

Agnieszka Cierniak<sup>1</sup>, Anna Łabno<sup>1</sup>, Marek Winiarski<sup>2</sup>, Marcin Dembiński<sup>2</sup>, Piotr Budzyński<sup>2</sup>, Małgorzata Kalemba-Drożdż<sup>3</sup>

1. Uniwersytet Jagielloński w Krakowie,  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biochemii Ogólnej
2. Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Wydział Lekarski,  
Klinika Chirurgii Endoskopowej, Metabolicznej i Nowotworów Tkanek Miękkich
3. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,  
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii

**WPŁYW KURKUMINY  
NA USZKODZENIA DNA INDUKOWANE  
MUTAGENNYM SKŁADNIKIEM ŻYWNOŚCI  
(HETEROCYKLICZNĄ AMINĄ AROMATYCZNĄ)  
W LIMFOCYTACH PACJENTÓW  
Z NOWOTWOREM JELITA GRUBEGO**

Autor korespondencyjny:

Agnieszka Cierniak, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie,  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biochemii Ogólnej,  
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków  
e-mail: kainreic@poczta.onet.pl

**Streszczenie**

Wprowadzenie: Żywność zawiera potencjalnie mutagenne substancje, takie jak PhIP, heterocykliczna amina aromatyczna powstająca podczas obróbki cieplnej mięsa, jak również substancje mogące działać w sposób ochronny poprzez m.in. modulowanie odpowiedzi antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej, jak np. kurkumina, która jest obecna w kurkumie i mieszance curry.

Materiał i metody: W przedstawionych badaniach analizowano rolę PhIP i kurkuminy na uszkodzenia DNA w limfocytach izolowanych z krwi pacjentów z rakiem jelita gru-

bego. Limfocyty osób z rakiem jelita grubego (10 pacjentów) oraz zdrowych (kontrola, 6 osób) traktowano PhIP i/lub kurkumina, następnie poziom uszkodzeń DNA porównano metodą kometową.

**Wyniki:** Wstępne wyniki sugerują, że limfocyty chorych na nowotwór jelita grubego mają większe podstawowe uszkodzenia DNA niż te od osób zdrowych. Uszkodzenia wywołwane PhIP są liniowo zależne od zastosowanej dawki i mogą być zredukowane w obecności kurkuminy (zwłaszcza w stężeniu do 5  $\mu\text{M}$ ).

**Wnioski:** Dane wskazują, że kurkumina może wywierać działanie ochronne przed uszkodzeniami DNA indukowanymi mutagenem obecnym w żywności.

**Słowa kluczowe:** kurkumina, uszkodzenia DNA, PhIP, rak jelita grubego, chemoprewencja

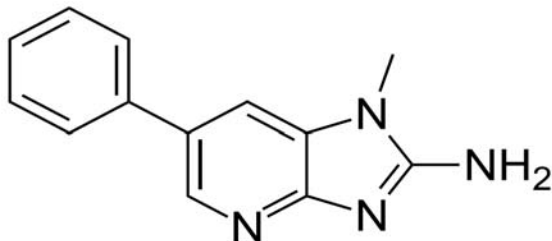
## Wprowadzenie

### *Nowotwór jelita grubego*

We współczesnym świecie choroby nowotworowe są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów nie tylko w krajach rozwiniętych, ale również rozwijających się [1]. Szacunkowo jedynie 5–10% nowotworów wynika z dziedziczonych wad genetycznych [2]. Większy udział w rozwoju nowotworów mają: dieta (15–35%), palenie tytoniu (25–30%) oraz spożycie alkoholu (1–6%) [3], które są czynnikami modyfikowalnymi.

Przykładem nowotworu, w którym wpływ diety na etiologię jest szczególnie istotny, jest rak jelita grubego, nowotwór rozwijający się w okrężnicy lub odbytnicy. Przyczyną tej zależności jest obecność powtarzalnego, bezpośrednio narażenia komórek jelita na toksyczne substancje pochodzące z pożywienia. Szacuje się, że w przypadku tej choroby około 70% przypadków można by uniknąć dzięki modyfikacjom diety [4]. Zaobserwowano zwiększoną mutagenność stolca osób, które stosują dietę bogatą w tłuszcze nasycone i ubogą w błonnik w porównaniu do wegetarian [5]. W USA choroba ta jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem oraz trzecim powodującym największą śmiertelność [6]. Dane epidemiologiczne w Polsce wskazują, że sytuacja jest jeszcze gorsza, ponieważ rak jelita grubego występuje na drugim miejscu pod względem zgonów spowodowanych nowotworem [7]. Wiele przeprowadzonych badań wskazuje, że ogólne wysokie spożycie mięsa, zwłaszcza czerwonego, a także przetworów mięsnych zwiększa ryzyko raka okrężnicy i odbytnicy [8–10]. Na podstawie analizy dostępnych danych, w 2007 r. World Cancer Research Fund zalecił spożywanie nie więcej niż 300 g nieprzetworzonego, czerwonego mięsa (wołowiny, wieprzowiny, koziego, jagnięciny) tygodniowo [4]. World Health Organisation klasyfikuje zaś spożycie dużej ilości mięsa jako „prawdopodobną” przyczynę zwiększenia zapadalności na chorobę nowotworową jelita grubego. Podobnie w Polsce zalecenia Instytutu Żywności i Żywienia w Warszawie zachęcają do ograniczenia spożycia mięsa (zwłaszcza czerwonego) i przetworzonych produktów mięsnych do 0,5 kg tygodniowo [11].

Badania wskazują, że zależność pomiędzy spożyciem mięsa a ryzykiem rozwoju nowotworu jelita grubego może być związana z samym procesem jego przygotowania, ponieważ wyższe ryzyko raka jelita grubego obserwuje się u osób, które spożywają mięso poddane obróbce cieplnej w wysokiej temperaturze przez dłuższy czas [12]. Sugeruje to rolę substancji powstających m.in. podczas grillowania lub smażenia, takich jak HCA – heterocykliczne aminy aromatyczne, do których należy PhIP (2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna) (Ryc. 1) [13].



