

Peranan β -karoten dalam Sistem Imun untuk Mencegah Kanker

Federika Kondororik¹, Martanto Martosupono¹, AB Susanto²

¹Program Pascasarjana Magister Biologi Universitas Kristen Satya Wacana

²Program Pascasarjana Oseanografi Universitas Diponegoro

Email: federikakondororik@gmail.com

Abstrak

β -karoten merupakan salah satu jenis karotenoid yang melimpah pada buah dan sayuran di alam. β -karoten memiliki potensi sebagai antioksidan membuat beta-karoten dapat berperan sebagai agen antikanker secara langsung, dan juga memiliki potensi membantu meningkatkan sistem imun untuk membantu para pejuang kanker. Beta(β)-karoten dapat bekerja sama dengan sistem imun sebagai faktor kausatif untuk mencegah kanker. β -karoten dapat menjaga sistem imun dari kerusakan yang disebabkan oleh ROS (Reactive Oxygen Species) sehingga sistem imun dapat menjalankan tugasnya dengan maksimal agar dapat mengenali sel-sel abnormal dalam tubuh yang nantinya dapat menyebabkan penyakit, antara lain kanker.

Kata Kunci : Beta-karoten, Sistem Imun, Kanker, Antioksidan, Antikanker

Pendahuluan

Jumlah dan jenis karotenoid di alam memang tidak sedikit, \pm terdapat 700 jenis karotenoid yang sudah ditemukan dan diisolasi, 50 jenis diantaranya memiliki potensi sebagai provitamin A, 40 jenis ditemukan dalam diet (makanan) yang dikonsumsi oleh manusia dan 20 jenis dari 40 jenis ditemukan dalam darah dan jaringan manusia. Sekitar 90 % dari karotenoid pada tubuh manusia adalah, β -karoten, α -karoten, likopen dan kriptosantin. Jenis karotenoid yang menjadi prekursor vitamin A pada manusia adalah: α -karoten, β -karoten, dan β -kriptosantin [1,2].

Peto *et al.*, menyatakan bahwa β -karoten mungkin dapat menjadi agen antikanker utama yang terdapat dalam buah dan sayuran [3], jika kita mengkonsumsi makanan yang memiliki kandungan β -karoten yang tinggi, maka akan berdampak pada rendahnya kasus kanker, terutama kanker paru-paru. Hal ini mungkin berkaitan dengan mekanisme kemoprevansi yang dapat meningkatkan respon sistem imun [4]. Penyebab meningkatnya sistem respon sistem imun, mungkin dikarenakan oleh status vitamin A dari provitamin A karotenoid, atau kapasitas singlet oksigen dan antioksidan karotenoid tersebut. Dimana vitamin A sendiri merupakan agen dalam meningkatkan kerja sistem imun [5]. Namun yang nantinya dalam penelitian skala populasi yang dilakukan oleh ATBC (*Alpha-Tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention*) dan CARET (*Carotene and Retinol Efficacy Trial*), menunjukkan hasil yang berbeda, konsumsi β -karoten pada penderita kanker paru-paru yang merupakan perokok mengalami peningkatan kasus kanker paru-paru [6].

Sebagai prekursor vitamin A, β -karoten memiliki peranan penting dalam penglihatan, pertumbuhan, reproduksi dan imunitas, selain itu juga memiliki kapasitas antioksidan yang baik. Karena kapasitas antioksidan dari β -karoten dan karotenoid jenis lain sehingga dapat bermanfaat sebagai agen kemopreventif. β -karoten sangat penting dalam diet manusia, karena jika level β -karoten dalam jaringan rendah hal ini dapat menyebabkan beberapa jenis kanker [7,8].

