

Received: 2008.06.03
Accepted: 2008.07.25
Published: 2008.09.05

Biologiczna rola kwasu D-glukarowego i jego pochodnych; potencjalne zastosowanie w medycynie

The biological role of D-glucaric acid and its derivatives: Potential use in medicine

Robert Żółtaszek¹, Margaret Hanausek¹, Zofia M. Kiliańska²,
Zbigniew Walaszek¹

¹ University of Texas Health Science Center, Department of Pharmacology, San Antonio, TX, USA

² Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie

Kwas D-glukarowy jest naturalnym, nietoksycznym związkiem wytwarzanym w niewielkich ilościach w wątrobie i skórze przez ssaki, w tym ludzi. U ssaków kwas D-glukarowy i D-glukaro-1,4-lakton są końcowymi produktami przemiany kwasu D-glukuronowego. Enzym dehydrogenaza D-glukurono-laktonu katalizuje utlenianie laktonu kwasu D-glukuronowego do D-glukaro-1,4; 6,3-dilaktonu. Dilakton w roztworach wodnych samoistnie hydrolizuje, m.in. do D-glukaro-1,4-laktonu, który jest silnym inhibitorem β -glukuronidazy. Kwas D-glukarowy występuje również w wielu owocach i warzywach z najwyższymi stężeniami w grejpfrutach, jabłkach, pomarańczach i warzywach krzyżowych. β -glukuronidaza znajduje się w krążeniu i prawdopodobnie we wszystkich tkankach kręgowców i odpowiada za hydrolizę koniugatów kwasu glukuronowego. Enzym ten jest także wytwarzany przez mikroflorę jelitową. Podwyższona aktywność β -glukuronidazy jest związana ze zwiększonym ryzykiem występowania różnych nowotworów, zwłaszcza hormonozależnych, takich jak nowotwory piersi i prostaty. D-glukaro-1,4-lakton zwiększa detoksykację kancerogenów i promotorów nowotworów przez zapobieganie hydrolizie ich glukuronidów. D-glukaro-1,4-lakton powstaje w żołądku po podaniu soli kwasu D-glukarowego i jest absorbowany w przewodzie pokarmowym. Następnie jest transportowany z krwią do różnych narządów wewnętrznych i ostatecznie wydalany z moczem, a w mniejszej ilości z żółcią. Przeciwnowotworowa aktywność D-glukaro-1,4-laktonu i jego prekursorów wynika w części z działania zmieniającego proces steroidogenezy, czemu towarzyszy modyfikacja środowiska hormonalnego i statusu proliferacyjnego narządów docelowych. D-glukarany nie tylko zmniejszają proliferację komórek i stan zapalny, ale również indukują apoptozę. Poprzez suplementację D-glukaranów można wpływać na naturalne mechanizmy obronne organizmu przed działaniami kancerogenów i promotorów nowotworów.

Słowa kluczowe:

kwas D-glukarowy • D-glukaro-1,4-lakton • β -glukuronidaza • nowotwory • stan zapalny • apoptoza • stres oksydacyjny

Summary

D-glucaric acid is a natural non-toxic compound produced in small amounts by mammals, including humans. In mammals, D-glucaric acid and D-glucaro-1,4-lactone are end-products of the D-glucuronic acid pathway. The enzyme D-glucuronolactone dehydrogenase has been found to be responsible for the oxidation of the lactone of D-glucuronic acid to D-glucaro-1,4;6,3-dilactone. This dilactone hydrolyzes spontaneously in aqueous solution to D-glucaro-1,4-lactone, a potent

β -glucuronidase inhibitor. D-glucaric acid is also found in many fruits and vegetables, with the highest concentrations found in grapefruits, apples, oranges, and cruciferous vegetables. β -glucuronidase is present in the circulation and probably all vertebrate tissues and is capable of hydrolyzing glucuronide conjugates. This enzyme is also produced by colonic microflora. Elevated β -glucuronidase activity is associated with an increased risk for various cancers, particularly hormone-dependent cancers such as breast and prostate cancer. D-glucaro-1,4-lactone increases detoxification of carcinogens and tumor promoters by inhibiting β -glucuronidase and preventing the hydrolysis of their glucuronides. D-glucaro-1,4-lactone was found to be formed from supplemented D-glucarate salt in the stomach and it is absorbed from the intestinal track, transported with the blood to different internal organs, and excreted in urine and, to a lesser extent, in bile. D-glucaro-1,4-lactone and its precursors exert their anticancer action in part through alterations in steroidogenesis accompanied by changes in the hormonal environment and proliferative status of the target organs. D-glucarates not only suppress cell proliferation and inflammation, but also induce apoptosis. By supplementing D-glucarates, one can favor the body's natural defense mechanism for eliminating carcinogens and tumor promoters and their effects.

Key words: D-glucaric acid • D-glucaro-1,4-lactone • β -glucuronidase • cancers • inflammation • apoptosis • oxidative stress

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=868348>

Word count: 4945

Tables: 1

Figures: 3

References: 93

Adres autorki: prof. dr hab. Zofia M. Kiliańska, Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytochemii, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **1,4-GL** – D-glukaro-1,4-lakton; **6,3-GL** – D-glukaro-6,3-lakton; **AAF** – 2-acetyloaminofluoren; **B[a]P** – benzo[a]piren; β **G** – β -glukuronidaza; **CaG** – D-glukaran wapnia; **DAGDL**, **aceglaton** – 2,5-di-O-acetylo-D-glukaro-1,4;6,3-dilakton; **DEN** – dietylnitrozamina; **DMBA** – 7,12-dimetylo-benzo[a]antracen; **FANFT** – N-[4-(5-nitro-2-furylo)-2-tiazolylo]formamid; **GA** – kwas D-glukarowy; **GDL** – D-glukaro-1,4;6,3-dilakton; **GUL** – lakton kwasu D-glukuronowego; **MNU** – N-metylo-N-nitrozo-mocznik; **ODC** – dekarboksylaza ornitynowa; **PB** – fenobarbital sodu; **PHG** – kwaśny D-glukaran potasu; **TPA** – 13-octan-12-O-tetradekanoilo-forbolu.

WPROWADZENIE

W 1949 r. w laboratorium angielskiego enzymologa Levvy'ego [33] stwierdzono, że wodne roztwory kwasu D-glukarowego (GA) hamują aktywność ważnego enzymu z rodziny glikozydaz, tj. β -glukuronidazy (β G). W trzy lata później Levvy [36], prowadząc badania nad wpływem laktonów kwasu D-glukarowego na ten enzym wykazał, że hamowanie β G jest związane z obecnością w tych roztworach D-glukaro-1,4-laktanu (1,4-GL). Następnie przedstawiono wyniki potwierdzające, że lakton powstaje w organizmach ssaków z kwasu D-glukuronowego i jest naturalnym inhibitorem β G [41]. W kolejnych doświadczeniach [15] ujawniono, że β G – oprócz udziału w detoksykacji organizmu – pełni ważną rolę czynnika sterującego swoistym mechanizmem regulacyjnym, który zabezpiecza w organizmie niezbędne stężenie odpowiednich hormonów i innych związków biologicznie czynnych w różnych tkankach i płynach ustrojowych, przy czym odnosi się to także do związków wprowadzonych do organizmu z zewnątrz, w tym leków. Nadmiar tych substancji, jak również wiele toksyn, jest wydalany z organizmu w postaci glukuronidów, najczęściej z moczem. Zakłócenie powyższego mechanizmu

w wyniku wzrostu aktywności β G prowadzi do nadmiernej hydrolizy glukuronidów i zatrucia organizmu, jeśli nie włączy się dodatkowy mechanizm hamujący aktywność tego enzymu. Inhibitorem β G okazał się właśnie 1,4-GL. Na tym etapie badań stało się oczywiste, że zakłócenie metabolizmu kwasu glukuronowego, przejawiające się hamowaniem syntezy inhibitora β G, prowadzić może do wzrostu jej aktywności i zatrucia organizmu. Wśród chorób, które charakteryzują się dużą aktywnością β G należy wymienić cukrzycę, reumatoidalne zapalenie stawów, zatrucie ciężowe, choroby serca, a przede wszystkim choroby nowotworowe. Wyniki badań ujawniły również, że tkankę nowotworową cechuje szczególnie duża aktywność β G [15]. Uważa się, że zaburzenie procesu glukuronidacji jest zmianą charakterystyczną dla organizmów, w których zidentyfikowano obecność guzów nowotworowych [31,67].

Boyland i wsp. [5] jako pierwsi zastosowali 1,4-GL w leczeniu nowotworów podając go doustnie chorym na raka pęcherza moczowego. Badacze ci odnotowali znaczny spadek aktywności β G w ich moczu, w porównaniu z wartością u pacjentów przed podaniem tego związku. Spadek aktywności β G prowadził do zmniejszenia szybkości hydrolizy glu-

kuronidów, a zwłaszcza koniugatów kwasu glukuronowego ze związkami rakotwórczymi. Wyniki tych badań wskazały na zasadność podawania 1,4-GL profilaktycznie pracownikom przemysłu farbiarskiego, narażonym na działanie rakotwórczych amin aromatycznych i zapadającym w związku z tym często na raka pęcherza moczowego, a także rekonwalescentom w celu zapobieżenia nawrotom choroby. Jednakże przeprowadzone przez Boylanda i wsp. [5] próby leczenia, nie dostarczyły jednoznacznych wyników. Okazało się, że tylko u 30% pacjentów, którym podawano doustnie 1,4-GL nie stwierdzono nawrotu nowotworu.