Rycina 1. Struktura PhIP

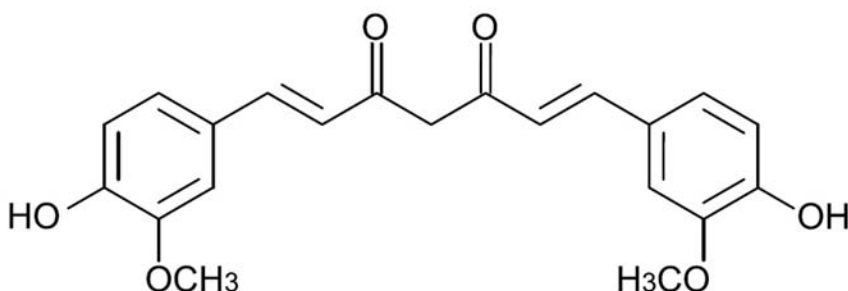
Podczas traktowania mięsa, produktów mięsnych oraz ryb wysoką temperaturą, pomiędzy cukrami, kreatyną oraz aminokwasami dochodzi do reakcji, w wyniku której powstaje PhIP i inne HCA [14]. Ilość powstałego PhIP zależy od typu żywności, a także sposobu, temperatury i czasu obróbki [15]. Ilość powstających HCA szacuje się na 10,89 ng na 1 g mięsa poddanego obróbce termicznej w temperaturze 195°C [16]. W znacznie mniejszych ilościach HCA występują także w zanieczyszczeniach środowiska i dymie tytoniowym [17]. Istnieje wiele doniesień o wpływie obecnego w diecie PhIP na zwiększenie częstości występowania ludzkiego gruczolaka jelita grubego [18], raka nerki [19], odbytnicy [20] oraz przetyku [21]. PhIP w formie natywnej, dostarczanej wraz z pożywieniem, nie wywiera efektu nowotworowego. Jednak metabolizm tej substancji, jakiemu ulega ona w ludzkim organizmie, wpływa na zwiększenie jej toksyczności. Pierwszą reakcją biotransformacji PhIP jest hydroksylacja przeprowadzana przez enzymy z rodziny cytochromu P450 (CYP450) [22]. W przypadku PhIP metabolizm zachodzi głównie w wyniku działalności CYP1A2 w wątrobie oraz CYP1A1/CYP1B1 w innych tkankach. Powstaje N-hydroksypochozna, która może ulegać dalszym przemianom, prowadzącym do detoksykacji, lub – wprost przeciwnie – do aktywacji. Sprzężenie z glukuronianem za pomocą enzymów z grupy UGT (UDP-glukuronylotransferaz) lub redukcja pod wpływem NADPH-reduktazy skutkuje detoksykacją, natomiast reakcja enzymów z grup SULF (sulfotransferaz) oraz NAT (N-acetylotransferaz) prowadzi do powstania odpowiednio N-sulfonyloksy-PhIP oraz N-acetoksy-PhIP, które są związkami bardzo reaktywnymi, toksycznymi, tworzącymi addukty z DNA, które nieusunięte mogą

prowadzić do upośledzenia procesu replikacji, mutacji punktowych i aberracji chromosomowych [22].

Można próbować ograniczyć ilość spożywanego PhIP poprzez zmianę nawyków kulinarnych, trudno jest jednak wyeliminować go całkowicie. Na szczęście dieta może obfitować również w związki o przeciwnym, dobroczynnym działaniu, określane jako nutraceutyki. Są to substancje, które mogą wykazywać działanie lecznicze lub zapobiegające rozwojowi choroby. Do nutraceutyków zaliczamy obecnie wiele substancji, takich jak indole z roślin krzyżowych, karotenoidy marchewki, polifenole czarnej i zielonej herbaty, resweratrol z czerwonego wina czy kurkumina [23].

### *Kurkumina*

Kurkumina ((1E,6E)-1,7-bis(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)hepta-1,6-dien-3,5-dion) jest znana od wieków i szeroko stosowana w diecie azjatyckiej, głównie jako składnik przyprawy – kurkumy (m.in. w niezwykle popularnej w kuchni hinduskiej mieszance: curry). Chemicznie jest dwuferulometanem, należącym do grupy hydrofobowych polifenoli z grupy kurkuminoidów [24] (Ryc. 2).



Rycina 2. Struktura kurkuminy

Kurkumina została wyizolowana z kłączy ostryżu długiego – kurkumy (*Curcuma longa*), którym nadaje charakterystyczny żółty odcień [25]. Do Europy kurkuma została przywieziona w XIII wieku przez Marco Polo, zaś w tradycyjnej medycynie azjatyckiej jest stosowana jako środek będący panaceum na wiele dolegliwości. Kłącza ostryżu zawierają 3–5% kurkuminoidów, olejki eteryczne (m.in.: germakron, elmenon, zingiberen, turmeron, kurlon) oraz ok. 5% żywicy. Kurkumina jest głównym pod względem ilościowym oraz znaczenia biologicznego kurkumoidem występującym w ostryżu [27], oprócz niej obecne są również: cyklokurkumina, demetoksykurkumina, bisdemetoksykurkumina. Pierwszy artykuł naukowy dotyczący właściwości farmakologicznych kurkuminy został opublikowany w 1815 r. [28]. W wielu publikacjach pojawiają się sugestie, że jej stała obecność w diecie mogłaby być skuteczna i podnosić zdolności naprawcze

DNA, jak zaobserwowano u grupy Hindusów po suplementacji kurkumina [29]. Obecnie jest powszechnie używana jako dodatek do żywności, środek koloryzujący oznaczany symbolem E100 (do barwienia produktów spożywczych, takich jak margaryna, musztarda, makarony, napoje bezalkoholowe) [26].

Kurkumina znana jest ze swoich właściwości przeciwnowotworowych [30], przeciwzapalnych [27], antyoksydacyjnych [31,32], proapoptotycznych [33], antyprogresyjnych związanych z przerzutowaniem czy angiogenezą nowotworów [34]. Komórkowym celem aktywności kurkuminy jest wiele ścieżek sygnalizacyjnych, które potencjalnie mogą stanowić mechanizm jej protekcyjnych właściwości [35].

Niestety, mimo korzystnych efektów działania kurkuminy, problem stanowi jej niska biodostępność w organizmie człowieka, spowodowana szybkim metabolizmem. Stężenia używane w badaniach *in vitro* są wielokrotnie większe niż te, które są osiągalne w warunkach fizjologicznych. Biodostępność kurkuminy jest niska z powodu słabej absorpcji przez komórki jelita i szybkiego metabolizmu zachodzącego w wątrobie [31]. Najwyższe osiągnięte w surowicy stężenie wynosiło 2  $\mu\text{M}$ , przy suplementacji 8000 mg kurkuminy na dobę [36]. Jako że z kurkumina wiąże się obecnie duże nadzieje, przeprowadza się próby zwiększenia jej biodostępności. Najprostszym ze sposobów jest podawanie kurkuminy razem z piperyną, składnikiem aktywnym pieprzu. Badania wykazały, że w ten sposób można zwiększyć stężenie kurkuminy we krwi nawet 30-krotnie [37]. Równocześnie pracuje się nad nowoczesnymi i bardziej wydajnymi systemami dostarczania kurkuminy do organizmu, takimi jak nanocząsteczki, liposomy czy mikroemulsje [38].

## Material i metody

Celem przedstawianych badań było określenie wpływu kurkuminy oraz mutagenu zawartego w żywności (PhIP), stosowanych osobno lub równocześnie, na uszkodzenia DNA w limfocytach pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem jelita grubego, dla których kontrolę stanowiły limfocyty zdrowych osób.

