

Received: 2010.07.21
Accepted: 2010.11.08
Published: 2010.11.29

Sulforafan – potencjalny czynnik w prewencji i terapii chorób nowotworowych

Sulforaphane – a possible agent in prevention and therapy of cancer

Joanna Tomczyk, Anna Olejnik

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie

Sulforafan (SFN) jest naturalnym izotiocyjanianem występującym w warzywach krzyżowych, głównie brokułach. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na wielokierunkowe oddziaływanie związku, przemawiające za możliwością jego wykorzystania w profilaktyce i leczeniu chorób nowotworowych. Ochronne właściwości SFN zaobserwowano we wszystkich fazach procesu kancerogenezy. Na etapach poprzedzających nowotworzenie mechanizm działania fitoskładnika polega na modulowaniu aktywności enzymów zaangażowanych w I i II etap biotransformacji niektórych karcynogenów oraz prawdopodobnie na bezpośrednim blokowaniu ich miejsc wiązania z cząsteczką DNA. Następstwem tych właściwości jest zapobieganie powstawaniu adduktów DNA, które mogłyby dać początek mutacji. Poza tym aktywność SFN jest wymierzona w komórki nowotworowe. Wykazano, że związek zapobiega ich ekspansji poprzez ingerowanie w procesy komórkowe obejmujące proliferację, różnicowanie i apoptozę. W badaniach na liniach komórek nowotworowych różnych narządów zaobserwowano zdolność SFN do blokowania cyklu komórkowego głównie w fazie G2/M. W odpowiedzi na wyższe stężenia SFN następowało uruchamianie szlaków śmierci apoptotycznej. Możliwość zastosowania SFN wobec nowotworów inwazyjnych znalazła poparcie w nielicznych badaniach *in vitro*, wskazujących jednakże na jego działanie antyangiogenne i antyprzerzutowe. Dodatkowy mechanizm ochronny tego związku może polegać na oddziaływaniu przeciwzapalnym i przeciwbakteryjnym.

Praca, poza charakterystyką aktywności biologicznej SFN uwzględnia wpływ jego biodostępności oraz dystrybucji w ludzkim organizmie na potencjał przeciwnowotworowy, a także wpływ uwarunkowań genetycznych poszczególnych osobników na szanse powodzenia działań prewencyjnych opartych na suplementacji tym izotiocyjanianem.

Słowa kluczowe:

sulforafan • chemioprewencja nowotworów • metabolizm • biodostępność

Summary

Sulforaphane (SFN) is an isothiocyanate that is naturally present in cruciferous vegetables, with high concentration in broccoli. The results of the most recent studies indicate multi-targeted sulforaphane actions which may contribute to prevention and therapy of cancer. Protective properties of sulforaphane have been observed in every stage of carcinogenesis. The mechanism of protection against the initiation of carcinogenesis by SFN includes modulation of phase I and II xenobiotic-metabolizing enzymes, as well as direct blocking of specific binding sites of carcinogens with the DNA molecule. As a result, sulforaphane inhibits DNA adduct formation, thus reducing the risk of mutations. Further sulforaphane activity is targeted at cancer cells and prevents their expansion due to regulation of proliferation and induction of differentiation or apoptosis.

In vitro studies using various types of cancer cells have revealed the ability of SFN to arrest the cell cycle, particularly in G2/M, while SFN at higher concentration is shown to activate apoptotic pathways. The possible SFN anticancer effect in the progression stage of carcinogenesis has been proved by only a few studies, which provide evidence for its antiangiogenic and antimetastatic influence. Additionally, SFN exhibits anti-inflammatory and antibacterial effects relevant to cancer prevention.

Apart from the biological activity of SFN, this review also focuses on its bioavailability and tissue distribution as well as individuals' genetic predispositions as significant factors influencing the potential efficiency of chemoprevention using this compound.

Key words: sulforaphane • cancer chemoprevention • metabolism • bioavailability

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=924393>

Word count: 5108

Tables: 1

Figures: 3

References: 104

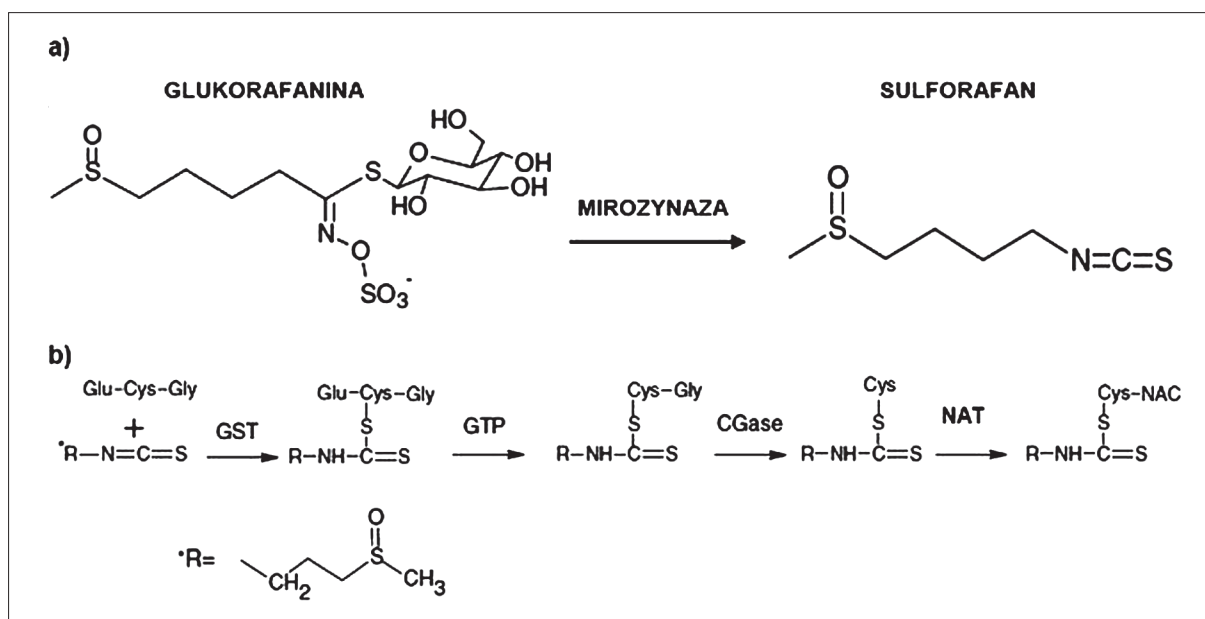
Adres autora: mgr inż. Joanna Tomczyk, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań; e-mail: atomczyk@up.poznan.pl