Badania na modelach zwierzęcych [25] ujawniły, że *in vivo*, D-glukaro-1,4;6,3-dilakton (GDL) jest znacznie silniejszym inhibitorem β G niż 1,4-GL. W połowie lat sześćdziesiątych XX w. doniesiono [30], że diacetylowa pochodna dilaktanu kwasu D-glukarowego, tj. 2,5-di-O-acetylo-D-glukaro-1,4;6,3-dilakton (DAGDL – Aceglaton) podawany doustnie myszom wykazuje znacznie przedłużone działanie inhibicyjne w porównaniu z GDL.

Yonese i wsp. [90] zastosowali obydwa wymienione związki, a także sól sodową 1,4-GL w leczeniu raka pęcherza moczowego. Wyniki obserwacji ujawniły, że preparaty te podawane doustnie rekonwalescentom zapobiegają skutecznie nawrotom choroby. Okazało się, że wstrzykiwanie roztworów soli sodowej 1,4-GL bezpośrednio do tkanki nowotworowej hamuje jej wzrost i prowadzi do całkowitego jej zaniku. Ponadto odnotowano, że pochodne 1,4-GL hamują nie tylko aktywność β G, ale także urokinazy i lizozymu, wzmożoną w przypadku raka pęcherza moczowego. Na podkreślenie zasługuje to, że po zastosowaniu wyżej wymienionych związków dochodzi do normalizacji poziomu aktywatora plazminogenu. Podobnie zaobserwowano powrót prawidłowego stężenia witaminy B₆ wyrażnie obniżonego u chorych, co jest związane z zaburzeniami w metabolizmie tryptofanu. Należy odnotować, że japoński koncern farmaceutyczny Chugai wprowadził DAGDL, pod nazwą Aceglaton lub Glukaron, na listę czynników przydatnych w leczeniu raka pęcherza moczowego [32].

Pochodne GA próbowano również zastosować w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów [50]. Wykazano ponadto, że prekursor 1,4-GL, tj. D-glukuronolakton, zapobiega krzepnięciu krwi [14]. Pionierskie próby aplikacji pochodnych GA w hamowaniu karcynogenezy ograniczały się do modelu raka pęcherza moczowego. Wnikliwe badania wykazały jednak, że kwaśne pH moczu sprzyja nieenzymatycznej hydrolizie glukuronidów kancerogennych metabolitów amin aromatycznych [4], co ogranicza ich aktywność jako inhibitora β G oraz czynnika hamującego indukcję i rozwój procesu nowotworowego w pęcherzu moczowym. Stąd zastosowanie DAGDL [82] oraz D-glukaranu wapnia (CaG) w hamowaniu chemicznie indukowanej karcynogenezy gruczołu mlecznego samicy szczura stanowiło przełom w rozwoju badań nad zastosowaniem pochodnych GA w profilaktyce i leczeniu chorób nowotworowych [68,69,80].

PROCES GLUKURONIDACJI I JEGO SPECYFIKA

Glukuronidacja jest głównym procesem koniugacji zachodzącym u kręgowców [16]. Kancerogeny i ich aktywne metabolity również wykazują zdolność do reakcji glukuronidacji [68,69]. Wśród kancerogenów ulegających temu

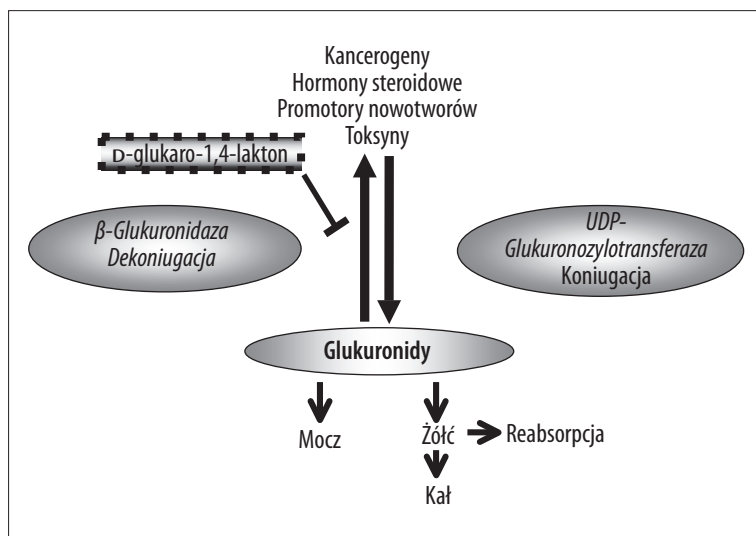
procesowi są m.in. policykliczne aromatyczne węglowodory, nitrozoaminy, aminy aromatyczne i toksyny grzybów. Niektóre promotory procesu nowotworowego, takie jak hormony steroidowe również ulegają glukuronidacji (ryc. 1). Reakcje glukuronidacji są niezwykle ważne w usuwaniu z organizmu ksenobiotyków w tzw. fazie II detoksykacji. Wtedy zwykle po wstępnej hydroksylacji katalizowanej przez enzymy z rodziny monooksygenaz (lub enzymy grupy cytochromu P-450), tzw. faza I, ksenobiotyki ulegają wydalaniu przez sprzęganie m.in. z kwasem glukuronowym, siarczanami czy glutationem. Opisane przemiany, często niebezpiecznych związków toksycznych oraz metabolitów leków doprowadzają do zwiększenia ich polarności ułatwiającej ich wydalanie z organizmu z moczem lub żółcią. Enzymem odpowiedzialnym za glukuronidację jest UDP-glukuronozylotransferaza występująca w wielu odmiatach w retikulum endoplazmatycznym i błonach jądrowych [6]. Jej obecność w błonach jądrowych stanowi barierę chroniącą materiał genetyczny przed wnikaniem do jąder komórkowych różnych związków chemicznych mogących doprowadzić do jego uszkodzenia. Eliminacja lub inaktywacja potencjalnie niebezpiecznych związków chemicznych, które ulegają glukuronidacji nie zależy tylko od szybkości koniugacji z kwasem glukuronowym, ale także od tempa dekonjugacji, która przebiega z udziałem β G.

Znanym, już prawie od dwóch dekad, bardzo efektywnym naturalnym inhibitorem β G jest 1,4-GL. Stąd wspomniana zdolność hamowania aktywności β G przez naturalnie występujący 1,4-GL budzi nadzieję na wykorzystanie jego właściwości. Lakton ten nie wpływa na UDP-glukuronozylotransferazę, ale dzięki hamowaniu β G zwiększa glukuronidację [68,69]. Związki chemiczne, ksenobiotyki po utworzeniu glukuronidów zwiększają swoją polarność i są łatwo usuwane z żółcią czy moczem. Glukuronidacja prowadzi do całkowitej eliminacji lub znacznego zmniejszenia toksyczności, bądź farmakologicznej aktywności aglikonów. Wydalanie glukuronidów z moczem (ryc. 1) jest ich nieodwracalną eliminacją z naszego organizmu. Natomiast glukuronidy wydalone z żółcią mogą częściowo ulec reabsorpcji w jelitach dzięki obecności β G pochodzenia bakterieryjnego, która powoduje ich hydrolizę [23,68,69].

β -GLUKURONIDAZA I JEJ ZNACZENIE

W organizmie człowieka występują dwie postaci β -glukuronidazy, tj. endogenna i bakteryjna [15,36,37]. Pierwsza – pochodzi z ludzkich tkanek, natomiast druga – z bakterii, takich jak: *Escherichia coli*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* czy *Clostridia* zasiedlających jelita. Wzrost aktywności bakteryjnej β G powoduje zwiększoną dekonjugację glukuronidów sprzężonych z toksynami, hormonami steroidowymi, lekami czy kancerogenami, wydzielanymi z żółcią [23,68,69]. Hydroliza glukuronidów może zachodzić również w innych tkankach, w których występuje β G, m.in. wątroba, nerki, śledziona, nabłonek jelitowy, a także w narządach endokrynnych i reprodukcyjnych [69].

U zwierząt eksponowanych na różne toksyny, kancerogeny i dym tytoniowy stwierdzono wzrost β G w surowicy krwi. Warto podkreślić, że u osobników pozostających na niskokalorycznej diecie obserwuje się zmniejszoną aktywność β G w surowicy krwi obwodowej [56]. Poziom β G wzrasta u mężczyzn, począwszy od 25 do 60 roku życia, w porów-



Ryc. 1. Wpływ D-glukaro-1,4-laktonu (a także D-glukaranu wapnia) na detoksykację związków chemicznych i biologicznych

naniu z tym obserwowanym u kobiet, z wyjątkiem kobiet w ciąży lub osób mających kontakt z toksynami i kancerogenami. Podwyższony poziom β G obserwuje się w wielu różnych chorobach, w tym w nowotworach. Analizy porównawcze wykazały, że wzrost poziomu β G w surowicy krwi pacjentów z chorobami nowotworowymi zależy od rodzaju nowotworu i stopnia jego zaawansowania. Okazało się, że wyższy poziom β G w płynie mózgowo-rdzeniowym pozytywnie koreluje z występowaniem nowotworów ośrodkowego układu nerwowego [68].

W przypadku nowotworów pęcherza moczowego β G uwolniona do moczu hydrolizuje glukuronidy utworzone przez metabolity amin aromatycznych, uwalniając aktywne kancerogeny, które oddziałują z tkankami pęcherza moczowego. Hydroliza glukuronidów może także zachodzić w moczu (kwaśny odczyn) bez udziału β G [4]. Rodzaj stosowanej diety wpływa na aktywność bakteryjnej β G w jelitach [57], a to z kolei może wpływać na rozwój nowotworów jelita grubego, a także w innych narządach/tkankach, np. nowotwory gruczołów piersiowych. Aktywność bakteryjnej β G w jelitach osób pozostających na diecie bogatej w mięso jest znacząco większa w porównaniu z osobami na diecie bezmięsnej (wegetariańskiej). Wyniki obserwacji wykazały, że w płynie pozyskanym z torbali gruczołów piersiowych odnotowano negatywną korelację pomiędzy zawartością glukuronidów estradiolu a poziomem β G [45]. Należy podkreślić, że u kobiet z nowotworami piersi wykazano pozytywną korelację między aktywnością β G a poziomem receptorów estrogenowych. W modelu zwierzęcym znaleziono także pozytywną korelację między podatnością na nowotwory, a aktywnością β G i poziomem hormonów steroidowych [68,69,81].