### *Izolacja limfocytów*

Krew żylna została pobrana od pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem jelita grubego w Klinice Chirurgii Endoskopowej, Metabolicznej i Nowotworów Tkanek Miękkich Wydziału Lekarskiego UJ. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej nr KBET/135/B/2013. Krew będąca źródłem limfocytów kontrolnych pochodziła ze stacji krwiodawstwa w Krakowie. Pobraną krew wirowano [12 min, 1500 rpm (350 g), 4°C] w celu uzyskania osocza, po czym krew rozcieńczoną w stosunku 1:1 z PBS wirowano w gradencie gęstości [Histopaque 1077, 35 min, 1600 rpm (400 g), temp. pokojowa]. Na-

stępnie warstwa limfocytarna została dwukrotnie odwirowana w PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  [10 min, 1500 rpm (350 g), 4°C]. Limfocyty zostały następnie zamrożone w -80°C w pożywce RPMI zawierającej 50% FBS (płodowej surowicy bydłowej) + 10% DMSO. Doświadczenia przeprowadzono w ciągu 2 tygodni od zamrożenia komórek.

#### *Inkubacja komórek*

Po rozmrożeniu limfocyty zawieszono w pożywce RPMI z dodatkiem 20% FBS. Następnie inkubowano je z PhIP w zakresie stężeń 0–100  $\mu\text{M}$  i/lub kurkumina w zakresie stężeń 0–50  $\mu\text{M}$  przez 1 godzinę w 37°C, w atmosferze 95% wilgotności i 5%  $\text{CO}_2$ .

#### *Badanie żywotności komórek*

W celu zbadania wpływu PhIP i kurkuminy przeprowadzono różnicowe barwienie fluorescencyjne, w którym komórki żywe barwią się na kolor zielony, natomiast komórki martwe – na kolor pomarańczowy. Komórki wysiewano w ilości  $2 \times 10^4$  komórek na studzienkę w płytkach 96-dołkowych i inkubowano przez 1 godzinę z PhIP w zakresie stężeń: 0–100  $\mu\text{M}$ , kurkumina w zakresie stężeń 0–50  $\mu\text{M}$  oraz równocześnie z 100  $\mu\text{M}$  PhIP i kurkumina w zakresie stężeń 25–100  $\mu\text{M}$ . Następnie komórki odwirowano, zawieszono w 30  $\mu\text{l}$  PBS, po czym mieszało w stosunku 1:1 z mieszaniną diocjanu fluoresceiny w acetonie (FDA, 5 mg/ml), bromku etydyny w PBS (EtBr, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i PBS bez  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , po czym nałożono na szkiełka mikroskopowe.

Analizowano co najmniej 100 losowo wybranych komórek na szkiełku przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus IX50). Procedurę powtórzono w trzech niezależnych eksperymentach.

#### *Badanie uszkodzeń DNA – test kometowy*

Test kometowy polega na elektroforezie pojedynczych komórek w żelu agarowym i służy do wykrywania uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki. Po zastosowaniu alkalicznej lizy ( $\text{pH} > 13$ ) dochodzi do usunięcia błon komórkowych, a DNA pozostaje obecny w komórkach w postaci nukleoidu. Jeśli doszło do przerwania ciągłości kwasu nukleinowego, DNA ulega rozwinięciu w wytworzonym polu elektrycznym z ukształtowaniem charakterystycznego wizerunku komety [39].

Po inkubacji komórek z odczynnikami, limfocyty wirowano przez 5 min przy 1200 rpm (220 g) w 4°C i zawieszono w 30  $\mu\text{l}$  PBS, do którego dodano 225  $\mu\text{l}$  rozpuszczonej 0,5% agarozy LMPA (o niskiej temperaturze topnienia) w PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Tak przygotowaną zawiesinę komórek nakładano na szkiełka podstawowe pokryte 0,5% agarozą NMPA (o normalnej temperaturze topnienia), a następnie umieszczano w buforze do lizy (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO,  $\text{pH}=10$ ) na co najmniej 16 godzin w 4°C.

Elektroforezę przeprowadzono przy następujących parametrach: 23 V, 300 mA, w 4°C i ciemności przez 30 minut. Preparaty zostały przepłukane trzykrotnie w buforze neutralizującym i utrwalone w metanolu (5 min). W celu wizualizacji DNA i pomiaru uszkodzeń preparaty barwiono jodkiem propidyny (2,5 µg/ml w Tris, pH=7,5). Pomiarów dokonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX50 wyposażonego w zielony filtr oraz kamerę cyfrową (i.CAM-hrM; sensor SONY ICX), umożliwiającą analizę uszkodzeń DNA w programie Comet Assay 2.6 (Comet Plus, Theta System GmbH, Germany). Preparaty przygotowano w dwóch powtórzeniach, a z każdego analizowano 100 komórek. Program wyliczał parametry określające stopień uszkodzenia komórek, z których do dalszej analizy posłużono się % DNA zawartym w „ogonie komety”.

#### *Analiza statystyczna*

Analizy statystycznej wyników testu kometowego dokonano w programie Statistica 12.0 (StatSoft Polska), używając testu ANOVA popartego analizą post-hoc Tukeya (HSD). Wyniki przedstawiono w postaci średnich grupowych, słupki błędów oznaczają 1,96 SE (błędu standardowego). Różnice przy  $p < 0,05$  przyjęto za statystycznie istotne.

## **Wyniki**

#### *Charakterystyka badanej grupy*

Limfocyty izolowano z krwi pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem jelita grubego (10 dawców), o różnym stadium choroby. Tabela 1 podsumowuje informacje uzyskane na temat dawców. Źródłem limfocytów stanowiących kontrolę byli Honorowi Dawcy Krwi (6 osób), czyli osoby zdrowe. Te dwie badane grupy określone zostały odpowiednio jako „pacjenci RJG” oraz „zdrowi dawcy”.

#### *Wpływ PhIP oraz kurkuminy na żywotność limfocytów*

Wykazano, że zarówno PhIP jak i kurkumina, stosowane niezależnie, a także równocześnie, przez 1 godzinę nie wpływają w sposób istotny statystycznie na żywotność limfocytów obu grup badawczych (test *t*-Studenta). Dane nie zostały przedstawione graficznie ze względu na jednakowy charakter wyników – żywotność na poziomie 98–99%.

#### *Wpływ PhIP oraz kurkuminy na uszkodzenia DNA limfocytów*

W limfocytach pacjentów RJG zaobserwowano znacząco wyższy poziom endogennych uszkodzeń DNA w porównaniu do limfocytów zdrowych dawców (odpowiednio 14,26% vs. 10,39%). Wyniki przedstawiono na rycinie 3.

