

Vitamin C als Prodrug von H_2O_2 : Möglichkeiten zur intravenösen Hoch- dosistherapie bei Krebserkrankungen?

Gernot Bruchelt und Zyrafete Kuçi

Vitamin C und Krebs: Eine endlose Debatte

Das Kapitel Vitamin C und Krebs wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Das betrifft sowohl seine Rolle als möglicher Schutzfaktor bei der Krebsentstehung als auch die Frage, ob und wie Vitamin C bei der Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden soll – in Kombination mit bekannten Behandlungsstrategien [Strahlen-, Chemotherapie (1)] oder, hochdosiert, als alleiniges Agens (2). Die Gründe für die Schwierigkeit, die Rolle von Vitamin C angemessen und eindeutig zu beurteilen, sind vielfältig: Vitamin C (Ascorbinsäure / Ascorbylradikal / Dehydroascorbinsäure) ist ein Redoxsystem, das mit vielen anderen im Stoffwechsel weit verbreiteten Redoxreaktionen interagieren kann, die bei den verschiedenen Zellen unterschiedlich ausgeprägt vorliegen und dadurch auch unterschiedlich beeinflusst werden können (3). Funktionell gesehen kann

Vitamin C, je nach Umgebungsbedingungen, sowohl als Antioxidans, als Prooxidans oder als Cofaktor von enzymatischen Reaktionen fungieren (4), und all diese Prozesse können innerhalb einer Zelle an verschiedenen Stellen des Stoffwechsels parallel ablaufen.

Bei Ergebnissen, die aus Zellkultur- und Tierversuchen erhalten wurden, besteht darüber hinaus das allgemein bekannte Problem, dass es sehr schwierig ist, daraus Rückschlüsse auf die Situation beim Patienten zu ziehen: Je nach eigener emotionaler Einstellung diesem Themenbereich gegenüber [es gibt nur wenige medizinisches Themen, die seit Jahrzehnten so emotional diskutiert werden wie die Rolle von Vitamin C bei Krebs (5)], wird man jeweils andere Schlussfolgerungen aus vorhandenen, oft (bewusst oder unbewusst) selektiv vorsortierten Daten ziehen, die dann als »Beweise« für die Wirksamkeit von Vitamin C herangezogen, oder als »Artefakte« abgetan werden.

Klinische Studien am Menschen waren bisher nicht in der Lage, eindeutige Interpretationen zu liefern. Die insbesondere von Pauling und Cameron publizierten positiven Ergebnisse mit hochdosierter Ascorbinsäure (6) wurden durch andere klinische Studien nicht bestätigt (7), die aber ihrerseits Einwände hinsichtlich der Art ihrer Durchführung hervorriefen. Trotz zahlreicher Fallberichte über die Wirksamkeit von Vitamin C (z. B. 8) schien das Thema in der Schulmedizin endgültig ad acta gelegt worden zu sein. Deswegen hat eine im September 2005 von Qi Chen et al. aus der Arbeitsgruppe von Mark Levine am NIH in Bethesda, USA, veröffentlichte Arbeit (9) großes Aufsehen hervorgerufen; auch in den Medien (Spiegel online, Stern, BBC News u. a.) wurde darüber berichtet. Aufbauend auf In-vitro-Untersuchungen und daraus abgeleiteten theoretischen Überlegungen wurde dabei der Vorschlag gemacht, *hochdosiertes* Vitamin C durch *intravenöse* Gabe bei Krebserkrankungen in einer *kontrollierten klinischen* Studie einzusetzen. Mark Levine, der viele Arbeiten zu diesem Thema in den führenden naturwissenschaftlichen und medizinischen Zeitschriften veröffentlichte, gehört seit Jahrzehnten zu den renommiertesten Vitamin-C-Forschern und man kann daher annehmen, dass seine Schlussfolgerungen wohl überlegt sind (10, 11). Ausgehend von ihren Ergebnissen an Zellkulturen, und unter Berufung auf Arbeiten aus der alternativen Medizin, die die hohe Sicherheit der hochdosierten intravenösen Behandlung mit Vitamin C belegen, plant die