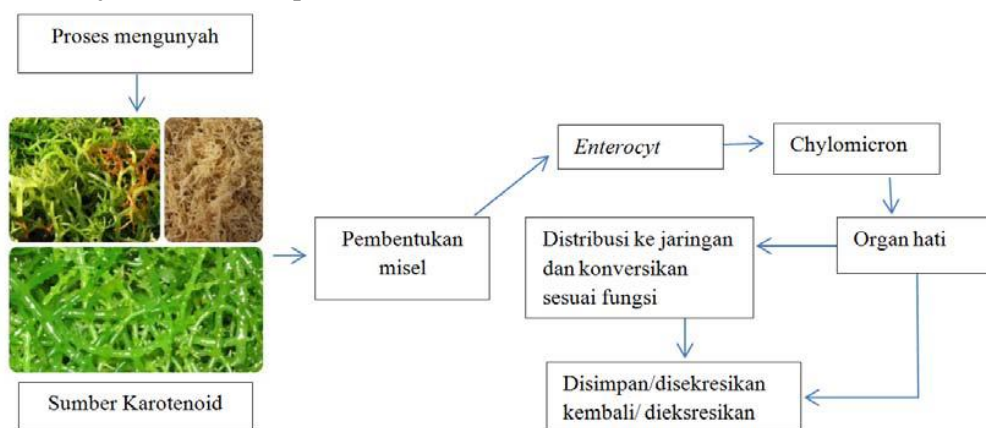
Studi epidemiologi menunjukkan bahwa hubungan antara mengkonsumsi makanan yang kaya akan karotenoid dapat mengurangi beberapa jenis kanker. Beta-karoten menjadi salah satu jenis karotenoid yang dapat mencegah kanker, dan hal ini didukung dengan beberapa penelitian

in vitro. Sistem imun memainkan peran utama dalam pencegahan kanker, beta-karoten disarankan dapat membantu meningkatkan fungsi kerja sel imun tubuh [9].

Berdasarkan uraian diatas, maka dalam review ini akan dibahas mengenai, β -karoten pada manusia, β -karoten dalam sistem imun, interaksi antara sistem imun dan kanker, dan penelitian tentang β -karoten dan efeknya pada peningkatan sel-sel sistem imun.

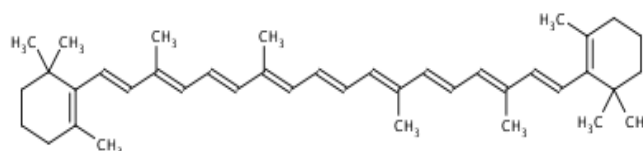
Beta-karoten pada manusia

Beta-karoten dan karotenoid jenis lainnya yang terkandung didalam makanan yang kita konsumsi merupakan karotenoid dalam bentuk yang kompleks dengan protein dan kristal karotenoid oleh sebab itu diperlukan proses pengolahan. Proses pengolahan bertujuan untuk meningkatkan bioavailabilitas karotenoid sebagai satu bagian proses pencernaan makanan yang menyediakan nutrisi tertentu yang akan digunakan dalam fungsi fisiologis tubuh [10]. Proses pencernaan dan penyerapan karotenoid yang terjadi didalam tubuh dimulai, sejak makanan yang dikonsumsi (karotenoid), melalui proses pengunyahan, selanjutnya proses pembentukan misel, kemudian hasil dari pembentukan misel diangkut ke *enterocyt*, *chylomicron*, lalu diangkut ke organ hati, kemudian dari organ hati akan didistribusikan ke jaringan dan dikonversi sesuai fungsi, atau selanjtkan akan disimpan/disekresi dan dieksresi/dikeluarkan [11]