Tabela 1. Podsumowanie danych na temat pacjentów z nowotworem jelita grubego

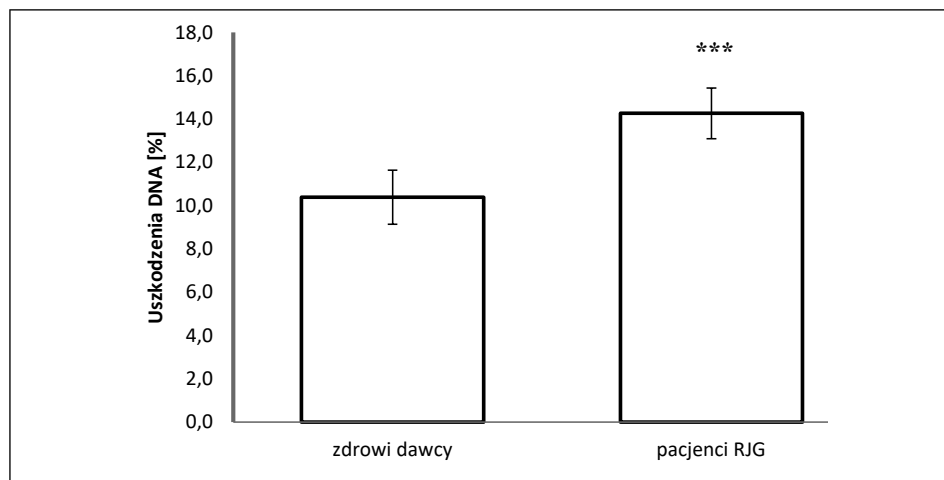
Lp.	Wiek	Informacje o chorobie (typ nowotworu, stopień zaawansowania*)	Morfologia krwi** Ht [%] Hb [g/dl]	Leki przyjmowane przez pacjenta	Dodatkowe dane o pacjencie
1	72	Rak okrężnicy (esica), B2	Ht-28,0 Hb-9,5	insulina, atorwastatyna, benserazydodopa, indapamid	Cukrzyca t. 2, nadciśnienie, ChNS***, ch. Parkinsona
2	61	Rak okrężnicy (zstępnicza), B2	Ht-28,0 Hb-8,1	losartan potasu, atenolol	Nadciśnienie, ChNS
3	83	Rak okrężnicy (poprzecznicza), B1	Ht-23,8 Hb-7,8	indapamid, lisinopril	Nadciśnienie, hipercholesterolemia
4	78	Rak okrężnicy (esica), B1	Ht-33 Hb-12,5	peryndopryl, indapamid	Nadciśnienie, zaćma
5	62	Rak odbytnicy, B1	Ht-29,3 Hb-10,2	peryndopryl, indapamid,	Nadciśnienie
6	53	Rak okrężnicy (esica), A1	Ht-35,6 Hb-14,1	ramipryl	Nadciśnienie
7	69	Rak okrężnicy (kątnica), A1	Ht-34,5 Hb-12,3	ramipryl	Nadciśnienie
8	75	Rak okrężnicy (esica), C2	Ht-33,7 Hb-12,9	glimepiryd, chlortalidon, fumarany bisoprololu, di- chlorowodorek betahistyny	Cukrzyca t. 2, nadciśnienie, ChNS
9	62	Rak okrężnicy (kątnica), A1	Ht-34,5 Hb-12,3	ramipryl	Nadciśnienie
10	71	Rak okrężnicy (esica), B2	Ht-34,1 Hb-13,6	brak	brak

\* Stopień zaawansowania nowotworu wg klasyfikacji Astlera-Collera: A1 – rak nacieka błonę śluzową, bez zajęcia węzłów chłonnych; A2 – rak nacieka błonę śluzową i podsłuzową, bez zajęcia węzłów chłonnych; B1 – rak nacieka mięśniówkę właściwą, bez zajęcia węzłów chłonnych; B2 – rak nacieka całą grubość ściany jelita, bez zajęcia węzłów chłonnych; C1 – rak nacieka mięśniówkę właściwą, z zajęciem węzłów chłonnych; C2 – rak nacieka całą grubość ściany jelita, z zajęciem węzłów chłonnych;

\*\* Ht – hematokryt, Hb – zawartość hemoglobiny w krwi pełnej;

\*\*\* ChNS – choroba niedokrwienności serca.

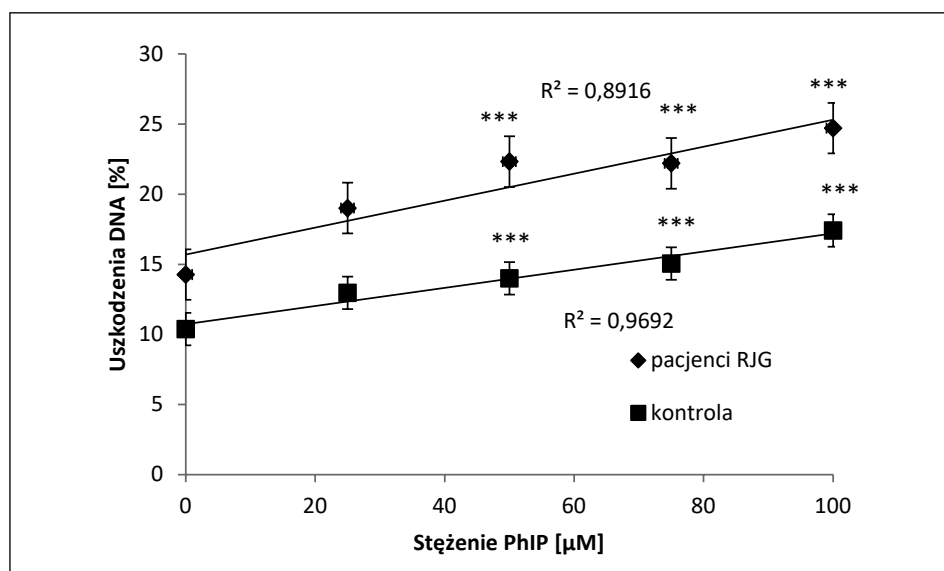




Słupki błędów odpowiadają 1,96 SE; \*\*\* oznacza istotność statystyczną ( $p < 0,001$ ).

Rycina 3. Porównanie uszkodzeń DNA limfocytów nietraktowanych odczynnikami u zdrowych dawców (N=6) i pacjentów RJG (N=10)

W celu zbadania wpływu PhIP na uszkodzenia DNA limfocytów obu grup badawczych traktowano je PhIP w zakresie stężeń 0–100  $\mu\text{M}$  przez 1 godzinę. Po tym czasie uszkodzenia oceniono metodą kometową. Wyniki przedstawiono na rycinie 4.