Wykaz skrótów: **ACF** – aberracje krypt jelitowych (aberrant crypt foci); **AIF** – czynnik indukujący apoptozę (apoptosis inducing factor); **Akt** – kinaza Akt; **AP-1** – kompleks białkowy; **Apaf-1** – czynnik typu 1 aktywujący proteazę apoptotyczną (apoptotic protease activating factor 1); **ARE** – element odpowiedzi na antyoksydanty (antioxidant responsive element); **CDK** – kinazy zależne od cyklin (cyclin-dependent kinases); **COX-2** – cyklooksygenaza 2; **CYP** – cytochrom P-450; **DR5** – receptor śmierci 5 (death receptor 5); **ERK** – kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe; **Fik1/KDR (VEGFR-2)** – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor receptor 2); **GSH** – glutation (glutathione); **GST** – transferaza glutationowa; **HDAC** – deacetylaza histonowa; **HMGB1** – białko dużej mobilności B1 (high mobility group box 1); **HO-1** – oksygenaza hemowa; **IL-1** – interleukina 1; **IL-1β** – interleukina 1β; **iNOS** – syntaza tlenu azotu; **IκBα** – białko inhibitorowe związane z cytosolowym NF-κB; **JNK** – kinaza NH₂-terminalna c-jun; **LPS** – lipopolisacharyd; **MAPK** – mitogennie aktywowane kinazy białkowe; **MMP** – potencjał błony mitochondrialnej (mitochondrial membrane potential), **MRP2** – białko oporności wielolekowej (multidrug resistance protein 2); **MT** – metalotioneiny (izoforymy MT-I, MT-II); **NAC** – N-acetylocysteina; **NDMA** – N-nitrozodimetyloamina; **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor κB), **NO** – tlenek azotu, **NQO1** – oksydoreduktaza NAD(P)H: chinonowa; **Nrf2** – czynnik transkrypcyjny (NF-E2-related factor); **PARP** – polimeraza poli(ADP-rybozy); **PCNA** – antygen proliferacyjny (proliferating cell nuclear antigen); **P_{eff}** – współczynnik przepuszczalności efektywnej (effective permeability coefficient); **PEITC** – izotiocyjanian fenyloetylu (phenethyl isothiocyanate); **PGE2** – receptor prostaglandynowy E2; **QR** – reduktaza chinonowa; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **SFN** – sulforafan; **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworów α (tumor necrosis factor α); **TRAIL** – ligand czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (TNF related apoptosis inducing-ligand), **UGT** – UDP-glukuronylotransferaza, **γ-GCS** – syntetaza γ-glutamylcysteiny.

WPROWADZENIE

Wzrost zachorowań na nowotwory stał się impulsem do poszukiwania sposobów zapobiegania procesom związanym z inicjacją i rozwojem tych chorób. Zainteresowanie naukowców koncentruje się na możliwościach zastosowania składników diety w celu ograniczania powstawania i rozwoju nowotworów. Opisana strategia nosi nazwę chemoprewencji i opiera się na wykorzystaniu nietoksycznych

środków farmakologicznych i substancji naturalnych obecnych w żywności do zatrzymania lub spowalniania procesu kancerogenezy, a nawet odwracania już powstałych zmian [33]. Zainteresowanie chemioprewencją nowotworów wzrasta, a nadzieje związane z tą metodą w leczeniu chorób nowotworowych stają się realne, biorąc pod uwagę to, że rozwój nowotworu inwazyjnego jest procesem wieloletowym i zwykle długotrwałym. Dodatkowo niesatysfakcjonujące wyniki oraz działania niepożądane tradycyjnej



Ryc. 1. Powstawanie (a) i metabolizm SFN (b); GST – transferaza glutationowa, GTP – glutamylotranspeptydaza, CGase – cysteinylglicynaza, NAT – N-acetylotransferaza [według 101, zmodyfikowano]

terapii nowotworowej, związane przede wszystkim z cytotoxicznym działaniem na komórki prawidłowe, wymuszają konieczność poszukiwania bezpiecznych środków pochodzenia naturalnego o swoistym oddziaływaniu celowanym w komórki nowotworowe.

Badania epidemiologiczne wskazują, że cennym źródłem substancji chemioprewencyjnych mogą być warzywa krzyżowe. Stwierdzono, że zawarte w nich fitozwiązki są zdolne do zmniejszania ryzyka zachorowania na nowotwory płuc [61,88,93], piersi [1,26], jelita grubego [59,81] i gruczołu krokowego [32,47]. Prozdrowotne właściwości warzyw z rodziny *Brassicaceae* są związane przede wszystkim z obecnością biologicznie aktywnych izotiocyjanianów. Najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem tej grupy związków o potencjalnym zastosowaniu w profilaktyce chorób nowotworowych jest sulforafan (SFN). Praca omawia mechanizmy przeciwnowotworowego działania tego związku w poszczególnych etapach kancerogenezy w porównaniu z dotychczasową wiedzą na temat jego biodostępności i farmakokinetyki.