Zusammenfassung

Die Rolle von Vitamin C (Ascorbinsäure) bei der Behandlung von Krebserkrankungen wird seit Jahren sehr kontrovers diskutiert und hat im Bereich der Schulmedizin nicht allzu viele Anhänger. Eine im September letzten Jahres publizierte Arbeit einer renommierten Forschergruppe am NIH hat deshalb großes Aufsehen erregt, da hier, aufbauend auf Zellkulturversuchen, der Vorschlag gemacht wurde, hochdosiertes Vitamin C durch intravenöse Applikation bei der Therapie von Krebserkrankungen einzusetzen. Ascorbinsäure soll dabei über die Generierung von H_2O_2 wirksam sein. Diese Arbeit wird hier vorgestellt und besprochen und in Relation zu anderen möglichen Wirkungsmechanismen von Ascorbat gestellt.

Schlüsselwörter: Vitamin C, Ascorbinsäure, Krebstherapie, H_2O_2 , Wasserstoffperoxid, HIF, Warburg'sche Krebstheorie

Gruppe nun eine kontrollierte Phase-1-Studie an Krebspatienten. Im Folgenden soll auf diesen in PNAS veröffentlichten Artikel näher eingegangen werden.

Pharmakologische Ascorbatkonzentrationen zerstören selektiv Krebszellen: Wirkung als Prodrug über die Bildung von H₂O₂

Die Autoren dieser Arbeit (9) gehen davon aus, dass ausgebliebene Effekte vorausgegangener klinischer Untersuchungen bezüglich der Wirkung von oral eingenommenem hochdosiertem Ascorbat auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass dabei Serumascorbatspiegel von maximal ca. 200 µmol/l erhalten werden. Im Gegensatz dazu können bei intravenöser Applikation der gleichen Ascorbatmenge Serumspiegel im millimolaren Bereich über einen bestimmten Zeitraum erreicht werden. Diese hohen Konzentrationen seien aber die Voraussetzung zur Abtötung der Krebszellen. In In-vitro-Experimenten wurden in der Arbeit von Qi Chen zehn verschiedene Krebszelllinien (Mensch/Maus) und vier nichtmaligne Zellarten (u.a. Fibroblasten und direkt aus Blut isolierte Lymphozyten und Monozyten) in gebräuchlichen Zellkulturmedien mit 10% Serum für eine Stunde behandelt; einen Tag später wurde das Überleben der Zellen mit Hilfe des so genannten MTT-Tests bzw. über mikroskopische Messung der Apoptose/Nekrose bestimmt. Dabei zeigte sich, dass unter den Bedingungen, unter denen ein großer Teil der Krebszellen abgetötet wurde, die nichtmalignen Zellen auch durch sehr hohe Ascorbatkonzentrationen (20 mM) nicht beeinflusst wurden. Darüber hinaus wurden mit den Krebszellen Koloniebildungsversuche gemacht, die deutliche Hemmeffekte zeigten, allerdings bei den verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß.

Untersuchungen bezüglich des Mechanismus ergaben, dass die toxische Wirkung des Ascorbats offensichtlich über die Bildung von H₂O₂ zustande

kommt: Ascorbat wirkt also als Prodrug, und zwar, wie die Autoren ausführen, »ironischerweise« als Prooxidans. In Hinblick auf mögliche spätere klinische Anwendungen erklären die Autoren die Sicherheit dieses Ansatzes damit, dass Ascorbat, solange es im Blut zirkuliert, offensichtlich kaum H₂O₂ produziert, und wenn doch, dass dies kein Problem darstellt, da Serum und vor allem Erythrozyten (über das Glutathionsystem und über die Katalase), dieses sofort entgiften. Erst wenn das Ascorbat aus der Blutbahn austritt und vor Erreichen der Zielzellen (Krebszellen) in den interstitiellen Raum übertritt, kommt es zu einer intensiven H₂O₂-Bildung. Im Gegensatz zum Serum ist hier die Proteinkonzentration gering, und die Autoren haben Hinweise, dass die Bildung von H₂O₂ offensichtlich in Gegenwart eines ca. 10–30 Kd großen Proteins (wahrscheinlich eines Enzyms mit einem redoxaktiven Metallion im aktiven Zentrum) zustande kommt (**Abb. 1**). In vitro zeigte das unter diesen Bedingungen aus Ascorbat generierte H₂O₂ gleiche Effekte wie reines H₂O₂.