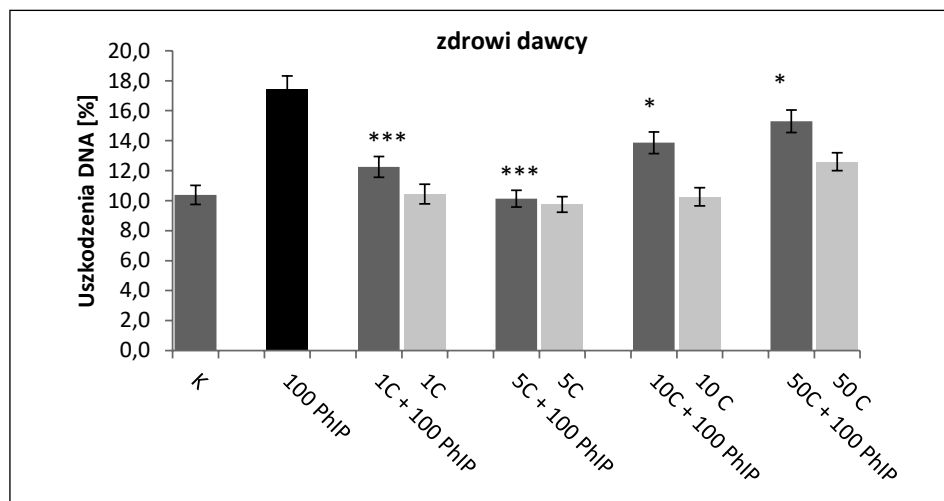
Słupki błędów odpowiadają 1,96 SE; \*\*\* oznacza istotność statystyczną ( $p < 0,001$ ) w stosunku do stężenia 0  $\mu\text{M}$  PhIP.

Rycina 4. Wpływ PhIP na uszkodzenia DNA limfocytów zdrowych dawców oraz pacjentów RJG

Wykazano, że po godzinnej inkubacji z PhIP wzrasta poziom uszkodzeń DNA w limfocytach dawców z obu grup. Zaobserwowano liniowy wzrost uszkodzeń zależny od zastosowanego stężenia (od 10,39% do 17,42% w limfocytach zdrowych dawców; oraz od 14,26% do 24,71% u pacjentów RJG). Uszkodzenia DNA limfocytów pacjentów RJG pozostają większe dla każdego zastosowanego stężenia.

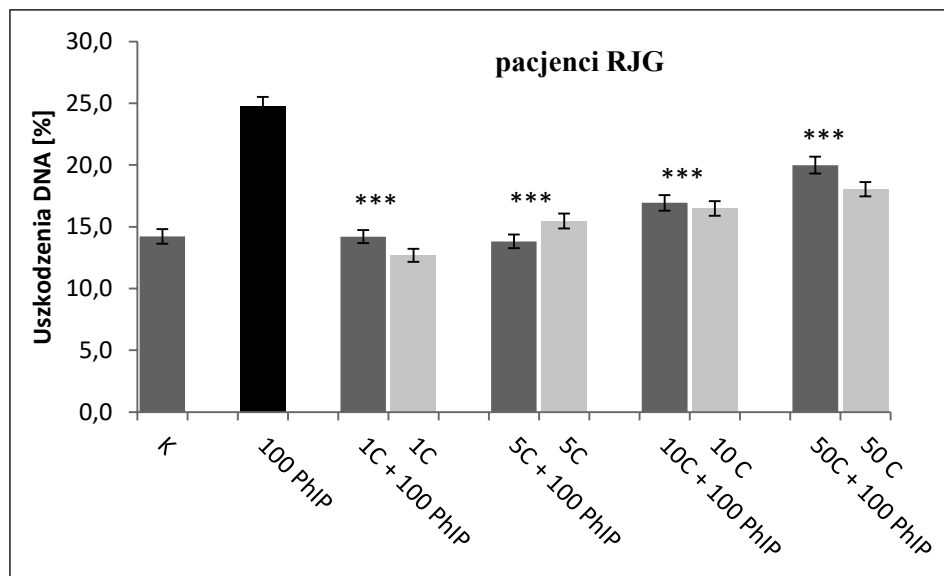
Aby ocenić wpływ kurkuminy na uszkodzenia DNA indukowane przez PhIP limfocyty obu grup badawczych potraktowano równocześnie 100  $\mu\text{M}$  PhIP oraz kurkumina w zakresie stężeń 1–50  $\mu\text{M}$  przez 1 godzinę. Po tym czasie uszkodzenia oceniono metodą kometową. Wyniki przedstawiono na rycinie 5 (zdrowi dawcy) oraz rycinie 6 (pacjenci z rakiem jelita grubego).

Inkubacja limfocytów jednocześnie z PhIP oraz kurkumina wpływa na redukcję uszkodzeń DNA indukowanych PhIP w obu grupach badawczych. Redukcja uszkodzeń wykazuje istotność statystyczną w każdym zastosowanym stężeniu dla pacjentów RJG, a dla dawców zdrowych – w każdym stężeniu prócz najwyższego (50  $\mu\text{M}$ ). Najbardziej efektywne działanie ochronne wykazuje kurkumina w niskich stężeniach (1  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$ ) w obu grupach dawców. Najwydajniejsza protekcja zachodzi przy równoczesnym zastosowaniu PhIP w stężeniu 100  $\mu\text{M}$  oraz kurkuminy w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Następuje zmniejszenie uszkodzeń powodowanych PhIP z 17,41% do 10,13% oraz z 24,71% do 13,26% – odpowiednio dla dawców zdrowych oraz pacjentów RJG.



Słupki błędów odpowiadają 1,96 SE; \*\*\* oznacza istotność statystyczną ( $p < 0,001$ ) w stosunku do PhIP w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ ; \* oznacza istotność statystyczną ( $p < 0,05$ ) w stosunku do PhIP w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ .

Rycina 5. Wpływ PhIP oraz kurkuminy na uszkodzenia DNA w limfocytach zdrowych dawców. K – kontrola, 100 PhIP – 100  $\mu\text{M}$  PhIP, C – kurkumina, 1 – 1  $\mu\text{M}$ , 5 – 5  $\mu\text{M}$ , 10 – 10  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$



Słupki błędów odpowiadają 1,96 SE; \*\*\* oznacza istotność statystyczną ( $p < 0,001$ ) w stosunku do PhIP w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ .

Rycina 6. Wpływ PhIP oraz kurkuminy na uszkodzenia DNA w limfocytach pacjentów RJG. K – kontrola, 100 PhIP– 100  $\mu\text{M}$  PhIP, C – kurkumina, 1 – 1  $\mu\text{M}$ , 5 – 5  $\mu\text{M}$ , 10 – 10  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$

## Dyskusja

W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano potencjalnie groźny dla ludzkiego zdrowia PhIP oraz przypuszczalnie korzystną kurkuminę. Oba związki po godzinnej inkubacji nie wpływały w sposób znaczący na żywotność analizowanych komórek – limfocytów. Indukcja uszkodzeń DNA (wyrażanych jako % DNA w ogonie komety) (Ryc. 3) po inkubacji limfocytów z PhIP potwierdza klasyfikowanie tej substancji przez IARC jako potencjalnego kancerogenu [40]. Równocześnie, uszkodzenia rosną liniowo w zależności od zastosowanego stężenia (Ryc. 4). Podkreśla to zagrożenie dla ludzkiego zdrowia wynikające ze stosowania diety obfitującej w smażone, czerwone mięso, zwłaszcza wieprzowinę, która jest najobfitszym źródłem HCA [16]. Pod wpływem PhIP w komórkach dochodzi do powstawania adduktów purynowych, które w wyniku zachodzących procesów naprawy DNA powodują występowanie przejściowych pęknięć kwasu nukleinowego, wykrywanych metodą kometową [41]. Sugerowany jest także mechanizm uszkodzeń związany z generowaniem reaktywnych form tlenu [42].