WYSTĘPOWANIE, METABOLIZM I BIODOSTĘPNOŚĆ SFN

Prekursorem SFN jest glukorafanina – glukozynolan występujący w warzywach krzyżowych. Głównym źródłem tego związku są brokuły, zawierające średnio 0,8–21,7 μmoli glukorafaniny w 1 g suchej masy [56]. Badania Lianga i wsp. potwierdzają zasobność brokułów w SFN i jednocześnie zwracają uwagę na wahania jego zawartości (0,008–0,18 $\mu\text{moli/g}$ świeżej masy) w zależności od analizowanej odmiany warzywa [58]. Większe ilości glukorafaniny zostały wykryte w kielkach brokułowych kilka dni po skiełkowaniu, natomiast wraz z wydłużaniem czasu hodowli stężenie tego związku szybko malało. W literaturze pojawiają się wzmianki o uzyskaniu nowych odmian tzw. „superbrokułów” charakteryzujących się znacznie większą zawartością izotiocyjanianów, niż odmiany tradycyjne [64].

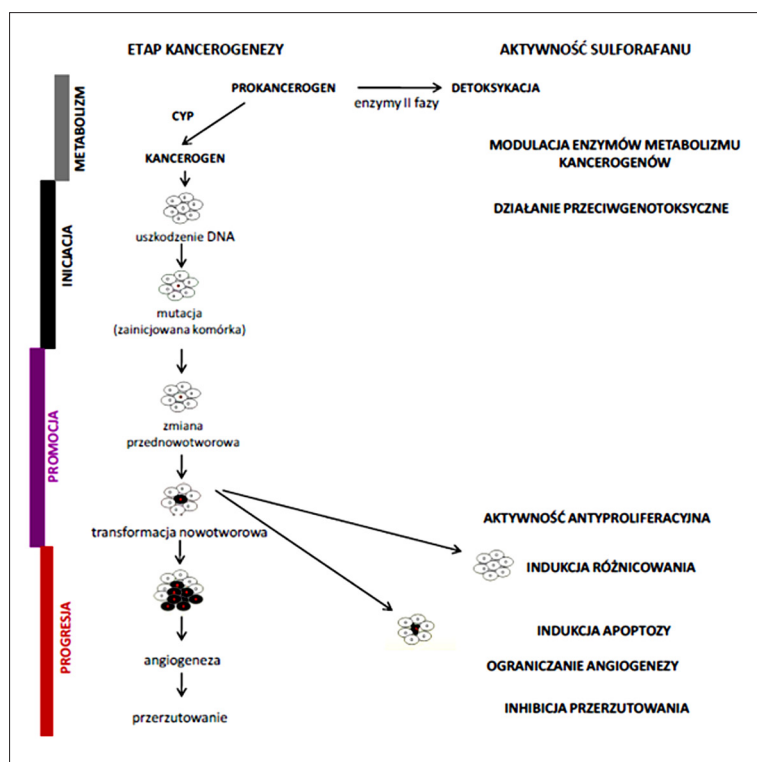
SFN powstaje jako produkt reakcji hydrolizy glukorafaniny. Wspomniana przemiana wymaga obecności enzymu mirozynazy, uwalnianego podczas rozdrabniania tkanki roślinnej. W następstwie gotowania brokułów mirozynaza ulega denaturacji, wskutek czego konwersja glukozynolanów do izotiocyjanianów jest mało wydajna. Po dostarczeniu do organizmu w większości nienaruszonych glukozynolanów, ich przemiana do aktywnych izotiocyjanianów może nastąpić dopiero w jelicie grubym, dzięki aktywności enzymatycznej obecnej tam mikroflory [17].

Badania z wykorzystaniem szczurów F344 karmionych glukorafaniną dowodzą, że związek ulega absorpcji w postaci natywnej, a następnie w wyniku krążenia wątrobowo-jelitowego wraca do jelita, gdzie podlega dalszym przemianom [8]. Jako końcowe produkty metabolizmu, wykrywane w moczu, powstają pochodne skoniugowane z cysteiną i N-acetylocysteiną (NAC) – ryc. 1 [49,101].

Absorpcja i biodostępność SFN zależą od początkowego etapu metabolizmu – hydrolizy glukorafaniny z udziałem mirozynazy. W pracy Conawaya i wsp. podkreślono, że inaktywacja tego enzymu znacząco wpływa na biodostępność izotiocyjanianów [17]. W wyniku spożycia świeżych brokułów osiągnięto prawie 3-krotnie wyższe stężenia izotiocyjanianów w moczu niż po zjedzeniu brokułów gotowanych na parze [17]. Badania Shapiro wskazały 6-krotne obniżenie biodostępności SFN, gdy przemiana glukozynolanów do izotiocyjanianów nie zachodziła z udziałem mirozynazy [82]. Z tego względu do osiągnięcia większych korzyści zdrowotnych zaleca się spożywanie surowych brokułów.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA SFN

Dane literaturowe dowodzą, że SFN wykazuje działanie przeciwnowotworowe na różnych etapach procesu kancerogenezy – ryc. 2. Pierwsze prace badawcze poświęcone



Ryc. 2. Mechanizmy działania przeciwnowotworowego SFN na poszczególnych etapach procesu kancerogenezy

aktywności biologicznej SFN zwracają uwagę na zaangażowanie opisywanej substancji w zmniejszanie ryzyka formowania zmian DNA przez wspomaganie metabolizmu i usuwanie czynników mutagennych oraz genotoksycznych, a także bezpośrednie obniżanie ich reaktywności [5,62]. Na etapie promocji procesu nowotworzenia SFN, ingerując w proliferację, cykl komórkowy, procesy apoptozy i różnicowania komórek nowotworowych, może zapobiegać ekspansji komórek zmienionych genetycznie i ograniczać formowanie zmian nowotworowych [23,25,27,28]. W fazie progresji nowotworu aktywność tego związku wydaje się znacznie mniejsza, choć w badaniach *in vitro* obserwowano jego udział w zakłócaniu angiogenezy [2,7] i przerzutowania [90]. Poza wymienionymi mechanizmami działania SFN istotne dla ochrony przed chorobami nowotworowymi mogą być również jego właściwości przeciwbakteryjne [21,34] i przeciwwzapalne [11,36,60].