Die zytotoxische Wirkung von H₂O₂ könnte nun – ohne dass die Autoren das genauer beschrieben haben – über eine Reihe verschiedener Prozesse verursacht sein (Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren usw.). Aus eigenen Arbeiten wissen wir, dass H₂O₂ durch Auslösung von DNS-Strangbrüchen die Poly(ADP-Ribose) Polymerase aktiviert, die durch Verbrauch von NAD⁺ schließlich zu einer Verarmung an ATP führt und dadurch den Energiestoffwechsel der Zelle empfindlich beeinflusst (12). Die Autoren folgern aus ihren experimentellen Daten, dass nach intravenöser Applikation von Ascorbat analoge Reaktionen auch in vivo auftreten und dass sich dieses Verfahren daher zur Behandlung von Krebserkrankungen eignen könnte.

Eine Einschränkung bezüglich der therapeutischen Sicherheit des Ansatzes sehen sie nur bei Patienten mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Überführung von Glucose-6-Phosphat in 6-Phosphogluconat unter

Bildung von NADPH, das u.a. bei der Aufrechterhaltung eines wirkungsvollen Glutathion (GSH)-Spiegels in Erythrozyten eine wichtige Rolle spielt), da bekannt ist, dass hohe Ascorbatkonzentrationen bei diesen Personen Hämolyse auslösen. Die Autoren führen diesen bisher unerklärten Effekt nun auf die von Ascorbat ausgehende H₂O₂-Bildung zurück. In diesem Zusammenhang sei auch noch erwähnt, dass eine andere Arbeitsgruppe ebenfalls zu dem Ergebnis gekommen ist, dass Ascorbat über die Bildung von H₂O₂ ein effektives Agens zur Zerstörung von myeloischen Leukämiezellen darstellt (13).

Diskussion

Wie sind diese Daten nun zu beurteilen? Grundsätzlich existiert das bereits erwähnte Problem der fraglichen Übertragbarkeit von In-vitro-Daten auf die In-vivo-Situation (»There are many substances that have been shown to kill cancer cells in the lab but failed to fulfil that promise when tested in people« war ein Kommentar von H. Scowcroft, Senior Information Officer at Cancer Research, UK in der BBC). Des Weiteren muss die Frage gestellt werden, ob die Bildung von H₂O₂ wirklich der zentrale Mechanismus der Ascorbatwirkung ist: Ascorbat kann mit so vielen Stoffwechselprozessen interagieren, dass zusätzlich zu den H₂O₂-Effekten eine Reihe weiterer Reaktionen (sowohl zytotoxische als auch schützende!) in Frage kämen, wie später noch exemplarisch erläutert werden wird. Ein weiterer Punkt betrifft die Frage, wie gut der MTT-Test zur Unterscheidung der unterschiedlichen Wirkung auf Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen geeignet ist: In diesem Test wird vor allem die Fähigkeit intakter Mitochondrien der Zellen gemessen, das Tetrazoliumsalz MTT zu dem entsprechenden Formazan zu reduzieren, d.h. in den Test geht sowohl die Menge der vorhandenen Zellen (beeinflusst durch ihre Proliferationsrate) als auch ihre Vitalität ein. Da aber

zumindest Lymphozyten und Monozyten unter den gewählten Bedingungen im Gegensatz zu den Krebszellen nicht proliferieren, ist beim Vergleich dieser Zellen mit schnell proliferierenden Krebszellen Vorsicht geboten.

Darüber hinaus ist anzumerken, dass auch unter den in der Arbeit beschriebenen Testbedingungen die Krebszellen – wie zu erwarten war – sehr unterschiedlich empfindlich auf die eingesetzten Ascorbatkonzentrationen reagiert haben: Die verwendete Lymphomazelllinie war z.B. weitaus empfindlicher als die anderen Krebszelllinien. Zusätzlich muss darauf hingewiesen werden, dass von Patient zu Patient die Zellen auch bei gleicher Krebsart verschieden sind bzw. dass sie auch bei ein und derselben Person heterogen und dadurch unterschiedlich empfindlich sind. Ferner müssen auch die unterschiedlichen Milieubedingungen (z.B. normoxisch/hypoxisch) in Hinblick auf ihre Empfindlichkeit berücksichtigt werden.