Doświadczenia wykazały ochronny wpływ kurkuminy na uszkodzenia indukowane mutagenem obecnym w żywności (PhIP) (Ryc. 5 i 6). Podobne doświadczenia przeprowadzone dla innych polifenoli (w tym kwercetyny oraz

rutyny) również wykazują ich skuteczność, co wskazuje na zasadność stosowania tego typu substancji roślinnych w chemoprewencji [43]. Ponadto kurkumina redukuje uszkodzenia indukowane przez PhIP zarówno w limfocytach pacjentów RJG, jak i w komórkach zdrowych dawców. Należy zauważyć jednak, że uszkodzenia DNA w obrębie każdej grupy zredukowane są do poziomu limfocytów nietraktowanych PhIP (próbek kontrolnych), który wyższy jest u dawców ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego (Ryc. 3).

Dotychczasowe doświadczenia analizujące potencjalnie chemoprewencyjny wpływ kurkuminy na rozwój nowotworu jelita grubego były przeprowadzone między innymi w warunkach *in vitro* oraz w modelach zwierzęcych. Badania na liniach komórkowych nowotworu jelita grubego wykazują między innymi, że kurkumina indukuje w nich uszkodzenia DNA, zatrzymuje cykl komórkowy, hamuje proliferację, redukuje migrację oraz indukuje apoptozę [44–47]. W przypadku pierwotnych komórek nowotworowych izolowanych od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego, kurkumina również powstrzymuje ich namnażanie się oraz wywołuje zaprogramowaną śmierć [48]. W licznych eksperymentach na zwierzęcych nowotworach okrężnicy wywołanych kancerogenami zaobserwowano hamowanie rozwoju guzów pod wpływem kurkuminy [49].

Innym ważnym aspektem związanym z wyborem nowotworu jelita grubego jako modelu badawczego jest fakt, że kurkumina w przewodzie pokarmowym może działać bezpośrednio, bez konieczności absorpcji, przez co osiągalne stężenia mogą być wyższe niż dostępne w surowicy. Ma to znaczenie zwłaszcza w chemoprewencji rozwoju raka okrężnicy oraz odbytnicy. Poprzez swoje właściwości, w tym wykazany w niniejszej pracy efekt ochronny przed uszkodzeniami DNA indukowanymi przez mutagen obecny w żywności, dodatek kurkuminy do diety mógłby mieć hamujący wpływ na proces rozwoju nowotworu jelita grubego, a także innych nowotworów, szczególnie dietozależnych. Co ważne, kurkumina może wykazywać działanie ochronne na każdym stopniu rozwoju choroby nowotworowej. Hamuje inicjację poprzez usuwanie wolnych rodników, wpływa na metabolizm ksenobiotyków czy pobudza mechanizmy naprawcze [50]. Kurkumina może ingerować również w dalsze etapy rozwoju nowotworu. Etapy promocji oraz progresji są hamowane także poprzez redukcję stanu zapalnego, promowanie różnicowania komórek, hamowanie ich proliferacji, wpływ na ścieżki sygnalizacyjne (np. zmniejszenie wrażliwości na czynniki wzrostu), indukcję apoptozy i wpływ na mikrośrodowisko nowotworu [50].

W przeprowadzonych badaniach zastosowano stężenia kurkuminy, jakie mogą być osiągalne w organizmie ludzkim (stężenie 1  $\mu\text{M}$ , które wykazuje protekcyjny efekt, jest możliwe do osiągnięcia w wyniku wzbogacenia diety kurkumą).

Uzyskane wyniki potwierdzają także słuszność pomysłu stosowania metody kometowej do analizy uszkodzeń DNA jako biomarkera choroby nowotwo-

rowej jelita grubego. Podobnie jak w przypadku raka piersi [51], w przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano zwiększone podstawowe uszkodzenia DNA limfocytów pacjentów RJG w porównaniu do limfocytów dawców kontrolnych (Ryc. 3). Odnotowano także zwiększone uszkodzenia po zastosowaniu substancji mutagennej (PhIP) (Ryc. 4). Stało się to przyczyną sugestii, iż analiza uszkodzeń DNA w tych limfocytach mogłaby być stosowana jako nieskomplikowane badanie przesiewowe, zwłaszcza w połączeniu z analizą wrażliwości tych komórek na substancje kancerogenne. Oczywiście, uszkodzenia DNA nie są w tym wypadku specyficznym markerem typu nowotworu, ale ich wykrywanie testem kometowym mogłoby być przydatną metodą diagnostyczną sugerującą zagrożenie rozwojem tej choroby. Ma to znaczenie tym większe, że analiza morfologiczna krwi jest rutynowym badaniem kontrolnym i włączenie do tego procesu oceny uszkodzeń DNA metodą kometową także nie powinno stanowić trudności. Jednakże aby móc wysnuwać pewne wnioski na ten temat, należałoby rozszerzyć badania na większą liczbę pacjentów z nowotworem jelita grubego oraz zdrowych dawców – badana grupa miała bowiem niską liczebność ze względu na pilotażowy charakter eksperymentu. To mogło być także przyczyną braku zależności pomiędzy stadium rozwoju nowotworu a poziomem wykrytych uszkodzeń DNA.

Ważną informacją uzyskaną w przeprowadzonych doświadczeniach była również ocena wpływu zastosowanego polifenolu na uszkodzenia DNA zdrowych komórek pacjentów z rakiem jelita grubego. Zdiagnozowanie nowotworu często prowadzi do zmian w diecie niekonsultowanych z lekarzem prowadzącym, co może stanowić potencjalne zagrożenie. Także pewne innowacyjne strategie lecznicze mogą wykorzystywać substancje wykazujące działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne jako związki wspomagające chemoterapię, chociażby poprzez zmniejszenie stanu zapalnego czy uwrażliwienie komórek na cytostatyki [52]. Kurkumina istotnie zwiększa uszkodzenia DNA limfocytów chorych dawców, jednakże dopiero w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ . Tak wysokie dawki nie są osiągalne w organizmie człowieka, nawet w wyniku suplementacji czy wstrzyknięcia dożylnego.