DZIAŁANIA PREWENCYJNE SFN

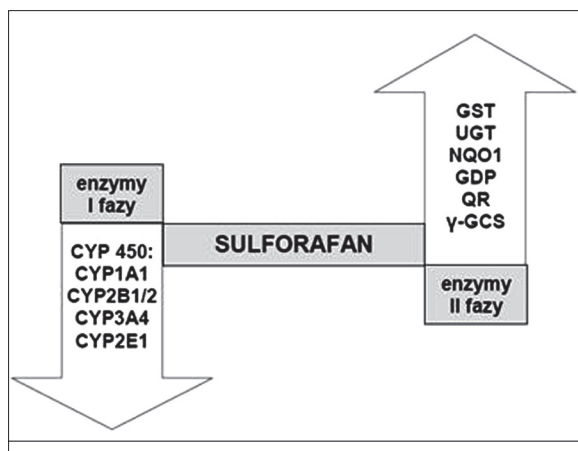
Regulacja aktywności enzymów I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków

Chemioprewencyjne działanie SFN w znacznej mierze wynika z jego zdolności do regulacji metabolizmu ksenobiotyków. W konwersji kancerogenów i ich eliminacji z organizmu uczestniczą dwie grupy enzymów. Enzymy I fazy, należące do rodziny cytochromu P-450, katalizują reakcje oksydacji, redukcji i hydrolizy, które przygotowują kancerogen do dalszych przemian ostatecznie go uczyniających. W toku tych reakcji może dochodzić do aktywacji metabolicznej niektórych prokancerogenów i formowania metabolitów przejściowych zdolnych do oddziaływania z DNA i wywoływania mutacji [98]. W II etapie metabolizmu kancerogenów szczególną rolę odgrywają S-transferaza

glutationu (GST), oksydoreduktaza NAD(P)H: chinonowa (NQO1), UDP-glukuronylotransferaza (UGT) oraz reduktaza chinonowa (QR). Przemiany z udziałem wymienionych enzymów zwiększają rozpuszczalność ksenobiotyków w wodzie i ułatwiają ich wydalanie [35]. Wykazano, że SFN wpływa na oba typy enzymów (ryc. 3), regulując zarówno ich aktywność, jak i poziom ekspresji w komórkach.

W badaniach prowadzonych na hepatocytach szczurzych wykazano hamujące działanie SFN w stosunku do enzymów CYP1A1 i CYP2B1/2. Podobnie w ludzkich komórkach wątroby związek ten obniżał aktywność enzymu CYP3A4 i zmniejszał poziom transkryptu jego genu [62]. Rezultaty badań na mikrosomach komórek wątrobowych szczurów poddanych działaniu acetonu wskazują na funkcjonowanie SFN jako inhibitora kompetencyjnego CYP2E1. Oszacowano, że stała inhibicji K_i dla SFN wynosiła $37,0 \pm 4,5 \mu\text{M}$ [5]. Ze względu na to, że CYP2E1 uczestniczy w aktywacji acetonu jako prokancerogenu, SFN poprzez hamujące oddziaływanie na enzym prawdopodobnie mógłby ograniczać chemiczną kancerogenezę wywołaną przez N-nitrozodimetyloaminę (NDMA). Autorzy pracy potwierdzili to przypuszczenie, wykazując, że izotiocyanian w stosunkowo małych stężeniach ($0,8 \mu\text{M}$) obniżał mutagenne działanie NDMA na szczep *S. thymurium* TA100, natomiast działanie przeciwenotoksyczne w hepatocytach indukowanych za pomocą tego czynnika osiągnięto po zastosowaniu pochodnej glukorafany w stężeniach $0,064\text{--}20 \mu\text{M}$ [5].

Użyteczność SFN jako potencjalnego środka chemioprewencyjnego jest związana ze zdolnością związku do indukcji enzymów II fazy potwierdzonej w badaniach na modelach komórkowych i zwierzęcych. W badaniach *in vitro* opisywane oddziaływanie SFN różniło się zasięgiem



Ryc. 3. Oddziaływanie SFN na enzymy I i II fazy metabolizmu kancerogenów

i typem aktywowanych enzymów w zależności od wykorzystanej linii komórkowej. W przypadku ludzkich hepatocytów linii HepG2 traktowanych tym fitozwiązkiem wykazano wzrost stężenia mRNA UGT1A1 i GSTA1 [3] oraz wzrost aktywności NQO1 [45] i UGT1A1, któremu towarzyszyła glukuronidacja bilirubiny [6]. Aktywację enzymów GST i NQO1 indukowaną SFN zaobserwowano również w hepatocytach mysich linii Hepa1c1c7 [103]. Ponadto autorzy odnotowali, że SFN w stężeniach 0,4–0,8 μM powodował 2-krotny wzrost aktywności QR w tych komórkach. Natomiast Maheo i wsp. stwierdzili indukcję mRNA GSTA1/2 i GSTP1 w hepatocytach szczurzych oraz mRNA GSTA1/2 i GSTM1 w pierwotnych komórkach wątroby pochodzenia ludzkiego [62]. Wprowadzenie izotiocyjanianu do hodowli ludzkich komórek raka jelita grubego linii Caco-2 i HT29 wiązało się z indukcją enzymów GSTA1 i UGT1A1 [6,89]. W wyniku ekspozycji komórek gruczołu krokowego na SFN następował wzrost stężenia mRNA NQO1, co korespondowało ze zwiększoną aktywnością tego enzymu [10]. Rezultaty przytoczonej pracy wskazują także na zdolność SFN do modulowania aktywności syntetazy γ -glutamylcysteinowej (γ -GCS) przez oddziaływanie na jej łańcuch lekki. Opisaną aktywności towarzyszył wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego GSH oraz indukcja GST- α i mikrosomalnej GST.