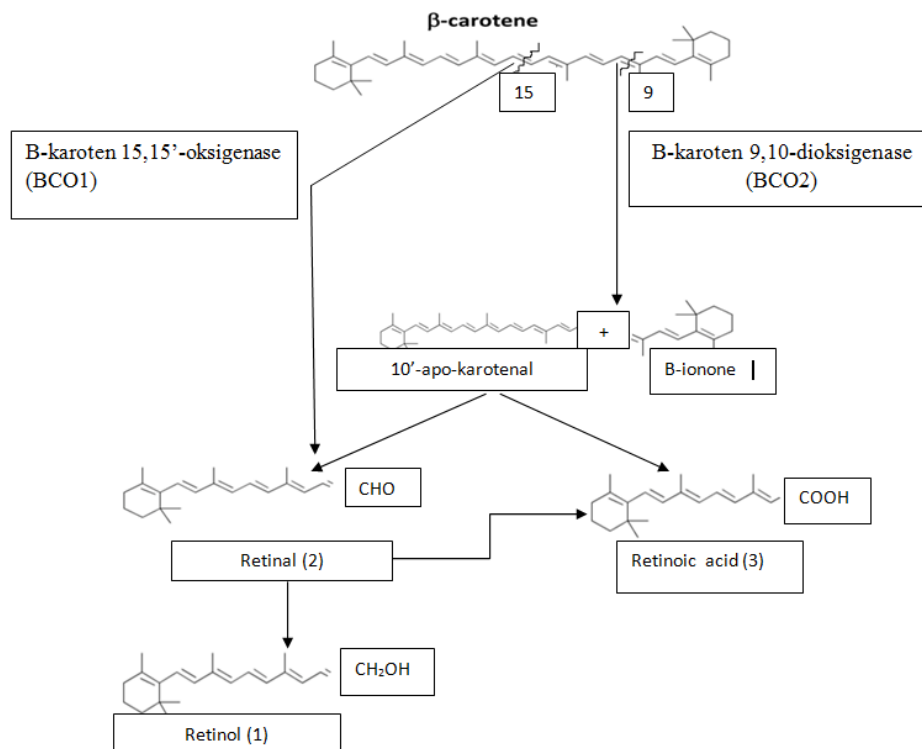
Gambar 1 : skema pencernaan dan penyerapan karotenoid dalam tubuh [11,12]

β -karoten merupakan golongan tetraterpenoid yang tersusun atas 40 atom karbon dengan rumus $C_{40}H_{56}$. β -karoten terdiri atas sebelas ikatan konjugasi dengan dua cincin β -ionin pada awal dan akhir rantai konjugasi. Karena memiliki dua cincin β -ionin sehingga pada proses konversi menjadi vitamin A diperoleh dua molekul vitamin A, hal ini menyebabkan β -karoten menjadi alternatif sumber vitamin A yang lebih baik jika di bandingkan dengan, α -karoten dan kriptosantin yang hanya menghasilkan satu molekul vitamin A. Spektrum maksimal β -karoten pada panjang gelombang 400-500 nm dengan puncak utama sekitar 450 nm [13]



Gambar1 :Stuktur Kimia β -karoten

Beta-karoten sendiri dikenal sebagai salah satu jenis karotenoid yang dapat berperan sebagai provitamin A yang sangat potensial selain α -karoten dan kriptosantin. Terdapat dua cara untuk membelah satu molekul β -karoten menjadi retinol (vitamin A). Pembelahan *central* (pusat/simetris) dan pembelahan *eccentric* (asimetris) dapat dilihat pada gambar 2:



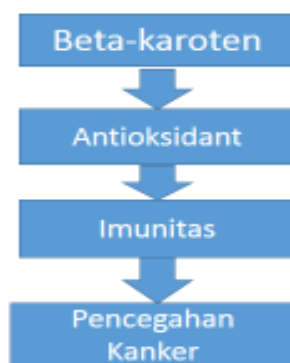
Gambar 2 : Biosintesis satu molekul β -karoten menjadi menjadi (1. Retinol), (2. Retinal), dan (3. Asam retinoid). Proses biosintesis ini dilakukan oleh dua jenis enzim oksigenase yaitu β -karoten 15,15'(BCO1) dan β -karoten 9, 10-oksigenase (BCO2) [14]