Wenn man die vielen Einflussfaktoren berücksichtigt, sollte man nicht so sehr davon ausgehen, dass mit dem Vitamin C ein generell wirksames »Anti-Krebs-Mittel« zur Verfügung steht, sondern vielmehr davon, dass es bei einigen Krebsarten und unter bestimmten Bedingungen wirksam sein könnte, bei anderen nicht. Die Ergebnisse der von Levine geplanten Phase-1-Studie mit intravenös verabreichtem Vitamin C werden sicherlich zur Aufklärung mancher Sachverhalte beitragen und werden mit großem Interesse erwartet. Substanzen wie z.B. Interferon, die zu Beginn euphorisch als »Wundermittel« im Kampf gegen den Krebs begrüßt wurden, haben auch erst im Verlauf vieler Jahre und nach Aufklärung einiger ihrer Wirkungsmechanismen ihre Nischenplätze zur Behandlung bei ganz bestimmten Erkrankungen gefunden.

Je mehr man über die biochemischen Eigenheiten der Stoffwechselfvorgänge von Krebszellen lernt (und die Fortschritte auf diesem Gebiete sind wirklich atemberaubend), desto besser wird es auch gelingen, mögliche

Angriffspunkte von Substanzen wie Vitamin C ausfindig zu machen, um sie dann gezielter einsetzen zu können. In diesem Zusammenhang sei exemplarisch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit erwähnt, die bemerkenswerte Zusammenhänge zwischen den Vorstellungen Otto Warburgs über den Energiestoffwechsel der Krebszellen und einer möglichen Rolle von Vitamin C bei der Beeinflussung dieser Prozesse aufzeigt (22).

Effekt von Vitamin C auf die Aktivität des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) in Krebszellen

Der spätere Nobelpreisträger Otto Warburg hatte schon 1924 das Phänomen beschrieben, dass viele Krebszellen ihren Energiestoffwechsel (ATP-Produktion) auch unter aeroben Bedingungen bevorzugt über die Glykolyse (Abbau von Glucose zu Lactat) anstelle der im Prinzip weitaus effektiveren oxidativen Phosphorylierung durchführen (14, 15). Dieser Effekt wird schon länger diagnostisch bei der Darstellung von Krebszellen in der Positro-

nen-Emissions-Spektroskopie ausgenutzt, da $[^{18}\text{F}]2\text{F-Deoxyglucose}$ von diesen durch eine gesteigerte Expression der Glucosetransporter vermehrt aufgenommen wird. Die molekularen Ursachen des Warburg-Effektes wurden in den letzten Jahren immer besser aufgeklärt und sind zur Zeit Thema intensiver Forschungsarbeiten. Darauf aufbauend wurden therapeutische Überlegungen konzipiert, über die Beeinflussung der Glykolyse das Wachstum der Krebszellen zu hemmen (16).

Ein Faktor, der dafür verantwortlich ist, dass Zellen ihren Energiestoffwechsel von der sauerstoffabhängigen oxidativen Phosphorylierung in die sauerstoffunabhängige Glykolyse lenken, ist der *Hypoxia-inducible factor* (HIF), der als Hauptregulator dieses Prozesses gilt (17, 18, 19). HIF wird aber nicht nur unter dem Einfluss der Hypoxie gebildet, sondern auch durch verschiedene andere Bedingungen in seiner Expression und in seinem Abbau reguliert. Besonders bei Krebszellen hat man gefunden, dass auch unter normoxischen Bedingungen HIF in großer Konzentration vorhanden ist, wodurch es zu einer vermehrten Expression der Gluco-