Badania na zwierzęcym modelu F344 potwierdziły indukcję enzymów II fazy w komórkach stercza i jelita grubego szczurów po zastosowaniu suplementacji diety brokułami lub SFN [52]. W komórkach jelita grubego zwierząt, którym podawano brokuły zaobserwowano 4,5-krotne zwiększenie aktywności NQO1. W późniejszych badaniach na szczurach F344, SFN spożywany przez 5 dni w dawce 3,5 $\mu\text{mol/g}$ masy ciała/dzień powodował wzrost aktywności enzymów NQO1, GST oraz GST- μ w komórkach stercza [46]. W innych narządach, takich jak wątroba, nerki, pęcherz moczowy również obserwowano zwiększoną aktywność NQO-1 i GST. Opisywana właściwość SFN ujawniła się także w badaniach *in vivo* nad absorpcją ekstraktu brokułowego w ilości odpowiadającej ~1,2 g suchej masy brokułów. W ludzkich enterocytach zaobserwowano indukcję enzymów GSTA1 i UGT1A1 [74].

W kolejnych badaniach podjęto próby wyjaśnienia molekularnych mechanizmów stymulacji enzymów II fazy przez

SFN [20]. Jeden z zaproponowanych mechanizmów dotyczy aktywacji czynnika jądrowego Nrf2. Czynniki transkrypcyjny Nrf2 oddziałuje z sekwencją ARE (antioxidant response element) obecną w regionie flankującym 5' wielu genów kodujących enzymy detoksykacyjne. W prawidłowych warunkach Nrf2 jest zatrzymywany w cytosolu komórkowym przez wiązanie z cząsteczką Keap1, zakotwiczoną w cytoszkieletcie aktynowym. Autorzy sugerują, że SFN po przedostaniu się do wnętrza komórki doprowadza do rozpadu kompleksu i uwolnienia cząstki Nrf2. Następnie czynnik transkrypcyjny migruje do jądra komórkowego, gdzie ulega wiązaniu z elementem ARE i stymuluje transkrypcję genów kodujących enzymy II fazy [20]. Myzak i Dashwood wskazują, że oprócz bezpośredniego naruszania kompleksu Keap1-Nrf2, uwalnianie Nrf2 może zachodzić również dzięki aktywacji ścieżki kinaz białkowych MAPK [65].

Badania na myszach pozbawionych genu *nrf2* (*nrf2*^{-/-}) potwierdziły główną rolę czynnika Nrf2 w intensyfikacji transkrypcji genów kodujących enzymy II etapu metabolizmu ksenobiotyków [91]. W grupie zwierząt mających gen *nrf2* (*nrf2*^{+/+}) w wyniku suplementacji SFN (9 $\mu\text{mol/dzień}$) zaobserwowano wyraźne zwiększenie ekspresji genów detoksyfikacyjnych *NQO1*, *GST*, γ -*GCS* i *UGT* w jelicie cienkim. Efekt ten był słabo widoczny u myszy pozbawionych genu kodującego czynnik Nrf2 (*nrf2*^{-/-}) [91]. Podobne rezultaty wykazali McWalter i wsp. przy zastosowaniu diety zawierającej ekstrakt z nasion brokułów [63]. Autorzy odnotowali wzrost aktywności NQO1 i GST w żołądku, jelicie cienkim i wątrobie myszy typu dzikiego, bez znaczących zmian u myszy z wyłączonym genem kodującym Nrf2.

OCHRONA PRZED USZKODZENIAMI DNA INDUKOWANYMI CHEMICZNIE

Liczne badania potwierdzają zaangażowanie SFN w zapobieganie niekorzystnym zmianom DNA indukowanym chemicznie. Aktywność ta w dużej mierze wiąże się z opisaną wcześniej zdolnością do intensyfikacji unieczynniania kancerogenów poprzez indukcję aktywności enzymów II fazy i hamowanie izoenzymów CYP. Dane literaturowe wskazują, że SFN wykorzystuje również inne mechanizmy prowadzące do zapobiegania oddziaływaniom substancji kancerogennych z DNA. Jiang i wsp. zaobserwowali redukcję stężenia adduktów PhIP z DNA w komórkach wątrobiaka HepG2 i prawidłowych ludzkich hepatocytach po dodaniu SFN w trakcie indukcji uszkodzeń [45]. Zastosowanie SFN po ekspozycji na PhIP nie przyniosło istotnych efektów, co sugeruje udział izotiocyjanianu w zapobieganiu interakcji PhIP z DNA, a nie w naprawie powstałych adduktów. Podobnych dowodów dostarczyły badania na komórkach nabłonkowych piersi MCF-10F, w których SFN ograniczał formowanie adduktów benzo(a)pirenu oraz 1,6-dinitropirenu z DNA odpowiednio o 63–81% i 30–56% [87]. W przytoczonych pracach widoczne działanie SFN uzyskano już przy stężeniu poniżej 0,1 μM . Bonnesen i wsp. potwierdzają rolę SFN w ochronie przed uszkodzeniami DNA indukowanymi benzo(a)-pirenem [9]. Autorzy wykazali, że SFN w stężeniu 5 μM ograniczał uszkodzenia DNA komórek jelita grubego mierzone testem kometowym.