Istotną kwestią jest także wpływ całokształtu diety zawierającej kurkuminę na stan zdrowia człowieka. Wiadomo, że substancje obecne w pożywieniu mogą wpływać na siebie wzajemnie, chociażby na procesy absorpcji czy biodostępności. Bardzo interesujące są wyniki badań analizujących wpływ kombinowanej dawki kurkuminy (480 mg) oraz kwercetyny (20 mg) trzy razy dziennie na rozwój polipów w rodzinnej polipowatości gruczolakowatej (*familial adenomatous polyposis*, FAP) [53]. U wszystkich analizowanych pacjentów doszło do redukcji liczby i rozmiarów polipów o 60%. Wiadomo, że FAP jest zespołem silnie predysponującym do rozwoju nowotworów jelita grubego – u osób nieleczonych życiowe ryzyko rozwoju tej choroby wynosi 100%. Wspomniano już także o korzystnym wpływie piperyny na zwiększenie stężenia kurkuminy w or-

ganizmie człowieka [37]. Być może spożywanie mieszanki przyprawowej curry może mieć bardziej dobroczynny efekt niż stosowanie samej kurkuminy, z racji na obecność w tej przyprawie nie tylko kurkumy, ale także pieprzu zawierającego piperynę.

Podsumowując uzyskane wyniki pod kątem przydatności kurkuminy jako środka chemoprewencyjnego – pozostaje mieć nadzieję, że ten łatwo dostępny i tani środek w przyszłości będzie mógł być zastosowany jako bezpieczny związek zapobiegający rozwojowi i progresji nowotworu, bez wywierania negatywnego efektu na komórki prawidłowe, co jest obecnie głównym problemem chemoterapii.

## **Wnioski**

Na podstawie badań epidemiologicznych szacuje się, że około 1/3 wszystkich zachorowań na nowotwory wywołana jest przez składniki diety. Związek taki obserwuje się pomiędzy spożywaniem potraw mięsnych a zapadalnością na nowotwory, zwłaszcza układu pokarmowego. Wśród składników diety, którym przypisuje się działanie mutagenne, należy wymienić heterocykliczne aminy aromatyczne (takie jak np. PhIP), które powstają w mięsie i rybach poddanych działaniu wysokich temperatur podczas smażenia, pieczenia czy grillowania.

Do związków o potencjalnym działaniu chemoprewencyjnym zaliczane są związki niskocząsteczkowe o charakterze polifenolowym, występujące w owocach i warzywach. Wykazują one wiele efektów biologicznych – działają jako antyutleniacze, reduktory stanu zapalnego i zmiatacze wolnych rodników. Wpływają również na metabolizm ksenobiotyków i pobudzanie mechanizmów naprawczych. Co więcej, mogą ingerować we wszystkie etapy rozwoju nowotworu. Jedną z takich substancji jest m.in. kurkumina.

W opisanych badaniach wykazano, że limfocyty pacjentów z nowotworem jelita grubego mają znacząco większy podstawowy poziom uszkodzeń DNA niż limfocyty od zdrowych dawców. Może to sugerować słuszość zastosowania użytej metody – testu kometowego – do analizy uszkodzeń DNA jako biomarkera narażenia na rozwój nowotworu jelita grubego. Ponadto, inkubacja limfocytów z PhIP znacząco zwiększa uszkodzenia DNA w sposób liniowo zależny od stężenia zarówno w przypadku zdrowych dawców, jak i pacjentów z nowotworem jelita grubego. Potwierdza to słuszość określania PhIP jako potencjalnego kancerogenu. Uszkodzenia DNA indukowane poprzez PhIP mogą być zmniejszone przy równoczesnej inkubacji z kurkumina; szczególnie niskie stężenia kurkuminy (do 5  $\mu\text{M}$ ) wykazują silne działanie ochronne. Jest to informacja tym bardziej wartościowa, iż tak niskie stężenia mogą być osiągalne po przyjęciu wraz z pokarmem typowych dawek spożywczych kurkumy. Po dalszych badaniach potwierdzających bezpieczeństwo stosowania kurkuminy, mogłaby ona być zalecana jako środek chemoprewencyjny.

**Bibliografia**

1. Boyle P, Levin B (red). *World cancer report 2008*. IARC/WHO, 12–39.
2. Garber JE, Offit K. *Hereditary cancer predisposition syndromes*. *J Clin Oncol*. 2005; 23(2): 276–292.
3. Boffetta P, Hashibe M, La Vecchia C, et al. *The burden of cancer attributable to alcohol drinking*. *Int J Cancer*. 2006; 119(4): 884–887.
4. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington DC 2007: 18–19, 141–153.
5. de Kok TM, van Maanen JM. *Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk*. *Mutat Res*. 2000; 463(1): 53–101.
6. American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2011–2013*. Atlanta 2011: 5–8.
7. Kasztelan-Szczerbińska B, Cichoż-Lach H, Słomka M. *Rak jelita grubego jako problem zdrowia publicznego – ocena aktualnych możliwości diagnostycznych*. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2008; 118(4): 224–227.
8. Zandonai AP, Sonobe HM, Sawada NO. *The dietary risk factors for colorectal cancer related to meat consumption*. *Rev Esc Enferm USP*. 2012; 46(1): 234–239.
9. Kim J, Park S, Nam BH. *The risk of colorectal cancer is associated with the frequency of meat consumption in a population-based cohort in Korea*. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(9): 2371–2376.
10. Chan DS, Lau R, Aune D, et al. *Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies*. *PLoS One* 2011; 10.1371/journal.pone.0020456.
11. Instytut Żywności i Żywienia. *Zasady prawidłowego żywienia*; <http://www.izz.waw.pl/pl/zasady-prawidlowego-zywienia> [dostęp: 20.07.2017].
12. Sinha R, Chow WH, Kulldorff M, et al. *Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas*. *Cancer Res*. 1999; 59(17): 4320–4324.
13. Sugimura T. *Overview of carcinogenic heterocyclic amines*. *Mutat Res*. 1997; 376(1–2): 211–219.
14. Robbana-Barnat S, Rabache M, Rialland E, et al. *Heterocyclic amines: occurrence and prevention in cooked food*. *Environ Health Perspect*. 1996; 104(3): 280–288.
15. Skog K, Steineck G, Augustsson K, et al. *Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues*. *Carcinogenesis*. 1995; 16(4): 861–867.
16. Puangsombat K, Gadgil P, Houser TA, et al. *Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products*. *Meat Sci*. 2012; 90(3): 739–46.
17. Manabe S, Tahyama K, Wada O, et al. *Detection of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), in cigarette smoke condensate*. *Carcinogenesis*. 1991, 12(10): 1945–1947.
18. Rohrmann S, Hermann S, Linseisen J. *Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study*. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(5): 1418–1424.
19. Daniel CR, Cross AJ, Graubard BI, et al. *Large prospective investigation of meat intake, related mutagens, and risk of renal cell carcinoma*. *Am J Clin Nutr*. 2012; 95(1): 155–162.