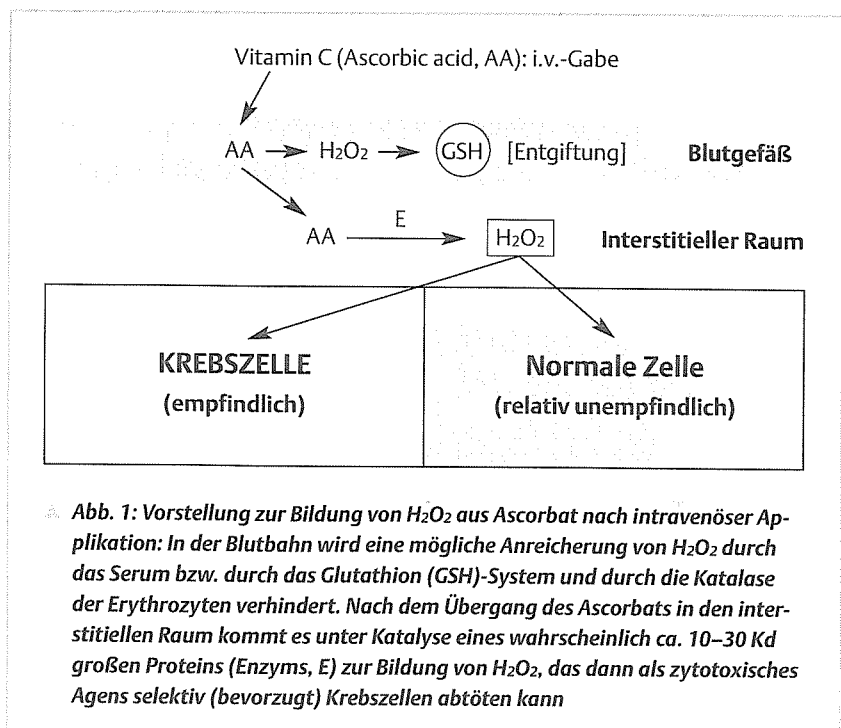


Abb. 1: Vorstellung zur Bildung von H₂O₂ aus Ascorbat nach intravenöser Applikation: In der Blutbahn wird eine mögliche Anreicherung von H₂O₂ durch das Serum bzw. durch das Glutathion (GSH)-System und durch die Katalase der Erythrozyten verhindert. Nach dem Übergang des Ascorbats in den interstitiellen Raum kommt es unter Katalyse eines wahrscheinlich ca. 10–30 Kd großen Proteins (Enzyms, E) zur Bildung von H₂O₂, das dann als zytotoxisches Agens selektiv (bevorzugt) Krebszellen abtöten kann

setransporter bzw. verschiedener glykolytischer Enzyme kommt. Die aktuelle Konzentration von HIF wird einerseits durch seine Bildungsrate, andererseits durch seine Abbaurrate bestimmt. HIF ist ein Heterodimer, das sich aus einer konstitutiv exprimierten beta-Einheit und einer streng regulierten alpha-Einheit zusammensetzt. HIF1-alpha wird proteosomal abgebaut.

Im Zusammenhang mit Vitamin C ist es von großem Interesse, dass ein entscheidender Schritt dieses Abbaues die Hydroxylierung von Prolinresten über Prolylhydroxylasen (PHD, Prolyl-Hydroxylase-Domain) zur Voraussetzung hat. Diese Hydroxylierung von Prolinresten in einer Peptidkette war lange nur als der charakteristische, ascorbatabhängige Teilschritt der Kollagensynthese (Procollagen-Prolyl-Hydroxylase-Reaktion) bekannt (20, 21). Es war deshalb naheliegend zu untersuchen, welche Rolle Vitamin C beim proteosomalen Abbau von HIF spielt. Tatsächlich fanden Knowles et al., dass unter normoxischen Bedingungen Vitamin C HIF abbauen kann und daher indirekt einen wichtigen Einfluss auf die Glykolyse von Krebszellen ausübt (22). In der Arbeit wurde beschrieben, dass Vitamin C darüber hinaus auch die Expression von HIF1-alpha (also die Neusynthese) inhibiert und deshalb auf zweifache Weise die HIF-Konzentration (und daher potenziell auch die

Glykolyse) nach unten reguliert. Deshalb könnte Vitamin C über die Beeinflussung der Glykolyse eine Rolle bei der Behandlung von Krebszellen in normoxischer Umgebung (nicht in hypoxischer Umgebung!) spielen.

Wie komplex allerdings die Situation insgesamt ist, zeigt der Umstand, dass HIF, neben vielen anderen Effekten, auch die Transkription der für die Kollagensynthese wichtigen Procollagen-Prolylhydroxylase fördert (21). D.h.: Während der Abbau von HIF durch die ascorbatabhängige Aktivierung der Prolylhydroxylase im Sinne einer Reduzierung der Glykolyse in Hinblick auf eine Schwächung des Energiestatus der Krebszellen von Vorteil ist, wäre eine damit verbundene Reduzierung der Procollagen-Prolylhydroxylase-Aktivität natürlich unerwünscht (Schwächung der Kollagensynthese und dadurch eventuell Förderung der Neigung zur Metastasierung). Dieses Beispiel mag repräsentativ die große Komplexität der Geschehnisse illustrieren und die damit verbundene Schwierigkeit darstellen, therapeutische Effekte einer *scheinbar* so einfachen Substanz wie Vitamin C richtig einzuschätzen.