Na aktualnym etapie badań wydaje się, że możliwość hamowania β G podczas chemicznie indukowanej kancerogenezy przez związki mogące tworzyć glukuronidy może się okazać cenną ochroną w walce z nowotworami człowieka [23,26,68,69,76].

LIZOSOMY I β -GLUKURONIDAZA

Uwalnianie enzymów lizosomalnych jest zwykle związane z ogólnym stanem zapalnym [22]. W warunkach

umiarkowanego stresu oksydacyjnego [64] obserwuje się pęknięcia części lizosomów, którym towarzyszy postępująca apoptoza i dalsza utrata nienaruszonych lizosomów. Wypływ do cytoplazmy enzymów hydrolitycznych z lizosomów jest ważnym procesem towarzyszącym apoptozie [64]. W stanach zapalnych β G jest uwalniana z granulocytów, w tym z neutrofilów [42]. Stężenie prozapalnych cytokin w surowicy, m.in. interleukiny 1 (IL-1) czy białka c-reaktywnego (CRP) bardzo dobrze korelują z aktywnością β G w surowicy pacjentów z zaburzeniami układu immunologicznego [64]. Wyniki doświadczeń grupy Furuno [21] ujawniły, że 1,4-GL okazuje znaczną zdolność inhibicji uwalniania enzymów z lizosomów i skutecznej ich stabilizacji, wyższej niż kwas salicylowy i fenylobutazon, badanych w dużej rozpiętości stężeń. Stabilizację lizosomów wykazują również pochodne GA, takie jak GDL, DAGDL, a w mniejszym stopniu D-glukaro-6,3-lakton (6,3-GL). Zdolność stabilizacji lizosomów przez pochodne GA wiąże się z ich efektem przeciwzapalnym, ponieważ struktury te i uwalniane z nich enzymy pełnią ważne funkcje w procesie zapalnym [21].

WYSTĘPOWANIE I ŹRÓDŁA KWASU GLUKAROWEGO

Kwas D-glukarowy stanowi naturalny, nietoksyczny związek powstający w niewielkich ilościach w organizmach ssaków, w tym człowieka. Związek ten i jego pochodne występują w owocach i warzywach. W laboratorium współautorów niniejszego przeglądu [86] zaadoptowano metodę enzymatycznej konwersji GA do pirogronianu, dzięki której oszacowano dużą zawartość tego związku w wielu owocach cytrusowych, jabłkach i warzywach (tab. 1).

Na przykładzie *Phaseolus aureus*, *Euphorbia canariensis* i *Larix decidua* (młode igły) wykazano, że w roślinach GA powstaje przez utlenienie kwasu glukuronowego. Szczegółowe analizy wykazały, że w młodych igłach modrzewia utlenianie kwasu glukuronowego do GA zachodzi łatwo, podczas gdy w starszych igłach ten szlak metaboliczny jest mniej aktywny [86]. Wcześniej wykryto GA lub jego pochodne w lateksie wytwarzanym przez sukulent, w kielkach fasoli, kielkach i igłach drzew iglastych, w łodygach i liściach różnych sukulentów, a także w li-

Tabela 1. Zawartość GA w owocach i warzywach oznaczona metodą konwersji kwasu D-glukarowego do pirogronianu

Zawartość kwasu D-glukarowego [g/kg]			
Owoce		Warzywa	
grejpfrut	3,60±0,15	kaktus jadalny	3,49±0,17
jabłko (Macintosh)	3,45±0,14	kiełki alfalfa	3,45±0,16
jabłko (Granny Smith)	3,36±0,14	brokuły	3,40±0,13
jabłko (Red Delicious)	2,26±0,13	kiełki fasolki azuki	2,78±0,10
słodka wiśnia	1,43±0,06	brukselka	2,67±0,14
morela	1,39±0,05	pomidor	2,09±0,12
pomarańcza (bez skórki)	1,29±0,04	kalafior	1,79±0,15
cytryna (bez skórki)	1,03±0,04	kiełki fasoli	1,46±0,17
gruszka	0,53±0,02	szpinak	1,12±0,06
brzoskwinia	0,23±0,01	zielona papryka	0,99±0,04
śliwka	0,21±0,01	seler	0,99±0,05
winogrono czerwone	0,13±0,01	kapusta	0,89±0,14
winogrono białe	0,11±0,01	sałata	0,11±0,01
		ziemniak	~0,001
		ogórek	~0,001
		kukurydza	~0,001
		marchew	~0,001

Wyniki uzyskano przynajmniej z 4 owoców lub soku pochodzącego z warzyw i podano jako wartości średnie ± błąd standardowy [86].

ściach pomidorów. Zawartość GA (tab. 1) w warzywach waha się od 0,1 g/kg w sałacie do 1,0 g/kg w kapuście, selerze, zielonej papryce i szpinaku, 2,0 g/kg w pomidorach, 2,7 g/kg w brukselkach i 3,5 g/kg w brokułach i kaktusach jadalnych. W owocach zawartość GA wynosi od 0,1 g/kg w winogronach białych i czerwonych, 0,5 g/kg w gruszkach i około 1,2 g/kg w cytrynach i pomarańczach do ok. 3,5 g/kg w jabłkach i grejpfrutach. Ocenia się, że dobowe spożycie GA przy diecie uwzględniającej owoce i warzywa wynosi około 0,5 g/kg, natomiast w diecie wegetariańskiej nawet powyżej 1 g/kg [86].

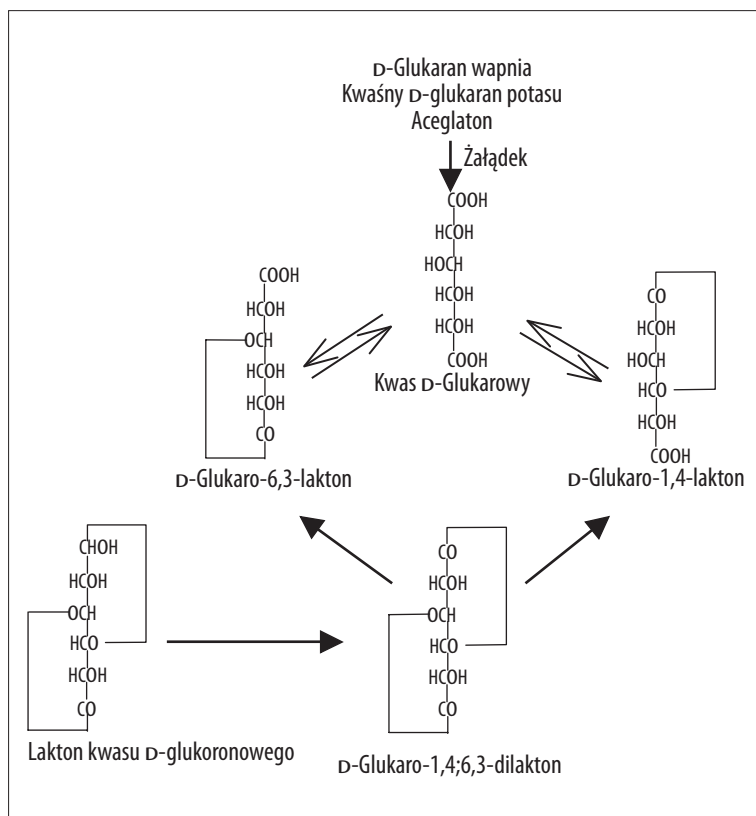
BIOSYNTeza I WYDALANIE KWASU GLUKAROWEGO; FARMAKOKINETYKA D-GLUKARANÓW

U ssaków D-glukaro-1,4-lakton (1,4-GL) i GA stanowią końcowe produkty przemiany kwasu D-glukuronowego [15,16,36,41]. Dehydrogenaza D-glukuronolaktonu odpowiada za utlenianie laktonu D-glukuronowego (GUL) do GDL w wątrobie człowieka i szczura, a także w skórze myszy [36]. D-glukaro-1,4;6,3-dilakton w roztworach wodnych ulega spontanicznej hydrolizie do 1,4-GL – bardzo efektywnego inhibitora β G; 6,3-GL, który nie wykazuje właściwości hamowania aktywności β G oraz GA (ryc. 2).

Po przyjęciu drogą pokarmową np. glukaranu wapnia (CaG) lub kwaśnego glukaranu potasu (PHG) w kwaśnym środowisku żołądka związek ten zostaje przekształcony w GA. W żołądku i dalszej części przewodu pokarmowego GA jest dalej metabolizowany. Określono, że w wodnym środowisku ustala się równowaga trzech współwystępujących związków, tj. D-glukaro-1,4-lakton (30%), D-glukaro-6,3-lakton (30%) i GA (40%) [29]. W różnych częściach przewodu pokarmowego proporcje tych związków są zmienne w zależności od pH. Po wchłonięciu związki te dostają się do krwi i są transportowane do różnych narządów. Ich wydalanie odbywa się przez żółć/kał i mocz [11,41,87].