Enzim oksigenase merupakan jenis enzim pengkatalisis yang mengkatalisis β -karoten secara simetris dan asimetris. Enzim BCO1 akan memotong secara simetris pada ikatan rangkap 15.15' pada rantai poliena dengan menghasilkan dua molekul retinal. Sedangkan enzim BCO2 akan memotong secara asimetris pada ikatan rangkap 9.10' yang akan menghasilkan satu molekul β -10'-apokarotenal dan satu molekul β -ionin, yang nantinya β -10'-apokarotenal akan disintesis lagi oleh enzim menjadi retinal [15]

Proses penyerapan β -karoten dan karotenoid lainnya pada sayuran 5-30 % jika dibandingkan dengan suplemen sintetik, hal ini disebabkan karena matriks serat dan protein terlebih dahulu harus dipecah dengan proses pengunyahan, asam lambung, asam pankreas dan asam empedu [16]

Karotenoid yang sudah dikonsumsi kemudian akan masuk ke dalam sistem peredaran darah dan akan didistribusikan ke seluruh tubuh. Ada 6 jenis karotenoid yang umumnya dijumpai dalam darah yaitu: α -karotenoid, β -karoten, likopen, lutein, zeaxantin dan β -kriptosantin. Karotenoid ini memiliki fungsi yang berbeda-beda, misalnya α , β -karoten dan β -kriptosantin dikonversi menjadi vitamin A, lutein dan zeaxantin akan didistribusikan ke retina sebagai pigmen yang berperan untuk kesehatan mata. Selain itu juga karotenoid di transfer ke bagian kulit dan berperan sebagai agen anti penuaan dini [12, 17]

Peranan β -karoten dalam Sistem Imun



Gambar 2 Mekanisme Hubungan antara β -karoten, Sistem Imun, dan Mekanisme Pencegahan Kanker. β -karoten memainkan peran sebagai pelindung bagi sistem imun, agar sistem imun dapat menjalankan tugasnya dengan maksimal dalam menjaga kestabilan imun tubuh untuk mencegah penyakit, salah satu diantaranya adalah kanker.

Mekanisme β -karoten dalam mencegah kanker berhubungan dengan potensinya sebagai antioksidan, dimana antioksidan ini dapat meredam kerusakan yang disebabkan oleh ROS dan sebagai provitamin A yang dapat meningkatkan imunitas tubuh. Jenis radikal bebas yang mengandung oksigen secara umum dikenal dengan ROS. ROS dapat menyebabkan peroksidasi fosfolipid pada membran sel, kerusakan DNA dan protein. Kerusakan ini dapat menginduksi terjadinya kerusakan sel dan jaringan pada tubuh [18]. Jika produksi ROS dalam jumlah yang dapat ditoleransi oleh tubuh, maka ROS dapat berperan dalam signal sel, termasuk apoptosis, ekspresi gen, dan aktivasi signal sel. Hal ini dapat dikatakan bahwa ROS dapat melayani sebagai pembawa pesan baik intra maupun inter seluler. Tetapi jika produksi ROS melebihi batas normal dapat membunuh atau menghentikan respon sel imun dan dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti kanker, penuaan dan inflamasi [19, 20, 21]

Hubungan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan merupakan adalah penentu keseimbangan dari fungsi sistem imun, termasuk menjaga integritas dan fungsi membran lipid, protein seluler, asam nukleat, mengontrol signal transduksi dan ekspresi gen dari sistem imun . jumlah maksimum dari antioksidan dibutuhkan untuk mempertahankan respon imun [22]