Praca Fimognari i wsp. wskazuje na zdolność SFN do ochrony DNA ludzkich limfocytów ekspozowanych na

czynniki o zróżnicowanych właściwościach chemicznych: H₂O₂, metanosulfonian etylu, winkrystynę i mitomycynę C [22]. Redukcja genotoksycznego oddziaływania mitomycyny C i metanosulfonianu etylu przez SFN była związana ze wzmacnianiem odpowiedzi komórek na sygnały apoptotyczne. W próbach eksponowanych zarówno na wymienione substancje genotoksyczne, jak i SFN uzyskano większą liczbę komórek apoptotycznych niż w próbach traktowanych samym czynnikiem uszkadzającym DNA. W przypadku H₂O₂ i winkrystyny nie zaobserwowano podobnej zależności, frakcja komórek apoptotycznych po dodaniu SFN nie uległa istotnym zmianom. Autorzy sugerują, że wobec tych czynników genotoksycznych SFN indukuje inny mechanizm, polegający prawdopodobnie na ograniczeniu proliferacji uszkodzonych komórek i regulacji aktywności swoistych enzymów [22].

Badania na modelach zwierzęcych również dowodzą, że SFN poprzez zmniejszanie następstw genotoksycznych indukowanych różnymi czynnikami może zapobiegać rozwojowi procesu kancerogenezy wywołanej w wielu narządach. Zastosowanie diety zawierającej SFN (80 ppm) przez 3 tygodnie chroniło przed procesem kancerogenezy w obrębie trzustki chomików indukowanym N-nitrozobis(2-oksopropylo)aminą (BOP) [55]. W grupie zwierząt karmionych SFN zaobserwowano zmniejszenie poziomu hiperplazji w przewodach trzustkowych w porównaniu ze zwierzętami traktowanymi samym kancerogenem. Ponadto opisywany związek przyczynił się do ograniczenia występowania gruczolaków [55]. Chung i wsp. podjęli badania nad znaczeniem czystych izotiocyjanianów w ochronie przed procesem nowotworowym indukowanym za pomocą azoksymetanu [16]. Uzyskane wyniki wskazują na efektywną redukcję zmian nowotworowych w wyniku suplementacji diety SFN podczas fazy inicjacji oraz promocji kancerogenezy. Zaobserwowano, że testowane substancje przyczyniły się do ograniczenia całkowitej liczby aberracji krypt jelitowych (ACF) u szczurów F344.

Kassie i wsp. w badaniach na zwierzętach eksponowanych na heterocykliczną aminę – 2-amino-3-metylimidazo[4,5-f]-chinolinę wykazali, że soki przygotowane z warzyw krzyżowych chronią przed ACF [50,51]. Autorzy zaobserwowali, że aktywność przeciwnowotworowa badanych produktów jest skorelowana z ich oddziaływaniem na enzym II fazy – transferazę-UDP-glukuronylową umiejscowioną w wątrobie.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWPALNA SFN

Oprócz wzmacniania systemów ochronnych komórek prawidłowych przed czynnikami kancerogennymi, SFN wykazuje również działanie przeciwzapalne. Ma to szczególne znaczenie w przypadku chorób nowotworowych ze względu na silne powiązania między stanami zapalnymi a procesem kancerogenezy.

W badaniach *in vitro* poświęconym określeniu przeciwzapalnej aktywności SFN wykorzystano model oparty na linii makrofagów RAW 264.7, u których stan zapalny indukowano za pomocą LPS. Zastosowanie SFN skutkowało wygaszeniem objawów stanu zapalnego poprzez obniżenie poziomu ekspresji iNOS i COX-2 oraz ograniczanie uwalniania cytokiny TNF- α [36]. Autorzy przypuszczają, że inhibicja wymienionych czynników prozapalnych

przez SFN jest związana z jego oddziaływaniem na czynnik transkrypcyjny NF- κ B. SFN prawdopodobnie wchodzi w interakcje z grupami tiolowymi NF- κ B zakłócając jego wiązanie z DNA i transaktywację odpowiednich genów. Późniejsze badania na tym samym modelu wykazały, że SFN w stężeniu 1 μ M również łagodził stan zapalny indukowany LPS przez regulację ekspresji iNOS i COX-2, stężenia cytokin TNF- α i IL-1 oraz wytwarzania NO [11]. Związek okazał się bardziej skuteczny, niż stosowane jednocześnie izotiocyjanian feniloetylu (PEITC) i kurkumina [11].

Oddziaływanie SFN jako inhibitora mediatorów prozapalnych, podobnie jak induktora enzymów II fazy, jest w dużej mierze związane z aktywacją *nrf2*. Lin i wsp. podjęli próbę wyjaśnienia roli genu *nrf* w hamowaniu reakcji zapalnej za pomocą SFN [60]. W badaniach przeprowadzonych na makrofagach pochodzących od myszy pozbawionych genu *nrf* (*nrf*^{-/-}) oraz myszy typu dzikiego (*nrf*^{+/+}) zaobserwowano silniejsze oddziaływanie SFN na komórki tych drugich. Związek w stężeniach 10 i 20 μ M widocznie ograniczał ekspresję mRNA TNF- α , IL-1 β , COX-2 oraz iNOS w komórkach mających gen *nrf*, nie wpływając na komórki pozbawione tego genu. Analizując stężenia białek COX-2 oraz iNOS i inne symptomy stanu zapalnego, m.in. wytwarzanie NO i PGE₂, czy uwalnianie prozapalnych cytokin, również zaobserwowano silniejsze oddziaływanie hamujące SFN w stosunku do makrofagów *nrf2*^{+/+} [60].

Killeen i wsp. zwrócili uwagę na zjawisko wydzielania przez ginące makrofagi białka HMGB1 (high-mobility group box 1), służącego podtrzymaniu procesu zapalnego [53]. Korzystne działanie SFN w tym obszarze zaobserwowano w komórkach linii RAW 264.7. Makrofagi poddawane inkubacji z SFN charakteryzowały się ograniczonym uwalnianiem HMGB1 i słabszym przemieszczaniem się tego białka z jądra do cytoplazmy [53].