W badaniach przeprowadzonych na szczurach, którym podawano doustnie kwaśny glukaran potasu (PHG), znakowany ^{14}C w dawce 1,5 mM/kg m.c., odnotowano jego wydalanie w 70% z moczem w ciągu 24 godzin [87]. W tym czasie z kałem zostało wydalone tylko 4%. Wyniki tych badań wskazują niezbicie, że w żołądkach modelowych zwierząt dochodzi do konwersji PHG do GA, 1,4-GL i 6,3-GL. W 1,4-GL występowało mniej niż 10% radioaktywności. Pozostała radioaktywność wprowadzonego PHG uległa absorpcji w postaci 6,3-GL i GA w różnych tkankach szczura. Podobne wyniki otrzymano analizując metabolizm, wchłanianie i wydalanie innej soli GA – glukaranu wapnia (CaG). Po doustnym podaniu szczurom CaG (znakowanego ^{14}C) w ich żołądkach zidentyfikowano GA, 6,3-GL i 1,4-GL, powstające z CaG. Metabolity radioaktywnego CaG są wchłaniane w jelitach, skąd są transportowane z krwią do różnych narządów wewnętrznych (zaobserwowano pewne różnice w porównaniu z rozmieszczeniem metabolitów PHG). Niezmieniony CaG jest wydalany z organizmu głównie z kałem, a metabolity (GA, 1,4-GL i 6,3-GL) z moczem [72].

Analizy poziomu GA w moczu pacjentów z nowotworami, a także w moczu szczurów z guzami nowotworowymi ujawniły, że stężenie tego związku jest znacząco mniejsze niż u zdrowych ludzi i zwierząt kontrolnych [89]. Okazało się, że nieuczestniczącą w procesie nowotworzenia wątrobę myszy z wywołanymi eksperymentalnie guzami i nowotwory człowieka cechuje niższy poziom GA [37]. W tkance nowotworowej dochodzi do blokady szlaku syntezy GA. Jak dotąd funkcja fizjologiczna GA nie jest w pełni poznana. Powstawanie 1,4-GL – inhibitora β G z jednego z produktów reakcji hydrolitycznej GA można uważać za mechanizm sprzężenia zwrotnego [15,68,69]. Prawidłowe stężenie GA w surowicy kobiet wynosi 1,42±0,5 μM , a u mężczyzn – 1,50±0,29 μM . U pacjentów z nowotworami poziom GA w surowicy spada poniżej 1 μM [77]. U palaczy tytoniu stwierdzono



Ryc. 2. Tworzenie *in vivo* D-glukaro-1,4-laktonu poprzez utlenianie laktonu kwasu D-glukuronowego

obniżenie poziomu GA, zwłaszcza u tych, u których wykryto obecność mutacji onkogenu *K-ras*, uważanych za wskaźnik wysokiego ryzyka zachorowania na raka płuca [23,76]. Stężenie w surowicy endogennego 1,4-GL można podnieść na krótko przez suplementację 1,4-GL [83]. Aby przedłużyć działanie 1,4-GL należy podać syntetyczny prekursor 1,4-GL, np. DAGDL [30,82,83] lub CaG [80,81,83]. D-glukaran wapnia podany doustnie rozpuszcza się powoli w kwaśnym pH żołądka i ulega konwersji do GA. Przyjmowane w diecie pochodne kwasu glukarowego mogą w sposób ciągły dostarczać 1,4-GL i przedłużać hamowanie aktywności βG.

Wyniki obserwacji klinicznych wskazują, że chorobom takim jak alkoholizm, wczesne stadia chorób nerek u dzieci, choroby wątroby towarzyszy wzrost wydalania GA. Natomiast zmniejszone wydalanie GA zaobserwowano u pacjentów z niewydolnością zastoinową serca, podczas głodzenia, w ostrych oparzeniach i fawizmie [23].

Uważa się, że magazynowanie w organizmie wolnych aglikonów, zwykle wydalanych jako glukuronidy, może wzmacniać się zarówno przez wzrost aktywności βG, jak również przez zmniejszoną syntezę 1,4-GL. Stąd, w celu zmniejszenia uwalniania toksycznych aglikonów z ich kompleksów z glukuronidami, proponuje się chorym podawanie 1,4-GL [5] lub prekursorów 1,4-GL [30,80,82,90]. Wiadomo, że 1,4-GL zmniejsza czas farmakologicznej aktywności pewnych leków wydalanych z żółcią w postaci glukuronidów [10,40]. Doniesiono, że dodwunastnicza infuzja monoglukaranu stilbestrolu z 1,4-GL wyraźnie ograniczała absorpcję i krążenie wątrobowo-jelitowe stilbestrolu [10]. Poczyniona obserwacja wydaje się mieć istotne znacze-

nie, gdyż wiele ksenobiotyków – w tym karcynogeny, promotory nowotworów – przechodzi drogę detoksykacji podobną jak stilbestrol.

WPLYW D-GLUKARANÓW NA STĘŻENIE CHOLESTEROLU

Na uwagę zasługują wyniki badań zespołu Walaszka [86] ujawniające, że pochodne kwasu glukarowego (CaG, PHG) funkcjonują jako naturalne regulatory biosyntezy cholesterolu i steroidogenezy [86]. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na samicach szczurów (44-dniowe szczury szczepu Sprague-Dawley) pozostających na diecie AIN-76A, którym podawano ww. pochodne GA (17,5 milimoli lub 35 milimoli/kg diety) przez 4 lub 8 tygodni wykazały zmiany w stężeniu całkowitego cholesterolu, jak i frakcji lipoprotein o małej gęstości – LDL. D-glukaran wapnia o stężeniu 17,5 milimoli/kg diety obniżał cholesterol w surowicy zwierząt około 10% ($p < 0,05$), a 35 milimoli/kg o około 14% ($p < 0,002$). Większe stężenie CaG w stosowanej diecie powodowało spadek LDL o około 30% ($p < 0,05$). Z kolei PHG dodany do standardowej diety w ilości 17,5 i 35 milimoli/kg diety przyczyniał się do spadku stężenia LDL odpowiednio o 12% ($p < 0,05$) i 35% ($p < 0,02$). Zastosowane związki nie wpływały znacząco na poziom triglicerydów i frakcję lipoprotein o dużej gęstości – HDL w surowicy badanych grup zwierząt.

Istotne ustalenie, że 1,4-GL wpływa na poziom cholesterolu i steroidogenazy sugeruje możliwość regulacji replikacji DNA oraz proliferacji komórek zarówno prawidłowych, jak i zmienionych nowotworowo poprzez zmiany biosyntezy cholesterolu i jego wykorzystania jako substratu w powstawaniu kwasów żółciowych i hormonów steroidowych, a także ich rozmieszczeniu w różnych tkankach. Procesy te

mogą odpowiadać za zmiany poziomu estradiolu i innych hormonów steroidowych i ich wydalanie w postaci glukuronidów [80,81]. W tym miejscu należy podkreślić, że krążenie wątrobowo-jelitowe oraz usuwanie kwasów żółciowych i innych produktów metabolizmu cholesterolu pozostaje pod wpływem jelitowej flory bakteryjnej [55].

Wyniki obserwacji wykazały, że szybkość eliminacji kwasu cholowego ulega ograniczeniu u szczurów pozbawionych flory bakteryjnej [59]. Z kolei odnotowano również, że 1,4-GL spowalnia wydalanie obojętnych steroidów, w czym przypomina działanie neomycyny [10].

WPLYW POCHODNYCH KWASU D-GLUKAROWEGO NA KARCINOGENEZĘ

Karcynogeneza jest złożonym, wieloetapowym procesem. Nowotwory rozwijają się poprzez kolejno występujące fazy, tj. inicjację, promocję i progresję. Zwykle fazy nowotworzenia przebiegają w dużych odstępach czasowych, w wyniku nagromadzenia się wielokrotnych defektów genetycznych [20,76].

W literaturze opisano skutki działania 1,4-GL i jego prekursorów wskazując na ich udział w kontroli różnych stadiów rozwoju nowotworów. Mechanizm przeciwnowotworowego działania tych związków wydaje się głównie związany z modyfikacją środowiska hormonalnego organizmu i statusu proliferacyjnego narządów docelowych, z ich zdolnością do neutralizacji karcynogenów i promotorów nowotworowych, zmniejszania onkogennych mutacji oraz zdolnością zmniejszania stanu zapalnego i indukcji apoptozy komórek nowotworowych [23,68,69,73,76,79,92,93].

Wyniki licznych doświadczeń z wykorzystaniem tzw. „krótko-”, i „długoterminowych” modeli zwierzęcych karcynogenezy dostarczyły danych wskazujących na możliwość kontroli różnych jej stadiów przez 1,4-GL oraz jego prekursor: DAGDL, CaG i PHG.

Wśród głównych efektów działania 1,4-GL i jego prekursorów należy wymienić:

- hamowanie wiązania do DNA kancerogenów, m.in. 7,12-dimetylobenzo[*a*]antracenu (DMBA) [82], benzo[*a*]pirenu (B[*a*]P) [84] i *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika (MNU) [85] w gruczołach mlecznych i innych narządach szczura, (B[*a*]P) w płucach i wątrobie myszy [81] i *N*-[4-(5-nitro-2-furylo)-2-tiazoilo]formamidu (FANFT) w wątrobie szczura [48],
- zmniejszanie onkogennych mutacji w onkogenach, takich jak *K-ras* i *Ha-ras* [23,76],
- ograniczenie poziomu syntezy białka nowotworowo-płodowego – p65 przez kancerogeny ulegające glukuronidacji [82,83,84],
- hamowanie syntezy DNA i proliferacji komórek gruczołów mlecznych szczura [74], jelita grubego szczura [47] i pęcherza moczowego szczura [46],
- spadek ekspresji dekarboksylazy ornitynowej (ODC) w skórze myszy SENCAR indukowanych TPA [73],
- inhibicję *in vitro* zmian preneoplastycznych w gruczołach mlecznych myszy indukowanych DMBA [44],
- hamowanie *in vitro* transformacji nowotworowej komórek nabłonkowych tchawicy szczura wywołanych (B[*a*]P) [65],