Pada umumnya sistem imun sangat sensitif terhadap stres oksidatif, hal ini dikarenakan sistem imun sangat bergantung pada sistem komunikasi sel. Ketergantungan khususnya melalui reseptor membran terikat, untuk melakukan tugasnya secara efektif. Asam lemak tak jenuh ganda merupakan penyusun utama membran sel, jika terjadi peroksidasi akibat stres oksidatif dapat menyebabkan hilangnya integritas membran dan dapat mengubah fluiditas membran. Selain itu juga, terjadi penyimpangan pada sinyal intraseluler dan fungsi sel. Antioksidan seperti β -karoten dapat mencegah kerusakan oksidatif membran sel sistem imun, meningkatkan ekspresi molekul sel. Antioksidan dapat menjadi faktor kausatif untuk menjadi asosiasi yang erat antara diet yang kaya akan karotenoid dan mengurangi beberapa insiden jenis kanker [23, 24, 25]

Interaksi antara Sistem Imun dan Kanker

Paul Ehrlich 1909 merupakan tokoh pertama yang memperkenalkan istilah “*immunosurveillance*”. Dimana *immunosurveillance* ini menyatakan bahwa fungsi kekebalan fisiologis tubuh adalah untuk mengenali dan menghancurkan sel-sel tubuh yang mengalami perubahan/abnormal. Paul menyatakan imunitas yang melawan kanker dimediasi oleh ‘*celluler force*’. Ide Paul, kemudian ditambahkan oleh Thomas Lewis dan Sir Macfarlane Burnet yang mengusulkan bahwa imunologi dapat mengenali sel yang mengalami perubahan merupakan

hipotesa awal pada bagian yang memperkenalkan sistem imun dalam pengawasan homeostatis, yang menjaga tubuh dari sel-sel ganas tersebut [26]

Bukti-bukti telah tekumpul sejak pertengahan abad terakhir, pada tingkat laboratorium baik pada hewan uji maupun pasien kanker, bahwa sistem imun dapat mengenali dan menolak tumor [27]. Studi tentang kanker dan interaksinya dengan sistem imun mengungkapkan bahwa efektor sistem imun baik *innate* maupun *adaptive* termasuk dalam mekanisme partisipasi dalam mengontrol dan mengenali sel tumor [28].

Sel efektor utama dari sistem imun yang secara langsung menargetkan sel kanker adalah *natural killer* (NK), sel dendritis (DC), makrofag, leukosit polimorfonuklear (neutrofil, eosinofil dan basofil), sel mast, sitotoksin T limfosit. Sel NK, DC, leukosit polimorfonuklear, sel mast, dan makrofag merupakan efektor baris pertama untuk menghancurkan sel dan sel kanker. Sel T *natural killer* (NKT) dan sel $\gamma\delta$ T dapat memainkan peran baik sebagai sistem imun *innate* (alamiah) dan adaptif, melalui interaksi yang sangat dekat sel dari sistem imun adaptif, seperti CD4 dan CD8 limfosit T dengan efek sitotoksik dan memori. Yang terpenting dari sistem imun *innate* menghambat perkembangan sel kanker menjadi perhatian, yang diikuti dengan interaksi langsung antara kanker dan sel efektor sistem imun *innate*. [28]

Jika terdapat sel yang mengalami transformasi maka akan dideteksi pertama oleh sel NK, sel NK akan menghancurkan dan menyerap sel yang telah mengalami kehancuran oleh makropage dan sel dendritis. Selanjutnya dengan dengan aktifnya makropage dan sel dendritis maka akan mengaktifkan banyak sitokin inflamatori dan kehadiran turunan molekul sel tumor sel T dan B yang nantinya akan menghasilkan sel T spesifik tumor dan antibodi. Untuk sistem imun *adaptive* memainkan peran untuk mengeliminasi sel tumor dan peranan utamanya adalah untuk mengingatkan sistem imun kepada komponen spesifik dari tumor untuk mencegah sel tumor kembali lagi [29]

Efektor dari imunitas adaptif, misalnya CD4+ dan CD8+ secara khusus dapat menargetkan antigen tumor. Antigen sendiri merupakan molekul terekspreasi hanya pada sel tumor sedangkan pada sel normal tidak terekspreasi. Misalnya pada kanker serviks disebabkan oleh virus papilloma, atau kanker hati disebabkan oleh virus hepatitis B. Virus protein dapat juga menjadi antigen tumor dan target untuk antitumor respon imun [28, 30,31].