- 38 A. CIERNIAK, A. ŁABNO, M. WINIARSKI, M. DEMBIŃSKI, P. BUDZYŃSKI *ET AL.*
20. Ferrucci LM, Sinha R, Huang WY, et al. *Meat consumption and the risk of incident distal colon and rectal adenoma*. Br J Cancer. 2012; 106(3): 608–616.
21. Cross AJ, Freedman ND, Ren J, et al. *Meat consumption and risk of esophageal and gastric cancer in a large prospective study*. Am J Gastroenterol. 2011; 106(3): 432–442.
22. Holme JA, Wallin H, Brunborg G, et al. *Genotoxicity of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP): formation of 2-hydroxamino-PhIP, a directly acting genotoxic metabolite*. Carcinogenesis. 1989; 10(8): 1389–1396.
23. de Silva A, Lanerolle P. *Nutraceuticals: concepts and controversies*. Ceylon Med J. 2011; 56(4): 171–173.
24. Miłobędzka J, Kostanecki S, Lampe V. *Zur Kenntnis des Curcumins*. Ber Dtsch Chem Ges. 1910; 43(2): 2163–2170.
25. Amalraj A, Pius A, Gopi S, et al. *Biological activities of curcuminoids, other bio-molecules from turmeric and their derivatives: a review*. J Tradit Complement Med. 2016; 7(2): 205–233
26. U.S. Food and Drug Administration. *Listing of color additives exempt from certification*. Title 21, Sect. 73.600; <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=73.600> [dostęp: 20.07.2017].
27. Basnet P, Skalko-Basnet N. *Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment*. Molecules. 2011; 16(6): 4567–4598.
28. Vogel HA, Pelletier, J. *Curcumin-biological and medicinal properties*. J Pharma. 1815; 2: 50.
29. Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA, et al. *Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca<sup>2+</sup> signaling*. Biochem Pharmacol 1999 Oct 1; 58(7): 1167–1172.
30. Sikora-Polaczek M, Bielak-Żmijewska A, Sikora E. *Molekularne i komórkowe mechanizmy działania kurkuminy – dobroczynny wpływ na organizm*. Postepy Biochemii. 2011; 57(1): 74–84.
31. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, et al. *Curcumin – from molecule to biological function*. Angew Chem Int Ed Engl. 2012; 51(22): 5308–5332.
32. Krajka-Kuźniak V. *Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych*. Postepy Hig Med Dosw (online). 2007; 61: 627–638.
33. Ramachandran C, Rodriguez S, Ramachandran R, et al. *Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines*. Anticancer Res. 2005; 25(5): 3293–3302.
34. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, et al. *Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice*. Clin Cancer Res. 2005; 11(20): 7490–7498.
35. Karunagaran D, Rashmi R, Kumar TR. *Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy*. Curr Cancer Drug Targets. 2005; 5(2): 117–129.
36. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. *Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions*. Anticancer Res. 2001; 21(4B): 2895–2900.



37. Shoba G, Joy D, Joseph T, et al. *Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. *Planta Med*. 1998; 64(4): 353–356.
38. Bansal SS, Goel M, Aqil F, et al. *Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention*. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011; 4(8): 1158–1171.
39. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. *Exp Cell Res*. 1988; 175(1): 184–191.
40. International Agency for Research on Cancer. *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1997; 56: 17–18.
41. Collins AR. *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. *Mol Biotechnol*. 2004; 26(3): 249–261.
42. Moonen HJ, Briedé JJ, van Maanen JM, et al. *Generation of free radicals and induction of DNA adducts by activation of heterocyclic aromatic amines via different metabolic pathways in vitro*. *Mol Carcinog*. 2002; 35(4): 196–203.
43. Kurzawa-Zegota M, Najafzadeh M, Baumgartner A, et al. *The protective effect of the flavonoids on food-mutagen-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes from colon cancer patients*. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(2): 124–129.
44. Lu JJ, Cai YJ, Ding J. *Curcumin induces DNA damage and caffeine-insensitive cell cycle arrest in colorectal carcinoma HCT116 cells*. *Mol Cell Biochem*. 2011; 354(1–2): 247–252.
45. Mudduluru G, George-William JN, Muppala S, et al. *Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer*. *Biosci Rep*. 2011; 31(3):185–197.
46. Su CC, Chen GW, Lin JG, et al. *Curcumin inhibits cell migration of human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of nuclear factor kappa B /p65 and down-regulates cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expressions*. *Anticancer Res*. 2006; 26(2A): 1281–1288.
47. Collett GP, Campbell FC. *Curcumin induces c-jun N-terminal kinase-dependent apoptosis in HCT116 human colon cancer cells*. *Carcinogenesis*. 2004; 25(11): 2183–2189.
48. Hsu YC, Weng HC, Lin S, et al. *Curcuminoids-cellular uptake by human primary colon cancer cells as quantitated by a sensitive HPLC assay and its relation with the inhibition of proliferation and apoptosis*. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(20): 8213–8322.
49. Kunnumakkara AB, Guha S, Aggarwal BB. *Curcumin and colorectal cancer: add spice to your life*. *Current Colorectal Cancer Reports* 2009; 1(5): 5–14.
50. Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. *Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials*. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(11): 1631–1652.
51. Smith TR, Miller MS, Lohman KK, et al. *DNA damage and breast cancer risk*. *Carcinogenesis*. 2003; 24(5): 883–889.
52. Zhou QM, Wang XF, Liu XJ, et al. *Curcumin improves MMC-based chemotherapy by simultaneously sensitising cancer cells to MMC and reducing MMC-associated side-effects*. *Eur J Cancer*. 2011; 47(14): 2240–2247.
53. Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, et al. *Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis*. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006; 4(8): 1035–1038.

## **Influence of curcumin on DNA damage induced with food mutagen (heterocyclic aromatic amine) in lymphocytes isolated from colorectal cancer patients**

### **Abstract**

**Introduction:** Food contains substances that are potentially mutagens such as PhIP, heterocyclic aromatic amine, produced during heat treatment of meat, as well as substances that may act in protective manner, inter alia by modulating the antioxidant and anti-inflammatory response, such as curcumin, which is present in turmeric and curry.

**Material and methods:** This study investigated the effect of PhIP and curcumin on DNA damage in lymphocytes isolated from the blood of colorectal cancer patients. Lymphocytes from individuals diagnosed with colorectal cancer (N=10) and healthy individuals (control, N=6) were treated with PhIP or/and curcumin, followed by analysis of DNA damage using single cell gel electrophoresis (comet assay).

**Results:** Preliminary results suggest that lymphocytes of patients with colorectal cancer have a greater baseline DNA damage than those from healthy individuals. PhIP-induced DNA damage is dose-dependent and can be reduced in the presence of curcumin, especially at low concentration (up to 5  $\mu$ M).

**Conclusions:** The data show that curcumin may exert a protective effect against DNA damage induced by mutagens present in food.

**Key words:** curcumin, DNA damage, PhIP, colorectal cancer, chemoprevention