- ograniczanie rozwoju nowotworów gruczołów mlecznych szczura indukowanych DMBA [1,2,80,82] i MNU [85] w fazie inicjacji i/lub promocji/progresji,
- inhibicję fazy inicjacji i/lub promocji/progresji procesu nowotworzenia jelita grubego szczura po podaniu azoksymetanu [18,47,66,91],
- blokowanie zmian preneoplastycznych wątroby szczura indukowanych azoksymetanem [53],
- hamowanie fazy inicjacji i/lub promocji/progresji karcynogenezy wątroby szczura inicjowanej za pomocą dietylonitrozaminy (DEN) oraz po podaniu fenobarbitalu sodu (PB) jako promotora [54],
- hamowanie fazy inicjacji i/lub promocji/progresji karcynogenezy skóry myszy inicjowanej za pomocą DMBA oraz po podaniu TPA jako promotora [17,68,69,73],
- inhibicję procesu nowotworzenia pęcherza moczowego szczura po indukcji acetyloaminofluorenu (AAF) [46] oraz rozwoju gruczolaka płuc indukowanego (B[*a*]P) [81], 1-nitropirenem [83] lub uretanem [68,69],
- ograniczenie wzrostu *in vitro* komórek nowotworu piersi człowieka linii MCF-7 [75],
- hamowanie wzrostu eksperymentalnych nowotworów myszy [7],
- inhibicję wzrostu rozwiniętych nowotworów gruczołów mlecznych szczura wywołanych DMBA [3,70],
- ograniczenie rozwoju przeszczepialnych gruczolakoraków prostaty szczura [24],
- zmniejszanie stanu zapalnego i indukcję apoptozy w procesie karcynogenezy płuc myszy indukowanym (B[*a*]P) [79,92,93] oraz w procesie karcynogenezy skóry myszy wywołanym DMBA [73].

Wyniki doświadczeń sugerują, że 1,4-GL i jego prekursorzy – *in vivo* inhibitory β G wykazują podobną skuteczność inhibicji karcynogenezy w fazie inicjacji i promocji/progresji [69]. Blokery tego enzymu mogą być mniej skuteczne w hamowaniu rozwoju już zaawansowanych stanów nowotworów złośliwych z wyjątkiem niektórych nowotworów hormonozależnych [70,80]. Inhibitory tego ważnego enzymu mogą zmienić gospodarkę hormonalną gospodarza przez obniżenie poziomu hormonów steroidowych, co wykazano w przypadku estradiolu [80,85], progesteronu [80,85], testosteronu [24], czy niektórych hormonów białkowych, np. prolaktyny [80,85], pozostających przynajmniej częściowo pod kontrolą hormonów o naturze steroidów. Na podstawie wyników dotychczasowych badań można oczekiwać, że 1,4-GL i jego prekursor CaG wpływają na spadek poziomu receptorów estrogeny i progesteronu w chemicznie indukowanych nowotworach gruczołów mlecznych gryzoni [70,80,85], a także receptorów androgenów w przeszczepialnych nowotworach prostaty [24].

Mechanizm(y), dzięki któremu pochodne GA hamują proces nowotworowy jest złożony, słabo poznany i wymaga zapewne dalszych badań, włączając nowotwory człowieka. Wyniki doświadczeń dotyczących hodowli komórek raka piersi (linia MCF-7) w obecności GA i jego pochodnych ujawniły, że głównym inhibitorem ich wzrostu okazał się 1,4-GL – skuteczny bloker aktywności β G [75]. Na podkreślenie zasługują obserwacje wskazujące, że w moczu kobiet obciążonych wysokim ryzykiem raka piersi w okresie okołooowulacyjnym występują małe stężenia glukuronidów estronu i estradiolu, podczas gdy w grupie kobiet nieobciążonych takim ryzykiem nie odnotowano różnic w poziomie tych koniugatów w suro-

wicy krwi [68]. Nieprawidłowości w tworzeniu glukuronidów z różnymi związkami mogą posłużyć do identyfikacji osób z podwyższonym ryzykiem chorób nowotworowych. Spadek poziomu glukuronidów w surowicy lub ich wydalanie z moczem może odzwierciedlać niski poziom 1,4-Gl lub dużą aktywność β G, bądź współwystępowanie obydwu czynników. Stąd suplementacja 1,4-Gl i jego prekursorami może wpływać na efektywność formowania koniugatów, w postaci których mogą zostać usunięte niekorzystne dla organizmu związki. Istnieje pogląd, że przeciwnowotworowe i detoksykacyjne właściwości 1,4-Gl i jego prekursorów wynikają z ich potencjału podwyższania zdolności tworzenia koniugatów. Funkcjonowanie 1,4-Gl i CaG jako inhibitorów β G wpływa na zwiększenie usuwania kancerogenów i innych toksyn, a ponadto zmniejsza aktywność toksycznych związków w stanie wolnym. W tych rozważaniach należy uwzględnić to, że w moczu (odczyn kwaśny) niestabilne glukuronidy mogą ulec chemicznej hydrolizie uwalniając szkodliwe związki [4,34].

W niedawno opublikowanych doniesieniach, w których wykorzystano chemicznie indukowane modele karcynogenezy płuc [93] i skóry myszy [73] wskazano po raz pierwszy na potencjał indukcji apoptozy przez CaG. W obecności tego glukanu odnotowano typowe zmiany apoptotyczne w badanych komórkach nowotworowych przejawiające się zwiększoną aktywnością proteaz cysteinowych (kaspazy 3, 8 i 9), $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -zależnej endonukleazy oraz spadkiem ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 i produktu zmutowanego genu *p53* [71,93]. Ponadto wykazano zwiększoną proteolizę polimerazy poli(ADP)-rybozy, która zwykle potwierdza aktywność kaspazy 3. Warto podkreślić, że u myszy z wywołanymi chemicznie nowotworami, pozostającymi na diecie z CaG, dochodzi do znacznego spadku aktywności cyklooksygenazy 2, co wskazuje, że związek ten oprócz zdolności proapoptotycznej wykazuje również działanie przeciwzapalne [92,93].

Przeciwnowotworowa efektywność diety z dużą zawartością owoców i warzyw może wynikać z „dobroczynnych” działań GA i jego pochodnych. Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że zaletą tych związków jest brak toksycznego działania nawet stosunkowo dużych ich dawek i łatwość ich wydalania z organizmu [43]. W badaniach trzech pokoleń szczurów karmionych dietą wzbogaconą PHG (200 mg/kg paszy) nie odnotowano zmian w ich wzroście i płodności, ani nie zidentyfikowano żadnych patologii w ich narządach wewnętrznych [8]. Długoterminowe karmienie gryzoni paszą zawierającą 70, 140 i 350 mg CaG/kg nie wywoływało działań niepożądanych [47,80,81,83,91]. U ludzi nie stwierdzono szkodliwego wpływu CaG nawet przy dawkach 9 g dziennie podawanych przez 2 tygodnie [23,76]. Zwiększanie karcynogenezy indukowanej przez FANFT w pęcherzu moczowym u szczurów przy dużych dawkach DAGDL (2% w diecie) [88] można wytłumaczyć zakwaszeniem moczu przez dużą dawkę DAGDL powodującym chemiczną hydrolizę glukuronidów karcynogennych metabolitów FANFT, która prowadzi do uwalniania karcynogenu [4,34].

POCHODNE KWASU D-GLUKAROWEGO OGRANICZAJĄ WZROST *HELICOBACTER PYLORI*

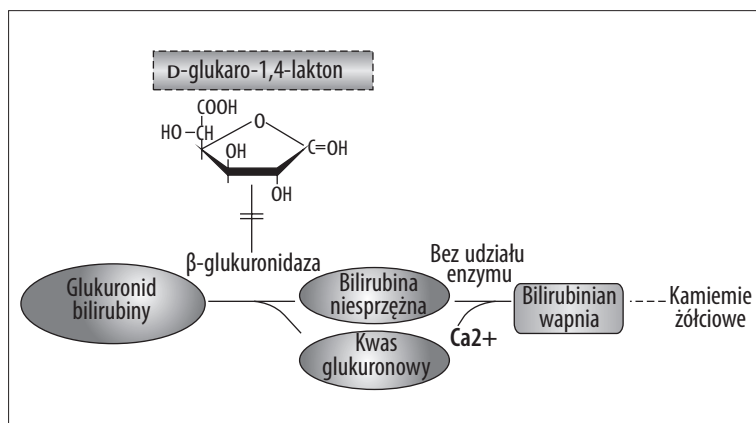
Zakażenie *H. pylori* – ruchliwą, Gram-ujemną bakterią jest niezwykle rozpowszechnione i dotyczy ponad połowy po-