Penelitian tentang β -karoten dan efeknya pada sistem imun

Beberapa studi yang dilakukan untuk melihat efek β -karoten pada sistem imun dengan memastikan perubahan jumlah subpopulasi limfosit dan aktivitas ekspresi sel penanda. Limfosit adalah sel darah putih, pada sistem imun vertebrata. Studi ini menggunakan bermacam konsentrasi β -karoten dengan dosis 15 mg/d sampai dengan 180 mg/d yang diberikan selama kurang lebih 14-365 hari. Dilaporkan bahwa terjadi peningkatan terhadap jumlah limfosit sel T (CD4+), limfosit sel T (CD8+) dan terjadi peningkatan persentase interleukin (IL) 2 yang merupakan penanda ekspresi dari limfosit sebagai reseptor penerima dan transfer. Untuk orang dewasa meningkatnya konsentrasi CD4+, mengindikasikan bahwa β -karoten dapat berperan dalam meningkatkan kerja sistem imun (*Immunoenhancing*) yang nantinya akan sangat bermanfaat bagi treatment pada pasien penderita human Immunodeficiency virus (HIV). [32, 33, 34]

Studi lain jugamenunjukkanbahwasuplemen β -karotendapatmeningkatkanpresentasi *natural killer* (NK) atauselpembunuh, dimana *natural killer* inisen diri merupakan supopulasi dari limfosit, selini berfungsi untuk membunuh sel-sel tumor dan mengeliminasi infeksi yang disebabkanoleh virus, terutama pada kelompok usia lanjut [33, 35,36]. Berdasarkan penelitian ini β -karoten tidak hanya meningkatkan populasi sel *natural killer* tetapi juga membantu memperkuat daya tahan tubuh pasien kanker. Selain itu perlakuan β -karoten juga menunjukkan fungsi sebagai pelindung kulit dari fotosensitif yang dapat memicu kanker kulit [37]. Penelitian yang dilakukan oleh Bokang *et al.*, menunjukkan skala laboratorium bahwa β -karoten dapat meningkatkan populasi sel NK dan mengurangi ukuran serta berat dari *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) kanker hati pada tikus sebagai hewan uji [38]

Berdasarkan hasil penelitian ATBC dan CARET, [39] β -karoten dapat memberikan efek perlindungan bagi sel-sel tumor dan mengurangi potensi sebagai antioksidan jika dibandingkan dengan sel normal. Pra penelitian secara *in vitro*, dilakukan oleh Riondel *et al.*, dengan sel tumor dan beberapa jenis antioksidan termasuk β -karoten, hasil penelitian ini NK dapat memberikan efek lisis bagi sel tumor, selain itu juga tambahan supplementation β -karoten dapat meningkatkan produksi α necrosis factor tumor, sitokin pra-inflamatory dan anti-karsinogenik. Ini juga menunjukkan kemungkinan bahwa β -karoten juga meningkatkan produksi mediator IL-4 dan IL-6, karena peningkatan pengikatan CD4 + T lymfosit, untuk molekul non-MHC kelas II, dan untuk kasus ini, yang akan bertindak sebagai promotor untuk pra neoplastik/ kemunculan sel abnormal dalam paru-paru perokok [40] Konsumsi β -karoten dalam asupan lebih tinggi, mungkin acara kegiatan pro-oksidan. Terutama dalam kondisi tingkat tinggi O₂, seperti yang terjadi di paru-paru [41]