Wenn es aber gelänge, zumindest einige Krebsformen zu finden, die relativ verwundbar gegenüber einer optimal konzipierten Vitamin-C-Therapie sind, wäre das ein großer Fortschritt, da die Substanz preiswert, sicher und

wahrscheinlich relativ frei von gravierenden Nebenwirkungen ist. Was aber nicht zu erwarten ist, ist die Erfüllung der Wunschvorstellung, dass mit dem Vitamin C sozusagen ein generelles Wundermittel im Kampf gegen Krebs zur Verfügung steht.

Prof. Dr. rer. nat. Gernot Bruchelt

Univ. Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Hoppe-Seyler-Str. 1
72076 Tübingen
gernot.bruchelt@med.uni-tuebingen.de

Literatur

- 1 Seifried HE, McDonald SH, Anderson DE, Greenwald P, Milner JA: The antioxidant conundrum in cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 4295–4298.
- 2 Wittes RE: Vitamin C and Cancer. *N Engl J Med* 1985; 312: 178–179.
- 3 Davies MB, Austin J, Partridge DA: Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry. Cambridge: Royal Society of Chemistry Paperbacks; 1991.
- 4 Halliwell B, Gutteridge JM: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publications; 1999.
- 5 Barinaga M: Vitamin C gets a little respect. *Science* 1991; 254: 374–376.
- 6 Cameron E, Pauling L: Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1978; 75: 4538–4542.
- 7 Moertel CG, Fleming TR, Cregan ET, et al.: High dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med* 1985; 312: 137–141.
- 8 Cameron E, Campbell A: Innovation vs. quality control: an 'unpublishable' clinical trial of supplemental ascorbate in incurable cancer. *Med Hypothesis* 1991; 36: 185–189.
- 9 Qi Chen, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, et al.: Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2005; 102: 13604–13609.
- 10 Henson DE, Block G, Levine M: Ascorbic acid: Biologic functions and relation to cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 547–550.
- 11 Padayatty SJ, Levine M: Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: Emerging evidence, open minds and serendipity. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 423–425.
- 12 Bruchelt G, Schrauffstätter I, Niethammer D, Cochrane CG: Ascorbic acid enhances the effects of 6-hydroxydopamine and H₂O₂ on iron-dependent DNA strand breaks and related processes in the neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Cancer Res* 1991; 51: 6066–6072.

Summary

Vitamin C as a prodrug of H₂O₂: Are there chances for an intravenous high-dose therapy of cancer?

The role of vitamin C (ascorbic acid) as an optional therapy of cancerous affections has been discussed for a couple of years. So far, this kind of treatment has not found many supporters. Based on cell cultures, a paper published in September 2005 by a group of reputed researchers at the NIH, came to the conclusion that intravenous application of high doses of vitamin C might have positive effects on cancer patients. It was suggested that ascorbic acid could cause generation of H₂O₂. We comment on essentials of this paper, indicating relationships to other work on the subject of potential mechanisms involved in connection with ascorbate.

Key words:

Vitamin C, ascorbic acid, cancer control, H₂O₂, hydrogen peroxide, HIF, Warburg's cancer theory

- 13 Park S, Han SS, Park CH, Hahm ER, et al.: L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2180–2195.
- 14 Warburg O, Posener K, Negelein E: Über den Stoffwechsel von Tumoren. *Biochem Z* 1924; 152: 319–344.
- 15 Warburg O: On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309–314.
- 16 Garber K: Energy boost: The Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Institute* 2004; 96: 1805–1806.
- 17 Semenza GL: HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000; 14: 1983–1991.
- 18 Esteban NA, Maxwell PH: HIF, a missing link between metabolism and cancer. *Nature Med* 2005; 11: 1047–1048.
- 19 Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721–732.
- 20 Berra E, Ginouvès A, Pouyssegur J: The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 2006; 7: 41–45.
- 21 Schofield CJ, Ratcliffe PJ: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 343–353.
- 22 Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ: Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1764–1768.