Przeciwzapalne znaczenie SFN może wynikać również z jego zdolności do modulowania aktywności peroksydazy glutationowej. Praca przeglądowa Chu i wsp. wskazuje na relację między zwiększoną ekspresją peroksydazy glutationowej i zapobieganiem rozwojowi nowotworów [15]. Autorzy wnioskują, że prewencyjna rola tego enzymu polega raczej na ograniczaniu stanu zapalnego niż na bezpośredniej ingerencji w przebieg procesu nowotworowego. Z tego względu indukcja peroksydazy glutationowej w komórkach Caco-2 wywołana SFN może stanowić kolejny dowód na jego właściwości przeciwzapalne [4].

AKTYWNOŚĆ ANTYBAKTERYJNA SFN W STOSUNKU DO *HELICOBACTER PYLORI*

Prace badawcze wskazują, że SFN oprócz właściwości ochronnych przed czynnikami genotoksycznymi i wywołującymi reakcje zapalne, wykazuje aktywność przeciwbakteryjną. Rola SFN wiąże się m.in. z ograniczeniem chronicznych infekcji *Helicobacter pylori*, bakterii powodujących wrzody żołądka, które od dawna są podejrzewane o związek z rakiem żołądka. Wczesne zapobieganie ogniskom zapalnym w wyściółce żołądka może zmniejszać ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu. Fahey i wsp. wykazali bakteriobójcze właściwości izotiocyjanianu w stosunku do szczepów *H. pylori*, w tym szczepów

odpornych na antybiotyki [21]. Dużą aktywność przeciwbakteryjną SFN potwierdziły badania *in vivo*, w których podawanie myszom związku w dawce 7,5 μ mol przez 5 dni wiązało się z eliminacją 8 z 11 szczepów *H. pylori* wywołujących zakażenia [34]. Dokładny mechanizm oddziaływania SFN przedstawiony w opisywanych doświadczeniach pozostaje niewyjaśniony. Ponadto autorzy, przekonani o ograniczeniach zastosowanego modelu, sugerują potrzebę przeprowadzenia dalszych badań *in vivo* potwierdzających działania ochronne SFN wobec szczepów *H. pylori*, zakażających ludzki organizm [34].

AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA SFN W FAZIE PROMOCJI KANCEROGENEZY

Wiele badań wskazuje na ingerencję SFN w procesy związane z ekspansją komórek z defektem genetycznym i utrwalaniem mutacji. Dowiedziono, że związek może chronić przed rozwojem kancerogenezy na etapie promocji, wykazując aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek nowotworowych, polegającą na regulacji ich cyklu, na indukowaniu procesu apoptozy oraz różnicowania. Uzyskane wyniki zastosowania SFN jako modulatora wymienionych procesów komórkowych w warunkach *in vitro* różniły się w zależności od dawki oraz testowanej linii komórkowej. Wyniki badań zestawiono w tabeli 1.

REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO

Komórki nowotworowe cechują się wzmożonym wzrostem spowodowanym utratą lub zaburzonym funkcjonowaniem mechanizmów regulujących cykl komórkowy. W kontrolowaniu przebiegu cyklu komórek prawidłowych biorą udział kinazy zależne od cyklin (CDK), cykliny oraz inhibitory kinaz zależnych od cyklin. Tworzenie kompleksów cyklin i CDK sprzyja osiągnięciu przez komórkę kolejnych faz cyklu, natomiast działanie inhibitorów CDK wiąże się z jej zatrzymaniem w określonej fazie cyklu. Badania z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych dowodzą, że SFN pełni rolę regulatora cyklu komórkowego. Większość przeprowadzonych doświadczeń wskazuje, że dodanie SFN do hodowli komórek nowotworowych powoduje ich zatrzymanie w fazie G2/M cyklu [25,42,43]. Przejście przez punkt kontrolny G2/M wymaga aktywnego kompleksu cykliny B i CDK1. Fosforylacja CDK1 przez kinazy Wee1 i Myt1 prowadzi do inaktywacji kompleksu, podczas gdy działanie fosfatazy białkowej Cdc25 przywraca aktywność kompleksu i stymuluje przejście do fazy M cyklu komórkowego. Fosfatazy Cdc25 podlegają regulacji kinaz Chk1 i Chk2, które z kolei poprzez fosforylację różnych izoform Cdc25 inaktywują je, czego następstwem jest nieaktywny kompleks B i CDK i blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M [29]. Udowodniono, że SFN zakłóca zjawiska pozwalające na wejście komórek nowotworowych PC-3 w fazę M, istotnie ograniczając ich proliferację. Komórki tej linii potraktowane SFN w stężeniu 20 μ M charakteryzowały się obniżonym poziomem cykliny B1, Cdk25B i Cdk25C oraz wzmożoną fosforylacją Cdk25C przez Chk2 w porównaniu do komórek hodowanych bez dodatku tego związku [85]. Podobnych wyników dostarczyły badania na komórkach nowotworowych jelita grubego HCT116, które wykazały zakłócanie cyklu komórkowego w fazie G2/M zależne od Chk2 [85]. Blokowanie cyklu komórkowego w tej fazie dotyczyło

również nowotworowych komórek gruczołu krokowego linii LNCaP [37] i DU145 [13].

Zapobieganie przejściu komórek w fazę mitozy, choć dominuje, nie jest jedynym przejawem aktywności SFN. W kolejnych badaniach prowadzonych na nowotworowych komórkach tego gruczołu DU145 i LNCaP [12,92] oraz jelita grubego HT29 [83] wykazano zdolność SFN w stężeniu 10 μ M do blokowania cyklu komórkowego w fazie G1.

Wyniki badań wskazują, że jednym z mechanizmów wpływających na zakłócanie cyklu komórek nowotworowych przez SFN jest indukcja białka p21. Zwiększanie ekspresji białka p21 obserwowano w komórkach nowotworowych jelita grubego HT29 i Caco-2 [76] oraz stercza PC-3 i LNCaP [67].