Kesimpulan

Setiap jenis karotenoid memiliki manfaat bagi kesehatan manusia, β -karoten merupakan salah satu diantaranya. Memiliki potensi antioksidan, dapat menjadi prekursor vitamin A yang sangat baik dan juga dapat meningkatkan sistem imun untuk mencegah penyakit kanker dan juga membantu pasien dalam menguatkan (resisten) tubuh pasien. Sistem kerja sel imun sangat bergantung dari komunikasi sel, β -karoten sendiri berperan dalam menjaga sistem kerja sel imun dan juga meningkatkan sel-sel imun misalnya (CD4+, CD8+ dan *natural killer*) yang nantinya dapat membantu tubuh mengeliminasi sel-sel abnormal dalam tubuh yang dapat menyebabkan kanker.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan beasiswa melalui Program Beasiswa Unggulan kepada Federika Kondororik, melalui Program Pascasarjana Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga. Jawa Tengah.

Daftar Pustaka

1. Carrillo-Lopez, A., Yahia, E. M., and Ramirez-Padilla, G. K., 2010, Bioconversion of carotenoids in five fruits and vegetables to vitamin A measured by retinol accumulation in rat livers. *American Journal of Agricult and Bio Sci.*, 5 (2): 215-221.
2. Irwandi, J., Noviendri, D., Hasrini, R., and Octavianti, F., 2011, Carotenoids, Sources, Medicinal Properties and their application in food and nutraceutical Industry. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 7119-7131.
3. Peto, R., Doll, R., and Buckley, J. D., Sporn, M.B., 1981, Can dietary β -carotene materially reduce humancancer rates? *Nature.*, 290: 201–208.
4. Bendich, A., 1989, Carotenoids and immune response. *Journal of Nutr.*, 119:112-115.
5. Bendich, A., 1991, Beta-carotene and the immune response. *Proceedings of the Nutr Soc.*, 263-274
6. The ATBC Study Group. 1994. The Effect of Vitamin E and Beta Carotene On The Incidence of Lung Cancer and Other Cancers in Male Smokers. *TheNew England Journal of Medicine*, 330: 1029-1035.
7. Paolini, M., Abdel-Rahman, S.Z., Sapone, A., Pedulli, G.F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., Legator, M.S, 2003, Beta-carotene: A cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen?. *Mutat Research.*, 543, 195–200.
8. Kesavan, K., Ratliff, J., Johnson, E.W., Dahlberg, W., Asara, J.M., Misra, P., Frangioni, J.V., Jacoby, D.B., 2010, Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and antiangiogenic effects. *Journal Bio Chem.*, 285, 4366–4374
9. Hughes, D. A., 1999, Effects of carotenoids on human immune function. *The Proceedings of the Nutrition Society.*, 58 (3): 713-8.