pulacji ludzkiej na świecie. W ciągu ostatnich kilkunastu lat udowodniono, że pałeczka ta wywołuje stany zapalne błony śluzowej żołądka i dwunastnicy [13,19,39]. Odpowiedź na infekcję błony śluzowej przez *H. pylori* wiąże się z naciekiem zapalnym, w którym uczestniczą neutrofile, monocyty (makrofagi), limfocyty, komórki tuczne, komórki plazmatyczne. Wtedy dochodzi do lokalnego uwalniania przez te komórki cytokin prozapalnych, m.in. TNF- α (tumor necrosis factor α), interleukin (IL-1, -6, -8). Te ważne mediatory procesu zapalnego odgrywają zapewne istotną rolę w patomechanizmie m.in. stanów zapalnych, nieżytów, wrzodów, chłoniaka typu MALT (mucosa associated lymphoid tissue) i nowotworów żołądka [19,58,63]. Niedawno podjęto badania, które sugerują, że zmiany wzrostu komórek nabłonkowych żołądka oraz ich wzmożona apoptoza mogą odgrywać istotną rolę w przebiegu infekcji *H. pylori* [13]. Wydaje się, że zarówno zakażenie *H. pylori*, jak i czynniki gospodarza indukowane tą infekcją, doprowadzają do wzrostu poziomu ROS (reactive oxygen species), które mogą być jednym z mechanizmów kierujących zainfekowane komórki na szlak apoptozy. Stąd poszukiwania czynników antyoksydacyjnych, zapobiegających generowaniu ROS i hamowaniu apoptozy są kolejnym wyzwaniem w zapobieganiu i leczeniu nagminnych infekcji *H. pylori*. W badaniach własnych [78] wykazano, że obecność w hodowlach *H. pylori* (szcepek ATCC43504) rosnących na bulionie kryptonowo-sojowym w warunkach beztlenowych, pochodnych GA, tj. PHG, 1,4-Gl i 6,3-Gl (w stężeniu 10^{-7} – 10^{-4} M) znacznie ograniczyło wzrost bakterii w porównaniu z ich wzrostem na podłożu kontrolnym. Hamowanie wzrostu *H. pylori* osiągało znaczne wartości przy większych dawkach i było odmienne przy każdym z użytych związków. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że 1,4-Gl ograniczał wzrost pałeczek około 90% przy stężeniu 10^{-4} M, podczas gdy takie stężenie 6,3-Gl hamowało ich wzrost około 50%. Natomiast zdolność hamowania wzrostu *H. pylori* w obecności PHG była niewielka i obserwowano je stosując duże jego stężenie – 10^{-1} M. To, że 1,4-Gl jest bardzo efektywnym inhibitorem β G wskazuje, że kontrola wzrostu *H. pylori* może być powiązana z ograniczaniem jego aktywności przez ten lakton i jego prekursor, oraz że związki te mogą funkcjonować jako antyoksydanty. Związek ten wykazuje również właściwości przeciwzapalne [73,79].

WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE D-GLUKARO-1,4-LAKTONU

Choroby naczyniowo-sercowe, miażdżyca, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, nowotwory wymienia się wśród patologii, którym towarzyszy zwiększone powstawanie reaktywnych form tlenu i azotu (reactive oxygen/nitrogen species; ROS/RNS) [12,35,49,51]. Następstwem nadmiernego wytwarzania ROS i RNS jest zwykle stres oksydacyjny wiodący do uszkodzeń błon komórkowych, organelli komórkowych czy materiału genetycznego, a w skrajnych przypadkach do śmierci komórek [9,12,35,49,52,62]. Stąd poszukiwania czynników antyoksydacyjnych, zwłaszcza pochodzenia naturalnego, obejmują coraz to nowe grupy związków w tym 1,4-Gl.

W opublikowanych ostatnio badaniach zespołu Wachowicz [51,52,60] wykazano, że *in vitro* 1,4-Gl odpowiada za zmniejszenie stresu oksydacyjnego i ochronne działanie na białka osocza czy białka płytek krwi narażonych na



Ryc. 3. Hipotetyczny model hamowania przez D-glukaro-1,4-lakton tworzenia kamieni żółciowych (barwnikowych) (wg [61]; zmodyfikowano)

działanie nadutlenoazotynu (ONOO^-) i nadtlenu wodoru (H_2O_2). Okazało się, że stres wywołany silnym utleniaczem – ONOO^- (0,1 mM) w osoczu krwi jest hamowany w obecności 1,4-GL, co przejawia się wzrostem poziomu niskocząsteczkowych tioli (glutathion, homocysteina) oraz ograniczeniem zmian oksydacyjnych białek (zawartość grup karbonylowych, nitracja tyrozyny). Wpływ 1,4-GL na te parametry szacowano przy stężeniach laktonu zbliżonych do wartości fizjologicznej (0,4 i 0,8 mM) lub takich, które można osiągnąć przy spożywaniu zalecanej, dużej ilości warzyw i owoców (1,6; 3,2 i 6,4 mM). Ekspozycja osocza krwi na ONOO^- przyczynia się do wzrostu grup karbonylowych oraz reszt nitrotyrozyny wśród białek oraz znacznego spadku wolnych grup tiolowych. W obecności utleniacza oraz 1,4-GL (0,4 mM – 6,4 mM) powstawanie grup karbonylowych oraz reszt nitrotyrozyny w białkach osocza spadało. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że mniejsze stężenie 1,4-GL indukuje wzrost poziomu tioli w osoczu, natomiast przy większych, tj. 3,2 i 6,4 mM ich poziom wyraźnie zmniejsza się [51]. W równoległych doświadczeniach stwierdzono, że inny utleniacz – H_2O_2 (2 mM) również hamował utlenianie białek osocza. Mechanizm antyoksydacyjnego działania 1,4-GL jest słabo poznany. Przedstawione wyniki doświadczeń mogą sugerować, że lakton ten (w zależności od stężenia) moduluje układy redoks przez zmianę aktywności enzymów z nimi związanych i może wykazywać aktywność anty- (przy małych) i prooksydacyjną (przy większych stężeniach), w czym przypomina działanie witaminy C. Dalsze badania [52,60] ujawniły, że 1,4-GL charakteryzuje zdolność do hamowania agregacji płytek wywołanej przez ADP (5 μM) lub trombinę (1–4 U/ml). Wyniki doświadczeń, w których wyizolowane płytki krwi ekspozowano na ONOO^- lub H_2O_2 wykazały znaczne zmiany oksydacyjne białek (2–3-krotny wzrost karbonylacji) oraz peroksydację lipidów w płytkach i osoczu. Okazało się, że obecność 1,4-GL (0,4–6,4 mM) przyczynia się do znacznej inhibicji karbonylacji (~50%) białek oraz spadku peroksydacji lipidów w płytkach i osoczu (ok. 40%). W obecności laktonu nie odnotowano istotnych zmian w nitrowaniu tyrozyny białek płytek traktowanych ONOO^- [60].

Bardzo interesujące są wyniki badań wskazujące, że nawet małe stężenie 1,4-GL, tj. 0,1 i 0,5 mM w połączeniu z pochodną stilbenu – resweratrolem (0,1 μM) znacznie ograniczają agregację płytek indukowaną trombiną (2 U/ml). Jednocześnie, ta kombinacja związków zmniejsza generowanie rodnika ponadtlenkowego, peroksydację lipidów

i hamuje karbonylację białek płytkowych [52]. W podsumowaniu nielicznych dotąd doniesień dotyczących antyoksydacyjnej aktywności 1,4-GL należy podkreślić również antykoagulacyjne właściwości jego prekursora, tj. D-glukurono- γ -laktonu, co łącznie może stanowić klucz w rozwoju farmakologicznych badań nad jego prewencją w schorzeniach sercowo-naczyniowych.

D-GLUKARO-1,4-LAKTON – POTENCJALNA ROLA W ZAPOBIEGANIU TWORZENIA KAMIENI ŻÓŁCIOWYCH

Wśród opublikowanych nielicznych danych podniesiono również biologiczny sens obecności w żółci zarówno spływającej z kanalików wewnątrzwątrobowych, jak i magazynowanej w woreczku żółciowym aktywności endogennej βG , której różny poziom wiązano z dekonjugacją bilirubiny [27]. Wśród pierwszych wyników badań tego zagadnienia przedstawiono wyniki obserwacji wskazujące, że endogenna aktywność βG w żółci pacjentów ze zdiagnozowanymi kamieniami żółciowymi cholesterolowymi bądź barwnikowymi (Brown pigment stones) osiągała odpowiednio 11- i 33-krotnie wyższą wartość niż u osób bez kamieni (cyt. wg [38]). W niektórych kamieniach barwnikowych zidentyfikowano również aktywność bakteryjnej βG . Wyniki tych doniesień zainicjowały nowy tor badań uwzględniający efektywne hamowanie βG przez 1,4-GL [28,38,61]. W żółci oprócz jej podstawowych składników – barwników i kwasów żółciowych, cholesterolu, składników mineralnych wykryto niewielką zawartość GA [36]. Jak dotąd uważa się, że endogenne GA w żółci nie ulega (bądź ulega w niewielkim stopniu) konwersji w 1,4-GL – inhibitor βG raczej nie odgrywa roli w zapobieganiu tworzenia kamieni żółciowych [38,61]. MacFadyen i Ho [38] donieśli, że doustnie podawany szczurom 1,4-GL (0–2500 μM /zwierzę) wyraźnie obniża endogenną aktywność βG w żółci, czemu towarzyszy również spadek wydzielania wątrobowej βG . Wydaje się, że obniżenie aktywności βG może osłabiać proces dekonjugacji połączeń z bilirubiną (ryc. 3). Nierozpuszczalna, niesprężona bilirubina może wytrącać się jako sól wapniowa – istotny składnik barwnikowych kamieni żółciowych.

Analizy porównawcze endogennego poziomu GA w żółci pobranej z przewodu żółciowego wspólnego 100 pacjentów z podejrzeniem kamicy żółciowej wykazały bardzo różną zawartość GA – średnio 60 μM (w zakresie 1,4–638 μM) [61]. W cytowanym doniesieniu nie stwierdzono różnic w poziomie GA w żółci przewodu wspólnego

go chorych ze zdiagnozowanymi kamieniami żółciowymi (cholesterolowymi i barwnikowymi) lub bez nich.

Jak dotąd brak danych dotyczących suplementacji 1,4-GŁ u pacjentów z kamicią żółciową w odniesieniu do zmian aktywności β G i tworzenia kamieni żółciowych.

PODSUMOWANIE

Jak wynika z przeglądu wielu prac oraz wyników wieloletnich badań własnych współautorów, kwas D-glukarowy i jego pochodne przejawiają wielorakie aktywności. Dostarczono eksperymentalnych dowodów, że związki tej grupy działają przeciwnowotworowo m.in. modyfikując środowisko hormonalne organizmu i status proliferacyjny narządów docelowych, neutralizują związki o po-

tencję karcynogenną, zmniejszają onkogenne mutacje, zmniejszają stan zapalny i indukują apoptozę. Ich aktywność, zwłaszcza 1,4-GŁ – głównego inhibitora β G, dotyczy również ochrony antyoksydacyjnej białek, lipidów, materiału genetycznego, co może być wykorzystane w zapobieganiu nie tylko nowotworom, ale także np. chorobom naczyniowo-sercowym, stanom zapalnym. Lista chorób, w których przedstawione związki mogą służyć w prewencji/terapii pozostaje wciąż otwarta.

