LA MONTE SM. Role of aspartyl-(asparaginyl)- β -hydroxylase mediated notch signaling in cerebellar development and function. *Behav Brain Funct* 2010; **6**: 68.
- [68] SUNDHEIM O, TALSTAD VA, VÅGBØ CB, SLUPPHAUG G, KROKAN HE. AlkB demethylases flip out in different ways. *DNA Repair (Amst)* 2008; **7**: 1916-23.
- [69] SZARKA A, TOMASSKOVICS B, BANHEGYI G. The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *Int J Mol Sci* 2012; **13**: 4458-83.
- [70] TIAN X, FANG J. Current perspectives on histone demethylases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; **39**: 81-8.
- [71] TRABER MG, STEVENS JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**: 1000-13.
- [72] VANIER MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 2010; **5**: 16.
- [73] VICTOR VM, ROCHA M, BAÑULS C, BELLOD L, HERNANDEZ-MIJARES A. Mitochondrial dysfunction and targeted drugs: a focus on diabetes. *Curr Pharm Des* 2011; **17**: 1986-2001.
- [74] VISIOLI F, REILLY MM, RIMOLDI M, SOLARI A, PAREYSON D. Vitamin C and Charcot-Marie-Tooth 1A: Pharmacokinetic considerations. *PharmaNutrition* 2013; **1**: 10-12.
- [75] VITU E, KIM S, SEVIER CS, LUTZKY O, HELDMAN N, BENTZUR M, UNGER T, YONA M, KAISER CA, FASS D. Oxidative activity of yeast Ero1p on protein disulfide isomerase and related oxidoreductases of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2010; **285**: 18155-65.
- [76] WILSON JX. Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* 2005; **25**: 105-25.
- [77] YANG CG, GARCIA K, HE C. Damage detection and base flipping in direct DNA alkylation repair. *Chem-biochem* 2009; **10**: 417-23.
- [78] ZANGAR RC, DAVYDOV DR, VERMA S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; **199**: 316-31.

Redaktor prowadzący –

Otrzymano:

Przyjęto:

Tomasz Dziki

Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

ul. Adama Mickiewicza 2C

15-089 Białystok

tel.: (085) 748 55 70

e-mail: tomasz.dziki@umb.edu.pl