10. Patrick, L., 2000. Beta-carotene: the controversy continues. *Alternative Medicine Review*, 5 (6): 530-454.
11. Lee, M. C., Boileau, C. A., Boileau, M. W. T., Williams, W. A., Smanson, S. K., Heintz, A. K., Jhon, W., and Erdman, Jr., 1999, Review of animal model in carotenoid research. *Journal of Nutr.*, 129: 2271-2277.
12. Tuririday, H., and Karwur, F., 2008, Metabolismekarotenoidpadaselhewan: bioavailabilitas, absorpsi, danbiokonversi. *ProsidingSeminar NasionalPigment.*, pp. 431-443.
13. Gross, J., 1991, Pigments in vegetables. *Chlorophylls and Carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold.
14. Tang, G., and Russell, R., 2009, Carotenoids as a provitamin A. G. Britton, J. Liaaen, & H. Pfander, *Carotenoids*. Germany: BirkhauserVerlag Basel. pp. 127-140.
15. Wyss, A., 2004, Caroteneoxygenases: a new family of double bond cleavage enzymes. *The Journal of Nutr.*, 134(1): 246 – 250.
16. Castenmiller, J., and West, C., 1998, Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual review of nutr.*, 18(1):19 - 38.
17. Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P. S., Muir, G. J., Zhao, D., and Katz, N. B., 2002, Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Experiment Bio and Med.*, 227: 845-851.
18. Novo, E., and Parola, M., 2008, Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 1(1): 5. doi: 10.1186/1755-1536-1-5.
19. Percival, M., 1998, Antioxidants. *Clinic Nutr.*, 31:1-4.
20. Hancock, J. T., Desikan, R., and Neil S. J., 2001, The role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem and Biomedic Aspects of Oxidative Modif.*, 29 (2): 345-350.
21. Held, P., 2010, An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells. USA.
22. Simm, M. N., Wu, D., Santos, M. S., and Havek, M. G., 1995, Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *American Journal Clinic Nutr.*, 62: 1462-1476.
23. Gruner, S., Volk, H., Falck, P., and VonBaehr, R., 1986, The influence of phagocytic stimuli on the expression of HLA-DR antigens; role of reactive oxygen intermediate. *Euro Journal of Immunology.*, 6: 212-215.
24. Block, G., Patterson, B., and Subar, A., 1992, Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr and Can.*, 19: 1–29.
25. Baker, K. R., and Meydani, M., 1994, Beta-carotene in immunity and cancer. *Journal of Opti Nutr.* 39–50.
26. Dzivenu, O. K., and O'Donnell-Tormey, J., 2003. Cancer and the immune system: the vital connection. *Can Res Inst.*
27. Finn, O.J., 2008, Cancer immunology. *N. Engl. J. Med.*, 358 :2704–2715.
28. Dranoff, G., 2004, Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Can*, 4:11–22.
29. Finn, O. J., 2012. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology.*, viii6–viii9.
30. Chang, M, H., 2009, Cancer prevention by vaccination against hepatitis B. recent results. *Can Res.*, 181: 85-94.
31. Kenter G. G., Walters, M. J., and Valentijn A. R., 2009, Vaccination against hepatitis HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelialneoplasia. *The New England Journal of Med.*, 361: 183-1847.
32. Alexander, M., Newmark, H., and Miller, R. G., 1985, Oral beta-carotene can increase the number of OKT4+ cells in human blood. *Immu Letters.*, 9:221-224.

33. Watson, R. R., Prabhala, P. H., and Plezia, P. M., Alberts, D. S., 1991, Effect of beta-carotene on lymphocyte subpopulations in elderly humans: evidence for a dose response relationship. *American Journal of Clin Nutr.*, 53:90-94.
34. Murata, T., Tamai, H., Morinobu, T., Manago, M., Takenaka, H., Hayashi, K., and Mino, M., 1994, Effect of long-term administration of betacarotene on lymphocyte subsets in humans. *American Journal of Clin Nutr.*, 60: 597–602
35. Santos, M. S., Leka, L. S., Ribaya-Mercado, J. D., Russell, R. M., Meydani, M., Hennekens, C. H., and Gaziano, J. M., Meydani, S. N., 1997, Short and long-term beta-carotene supplementation do not influence T cell-mediated immunity in healthy elderly persons. *American Journal of Clin Nutr.*, 66:917–924.
36. Santos, M. S., Meydani, S. N., Leka, L., Wu, D., Fotouhi, N., Meydani, M., Hennekens, C. H., and Gaziano, J. M., 1996, Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *American Journal of Clin Nutr.*, 64:772–777.
37. Mathews-Roth M. M., 1989, Beta-carotene: clinical aspects. *New Protective Roles for Selected Nutrients*, New York: Alan R. Liss Inc. pp. 17–38.
38. Bokang, C., Liu, S., and Xiaojun, L., 2012, Effect of β -carotene on immunity function and tumour growth in hepatocellular carcinoma rats. *Molecules.*, 17:8595-8603.
39. Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., and Hiai, H., 1995, Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters.*, 358 : 1–3
40. Fernandes., G, 1997, Beta-carotene supplementation: Friend or foe? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.*, 129:285–287.
41. Palozza., P. 1998, Prooxidant actions of carotenoids in biological systems. *Nutrition Reviews* 56:257–265.