Duża zawartość GA i jego pochodnych w warzywach i owocach, które stanowią składnik naszej diety mogą pomóc w zapobieganiu/zwalczaniu chorób cywilizacyjnych. Brak dowodów toksyczności GA i jego pochodnych może stanowić podstawę do opracowania preparatów farmaceutycznych celem ich suplementacji.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abou-Issa H.M., Duruibe V.A., Minton J.P., Larroya S., Dwivedi C., Webb T.E.: Putative metabolites derived from dietary combinations of calcium glucarate and *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide act synergistically to inhibit the induction of rat mammary tumors by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 4181–4184
- [2] Abou-Issa H., Koolemans-Beynen A., Minton J.P., Webb T.E.: Synergistic interaction between 13-cis-retinoic acid and glucarate: activity against rat mammary tumor induction and MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 163: 1364–1369
- [3] Abou-Issa H., Webb T.E., Minton J.P., Moeschberger M.: Chemotherapeutic evaluation of glucarate and *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide alone and in combination in the rat mammary tumor model. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989; 81: 1820–1823
- [4] Beland F.A., Kadlubar F.F.: Factors involved in the induction of urinary bladder cancer by aromatic amines. *Banbury Rep.*, 1986; 23: 315–326
- [5] Boyland E., Wallace D.M., Williams D.C.: Enzyme activity in relation to cancer: inhibition of urinary β -glucuronidase of patients with cancer of the bladder by oral administration of 1:4-saccharolactone and related compounds. *Br. J. Cancer*, 1957; 11: 578–589
- [6] Burchell B., Coughtrie M.W.: UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol. Ther.*, 1989; 43: 261–289
- [7] Carr A.J.: Effect of some glycosidase inhibitors on experimental tumours in the mouse. *Nature*, 1963; 198: 1104–1105
- [8] Carr A.J.: Effect of feeding potassium acid saccharate in the diet of rats for successive generations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1947; 65: 189–191
- [9] Cattaneo M.: Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb. Haemost.*, 1999; 81: 165–176
- [10] Clark A.G., Fischer L.J., Millburn P., Smith R.L., Williams R.T.: The role of gut flora in the enterohepatic circulation of stilboestrol in the rat. *Biochem. J.*, 1969; 112: 17P–18P
- [11] Colombi A., Maroni M., Antonini C., Fait A., Zocchetti C., Foa V.: Influence of sex, age, and smoking habits on the urinary excretion of D-glucaric acid. *Clin. Chim. Acta*, 1983; 128: 349–358
- [12] Darley-Usmar V., Halliwell B.: Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm. Res.*, 1996; 13: 649–662
- [13] Ding S.Z., Minohara Y., Fan X.J., Wang J., Reyes V.E., Patel J., Dirden-Kramer B., Boldogh I., Ernst P.B., Crowe S.E.: *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2007; 75: 4030–4039
- [14] Doctor V.M., Shepherd B., McCullough W.: Anticoagulant action of glucuronolactone in rat. *Thromb. Res.*, 1972; 1: 311–316
- [15] Dohrmann R.E.: β -Glucuronidase. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1969
- [16] Dutton G.J.: Glucuronidation of drugs and other compounds. CRC Press, Boca Raton, FL, 1980
- [17] Dwivedi C., Downie A.A., Webb T.E.: Modulation of chemically initiated and promoted skin tumorigenesis in CD-1 mice by dietary glucarate. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1989; 9: 253–259
- [18] Dwivedi C., Oredipe O.A., Barth R.F., Downie A.A., Webb T.E.: Effects of the experimental chemopreventive agent, glucarate, on intestinal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 1989; 10: 1539–1541
- [19] Egan B.J., Holmes K., O'Connor H.J., O'Morain C.A.: *Helicobacter pylori* gastritis, the unifying concept for gastric diseases. *Helicobacter*, 2007; 12 (Suppl.2): 39–44
- [20] Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759–767
- [21] Furuno K., Matsushita H., Nagashima R., Nakano H., Suzuki S.: Effect of D-glucaric acid derivatives on stability of rat liver lysosomes and erythrocytes. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1974; 24: 843–852
- [22] Giri S.N., Hollinger M.A.: Effect of cadmium on lung lysosomal enzymes *in vitro*. *Arch. Toxicol.*, 1995; 69: 341–345
- [23] Hanausek M., Walaszek Z., Słaga T.J.: Detoxifying cancer causing agents to prevent cancer. *Integr. Cancer Ther.*, 2003; 2: 139–144
- [24] Hanausek M., Walaszek Z., Wang S., Sherman U., Mirowski M., Adams A.K.: Potential use of a 65 kDa tumor-associated protein (p65) in diagnosis of prostate cancer. *Genitourinary Oncology Conference: The Clinical Implication of Prostate Cancer Biology*, Houston. 1993; Abstract 5: 19
- [25] Harigaya S.: Studies on glucosaccharolactones. II. Glucosaccharo-1:4,3-di-lactone and its inhibitory effect on β -glucuronidase. *J. Biochem.*, 1964; 56: 392–399
- [26] Heerdt A.S., Young C.W., Borgen P.I.: Calcium glucarate as a chemopreventive agent in breast cancer. *Isr. J. Med. Sci.*, 1995; 31: 101–105
- [27] Ho K.J., Hsu S.C., Chen J.S., Ho L.H.: Human biliary β -glucuronidase: correlation of its activity with deconjugation of bilirubin in the bile. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1986; 16: 361–367
- [28] Ho Y.D., Ho K.J.: Biliary D-glucaric acid: its quantitation and preventive role in gallstone formation. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1990; 25: 631–640
- [29] Horton D., Walaszek Z.: Conformations of the D-glucarolactones and D-glucaric acid in solution. *Carbohydr. Res.*, 1982; 105: 95–109
- [30] Iida R., Nagata S., Kakimoto M., Akaie H., Watanabe H., Shioya A.: 2,5-Di-*O*-acetyl-D-glucosaccharo-(1-4),(6-3)-dilactone, a new potent β -glucuronidase inhibitor. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1965; 15: 88–90
- [31] Ischii Y., Kihara A., Noguchi H., Shimada T., Ohara H., Wada T.: Studies on abnormalities of glucuronidation in carcinoma hosts. *Tumor Res.*, 1968; 3: 75–90
- [32] Isomatsu Y., Kaburagi Y., Jinbo S., Nashimo T., Miki M., Yamanaka M.: Clinical study on prophylaxis of diacetyl-glucaro-(1-4) (6-3) dilactone for recurrence of bladder cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1983; 10: 1958–1962
- [33] Karunairatnam M.C., Levvy G.A.: The inhibition of β -glucuronidase by saccharic acid and the role of the enzyme in glucuronide synthesis. *Biochem. J.*, 1949; 44: 599–604
- [34] King C.M., Weber W.W.: Formation, metabolic activation by *N*-*O*-acyltransfer, and hydrolysis of *N*-acyl-*N*-arylamines derivatives. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1981; 58: 117–122

- [35] Klaunig J.E., Kamendulis L.M.: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004; 44: 239–267
- [36] Levvy G.A.: The preparation and properties of β -glucuronidase. IV. Inhibition by sugar acids and their lactones. *Biochem. J.*, 1952; 52: 464–472
- [37] Levvy G.A., Conchie J.: β -glucuronidase and the hydrolysis of glucuronides. W: *Glucuronic Acid: Free and Combined*, red.: G.J. Dutton. Academic Press, New York, 1966; 301–364
- [38] Macfadyen A., Ho K.J.: D-glucaro-1,4-lactone: its excretion in the bile and urine and effect on the biliary secretion of β -glucuronidase after oral administration in rats. *Hepatology*, 1989; 9: 552–556
- [39] Makola D., Peura D.A., Crowe S.E.: *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2007; 41: 548–558
- [40] Marselos M., Dutton G., Hänninen O.: Evidence that D-glucaro-1,4-lactone shortens the pharmacological action of drugs being disposed via the bile as glucuronides. *Biochem. Pharmacol.*, 1975; 24: 1855–1858
- [41] Marsh C.A.: Metabolism of D-glucuronolactone in mammalian systems. Inhibitory properties of the products of D-glucuronolactone-dehydrogenase action. *Biochem. J.*, 1966; 99: 22–27
- [42] Marshall T., Shult P., Busse W.W.: Release of lysosomal enzyme β -glucuronidase from isolated human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1988; 82: 550–555
- [43] Matsui M., Okada M., Ishidate M.: Studies on the glucaric acid pathway in the metabolism of D-glucuronic acid in mammals. II. Excretion of D-glucaric acid in urine after administration of several monosaccharides and their derivatives to mammals. *Chem. Pharm. Bull.*, 1969; 17: 1064–1071
- [44] Mehta R.G., Rao K.V., Kelloff G., Moon R.C.: Evaluation of potential chemopreventive agents for their activity against carcinogen-induced development of mammary lesions *in vitro*. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1989; 30: 170
- [45] Minton J.P., Walaszek Z., Schooley W., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E.: β -Glucuronidase levels in patients with fibrocystic breast disease. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1986; 8: 217–222
- [46] Miyakawa M., Yoshida O., Harada T., Kato T.: The effect of urinary β -glucuronidase inhibition on the induction of bladder tumors with 2-acetylaminofluorene in rats. *Invest Urol.*, 1973; 10: 256–261
- [47] Morita N., Walaszek Z., Kinjo T., Nishimaki T., Hanausek M., Slaga T.J., Mori H., Yoshimi N.: Effect of synthetic and natural *in vivo* inhibitors of β -glucuronidase on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Mol. Med. Rep.*, 2008; (w druku)
- [48] Morton K.C., Wang C.Y.: Effect of phenothiazine, allopurinol, and glucaron on nitrofurantoin binding in rats. *Drug. Metab. Dispos.*, 1984; 12: 672–673
- [49] Nowak P., Olas B., Bald E., Glowacki R., Wachowicz B.: Peroxynitrite-induced changes of thiol groups in human blood platelets. *Platelets*, 2003; 14: 375–379
- [50] Okazaki M., Ito H., Takano M., Hino M.: Effect of a β -glucuronidase inhibitor (2,5-di-O-acetyl-D-glucurondilactone and sodium D-glucuronolactonate) on rheumatoid arthritis. *Iryo*, 1969; 23: 1484–1495
- [51] Olas B., Saluk-Juszczak J., Nowak P., Glowacki R., Bald E., Wachowicz B.: Protective effects of D-glucaro-1,4-lactone against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins. *Nutrition*, 2007; 23: 164–171
- [52] Olas B., Saluk-Juszczak J., Wachowicz B.: D-glucaro-1,4-lactone and resveratrol as antioxidants in blood platelets. *Cell Biol. Toxicol.*, 2008; 24: 189–199
- [53] Oredipe O.A., Barth R.F., Dwivedi C., Webb T.E.: Chemopreventive activity of dietary glucarate on azoxymethane-induced altered hepatic foci in rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1989; 65: 345–359
- [54] Oredipe O.A., Barth R.F., Hanausek-Walaszek M., Sautins I., Walaszek Z., Webb T.E.: Effects of calcium glucarate on the promotion of diethylnitrosamine-initiated altered hepatic foci in rats. *Cancer Lett.*, 1987; 38: 95–99
- [55] Paumgartner G., Stihel A., Gerok W.: *Enterohepatic circulation of bile acids and sterol metabolism*. Kluwer Academic Publishers 1985
- [56] Pegram R.A., Allaben W.T., Chou M.W.: Effect of caloric restriction on aflatoxin B1-DNA adduct formation and associated factors in Fischer 344 rats: preliminary findings. *Mech. Ageing Dev.*, 1989; 48: 167–177
- [57] Reddy B.S., Weisburger J.H., Wynder E.L.: Fecal bacterial β -glucuronidase: control by diet. *Science*, 1974; 183: 416–417
- [58] Robinson K., Argent R.H., Atherton J.C.: The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2007; 21: 237–259
- [59] Sacquet E., Van Heijenoort Y., Riottot M., Leprince C.: Action of microbial flora of the digestive tract on the metabolism of bile acids in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975; 380: 52–65
- [60] Saluk-Juszczak J., Olas B., Nowak P., Staroń A., Wachowicz B.: Protective effects of D-glucaro-1,4-lactone against oxidative modifications in blood platelets. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2008; 18: 422–428
- [61] Sandstad O., Osnes T., Skar V.: D-glucaric acid in common duct bile and relation to choledocholithiasis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2002; 37: 488–492
- [62] Selhub J.: Homocysteine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 1999; 19: 217–246
- [63] Sepulveda A.R., Graham D.Y.: Role of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *Gastroenterol Clin. North. Am.*, 2002; 31: 517–535
- [64] Shimoi K., Saka N., Nozawa R., Sato M., Amamo I., Nakayama T., Kinai N.: Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab. Dispos.*, 2001; 29: 1521–1524
- [65] Steele V.E., Kelloff G.J., Wilkinson B.P., Arnold J.T.: Inhibition of transformation in cultured rat tracheal epithelial cells by potential chemopreventive agents. *Cancer Res.*, 1990; 50: 2068–2074
- [66] Takada H., Hirooka T., Hiramatsu Y., Yamamoto M.: Effect of β -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Res.*, 1982; 42: 331–334
- [67] Wada T., Ohara H., Ischii Y., Noto A., Kihara A., Noguchi H.: Studies on the correlation between glucuronic acid metabolism and β -glucuronidase activity in cancer hosts. *Tumor Res.*, 1966; 1: 123–142
- [68] Walaszek Z.: Chemopreventive properties of D-glucaric acid derivatives. *Cancer Bull.*, 1993; 45: 453–457
- [69] Walaszek Z.: Potential use of D-glucaric acid derivatives in cancer prevention. *Cancer Lett.*, 1990; 54: 1–8
- [70] Walaszek Z., Flores E., Adams A.K.: Effect of dietary glucarate on estrogen receptors and growth of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1988; 12: 128
- [71] Walaszek Z., Hanausek M.: Molecular markers of apoptosis as prognostic indicators in cancer. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2000; 5: 278–279
- [72] Walaszek Z., Hanausek M., Adams A.K.: Similar metabolism but different absorption and excretion of calcium D-glucarate and potassium hydrogen D-glucarate in female rats: relevance to cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1998; 39: 118
- [73] Walaszek Z., Hanausek M., Narog M.L., Zoltaszek R., Slaga T.J.: Modulation of biomarkers of inflammation and inhibition of mouse skin tumorigenesis by a natural β -glucuronidase inhibitor and its precursor. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2005; 46: 1016
- [74] Walaszek Z., Hanausek M., Sherman U., Adams A.K.: Antiproliferative effect of dietary glucarate on the Sprague-Dawley rat mammary gland. *Cancer Lett.*, 1990; 49: 51–57
- [75] Walaszek Z., Hanausek M., Sherman U., Del Rio M., Adams A.K.: Effects of (+) glucaric acid derivatives and tamoxifen on human breast cancer cells (MCF-7). *Breast Cancer Res. Treat.*, 1989; 14: 175
- [76] Walaszek Z., Hanausek M., Slaga T.J.: Mechanisms of chemoprevention. *Chest*, 2004; 125 (Suppl.5): 128S–133S
- [77] Walaszek Z., Hanausek M., Szemraj J., Adams A.K.: D-glucaric acid as a prospective tumor marker. *Meth. Mol. Med.*, 1998; 14: 487–495
- [78] Walaszek Z., Hanausek M., Szemraj J., Zoltaszek R., Slaga T.J.: *In vitro* growth inhibition of *Helicobacter pylori* by D-glucaric acid derivatives. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2006; 47: 1129
- [79] Walaszek Z., Hanausek M., Zoltaszek R., Slaga T.J.: Inhibitory effect of post-initiation dietary D-glucarate on benzo[a]pyrene-induced inflammation during lung tumorigenesis in A/J mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2004; 45: 724
- [80] Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Minton J.P., Webb T.E.: Dietary glucarate as anti-promoter of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 1986; 7: 1463–1466
- [81] Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E.: Dietary glucarate-mediated reduction of sensitivity of murine strains to chemical carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 1986; 33: 25–32
- [82] Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E.: Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumorigenesis by 2,5-di-O-acetyl-D-glucaro-1,4:6,3-dilactone, an *in vivo* β -glucuronidase inhibitor. *Carcinogenesis*, 1984; 5: 767–772

- [83] Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E.: Repression by sustained-release β -glucuronidase inhibitors of chemical carcinogen-mediated induction of a marker oncofetal protein in rodents. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1988; 23: 15–27
- [84] Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E.: A de-glucuronidation inhibitor reduces the induction by benzo[a]pyrene of a 60-kilodalton oncofetal protein and DNA binding *in vivo*. W: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Characterization and Carcinogenesis*, Ninth International Symposium, red.: M. Cooke, A.J. Dennis. Battele Press, Columbus, Ohio 1986; 947–959
- [85] Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E.: Inhibition of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in the rat by a β -glucuronidase inhibitor. *IRCS Medical Science*, 1986; 14: 677–678
- [86] Walaszek Z., Szemraj J., Hanausek M., Adams A.K., Sherman U.: D-glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat. *Nutr. Res.*, 1996; 16: 673–681
- [87] Walaszek Z., Szemraj J., Narog M., Adams A.K., Kilgore J., Sherman U., Hanausek M.: Metabolism, uptake, and excretion of a D-glucaric acid salt and its potential use in cancer prevention. *Cancer Detect. Prev.*, 1997; 21: 178–190
- [88] Wang C.Y., Hayashida S.: Enhancement by phenothiazine and 2,5-di-*O*-acetyl-D-glucosaccharo-(1,4)(6,3)-dilactone of bladder carcinogenicity of *N*-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-formamide in rats. *Cancer Lett.*, 1984; 24: 37–43
- [89] Yokoyama M., Matsuoka S., Wakui A.: Activation of tegafur and urinary excretion of glucaric acid in tumor bearing hosts. W: *Recent Adv. Chemother., Proc. Int. Congr. Chemother.*, 14th, red.: J. Ishigami. Univ. Tokyo Press, Tokyo 1985, 113–115
- [90] Yonese Y., Takayasu H., Okada M., Ishidate M.: Attempted prophylaxis of bladder cancer with D-glucaro-1,4;6,3-dilactone, a potent oral β -glucuronidase inhibitor. *Abst. Pap. Int. Congress*, 9th, Tokyo, 1966; S1285: 700
- [91] Yoshimi N., Walaszek Z., Mori H., Hanausek M., Szemraj J., Slaga T.J.: Inhibition of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by potassium hydrogen D-glucarate. *Int. J. Oncol.*, 2000; 16: 43–48
- [92] Zoltaszek R., Grzelak M., Hanausek M., Kilianska Z., Slaga T.J., Walaszek Z.: Effects of dietary D-glucarate on biomarkers of inflammation during early post-initiation stages of benzo[a]pyrene (B[a]P)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2008; 49: 532
- [93] Zoltaszek R., Hanausek M., Slaga T.J., Walaszek Z.: Proapoptotic effects of D-glucarate on chemically induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2007; 48: 795