Prace naukowe potwierdzają, że efekt apoptotyczny, bądź antyproliferacyjny uzyskany w wyniku zastosowania SFN zależy głównie od użycie dawki związku oraz czasu ekspozycji na jego działanie. Jakubikova i wsp. zaobserwowali różnice w odpowiedzi komórek Caco-2 na działanie SFN wprowadzonego do hodowli w różnych ilościach [43]. W następstwie inkubacji komórek tej linii z SFN w stężeniu 20 μ M zachodziło blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, natomiast ekspozycja na SFN w stężeniach powyżej 20 μ M powodowała wyraźną akumulację komórek w fazie sub-G1. Ponadto wyniki badań wskazują na duże znaczenie czasu ekspozycji na efekt antyproliferacyjny [43]. Krótkotrwała ekspozycja komórek nowotworowych jelita grubego na SFN skutkowałą odwracalnym blokowaniem cyklu w fazie G2/M, natomiast osiągnięcie trwałego zatrzymania cyklu, a w konsekwencji apoptozy wymagało ponad 12-godzinnej inkubacji [70].

INDUKCJA APOPTOZY

W niektórych przypadkach rozwój nowotworu wynika z małej podatności komórek zainicjowanych (np. poprzez zadziałanie kancerogenu) na sygnały uruchamiające proces apoptozy. Na podstawie licznych badań *in vitro* wykazano, że SFN bierze udział w aktywowaniu sygnałów prowadzących do apoptozy w komórkach nowotworowych wielu typów. Aktywność proapoptotyczna SFN była skierowana na komórki nowotworowe jelita grubego, stercza, piersi, wątroby, trzustki, a nawet mózgu i komórek białaczkowych (tabela 1). Większość uzyskanych rezultatów wskazuje na rolę SFN w inicjowaniu śmierci komórkowej przebiegającej szlakiem bezpośrednio związanym z udziałem mitochondriów. W jednym z przykładowych eksperymentów związek stymulował formowanie ciałek apoptotycznych i akumulację komórek linii HepG2 i HeLa w fazie sub-G1 [72]. Jednocześnie SFN powodował obniżenie stężenia białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL, zwiększenie ekspresji białka proapoptotycznego Bax, aktywację kaspazy 3 oraz degradację polimerazy poli(ADP-rybozy), a więc oddziaływał na czynniki apoptozy zależne od mitochondriów. Choi i wsp. zaobserwowali zarówno aktywację Bax, jak i obniżenie aktywności inhibitorów apoptozy IAP (cIAP1, cIAP2 i XIAP) oraz indukcję białka Apaf-1 w komórkach nowotworowych stercza hodowanych w obecności SFN [14].

Próby wyjaśnienia szlaków procesu apoptozy indukowanej przez SFN okazały się jednak bardziej skomplikowane. Ten

Tabela 1. Przykładowe działania SFN na komórki nowotworowe *in vitro*

Typ komórek nowotworowych	Dawka SFN [μM]	Mechanizm działania	Piśmiennictwo
Komórki białaczki Jurkat T	10-30	↑ komórek w fazie G2/M (10-30 μM), indukcja apoptozy (30 μM): ↑ p53 i Bax, ↓ zawartości DNA, zmiana przepuszczalności błony komórkowej	[25]
HL-60	1,5–12,5	różnicowanie komórek białaczkowych do komórek makrofagowych i komórek linii granulocytarnych, indukcja apoptozy	[23]
Komórki raka jelita grubego HT29	15	↑ Bax, ↑ cyklina A i B1, ↑ inhibitora kinaz p21; wzrost aktywności kinazy cdc2; uwalnianie cytochromu c z mitochondriów; wstrzymanie cyklu w fazie G2/M	[27,28,73]
	25	zatrzymywanie cyklu w fazie G1, indukcja ekspresji p21 ^{Cip1} , ↓ cyklina D1, A i c-myc, aktywacja ścieżki MAPK apoptozy, indukcja stresu oksydacyjnego	[83]
Caco-2	25, 50, 100	blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M (25, 50 μM), sub-G1 (100 μM), ↑ fosforylacji ERK1/2 i Akt, ↑ poziomu mRNA MRP2, ↓ MMP	[43]
HCT 116 379.2 (p53 ^{-/-}) 40–16 (p53 ^{+/+})	15	indukcja apoptozy, rozpad PARP, aktywacja kaspaz 7 i 9, ↑ Bax: Bcl (w komórkach 40-16)	[71]
SW 620	20	↓ MMP, wydzielenie cytochromu c, aktywacja kaspaz 9, 3 i 7; aktywacja kinazy ATM i Chk2, aktywacja JNK	[77]
Komórki raka piersi mysie F3II	15	blokowanie cyklu w fazie M, kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA, ↑ aktywności kinazy, Cdc2 ↓ Bcl-2 i PARP, ↑ aktywności kaspazy 3	[41]
MCF-7	15	blokowanie cyklu komórkowego w fazie G1 (12 h) lub G2/M (>24 h), ↑ cyklina B1, indukcja fosforylacji histonu H1	[40]
Komórki raka wątroby HepG2	2–30	↑ transkrypcji genów <i>MT-I</i> i <i>MT-II</i> i poziomu metalotionein (2–20 μM), ↑ Nrf2 (20 μM), fragmentacja DNA (30 μM), aktywacja ERK, p38 i JNK (20 μM), indukcja apoptozy: aktywacja kaspazy 3 i rozkład PARP (100 μM), indukcja apoptozy zależna od ROS, ↑ Bax, ↓ Bcl-2 i Bcl-XL (100 μM)	[100]
Hep3B	10	uwrażliwianie komórek na apoptozę indukowaną przez TRAIL, ↑ poziomu mRNA i białka DR5, ↑ ROS	[54]
Huh-7 SNU-398 SNU-423	10	↑ ekspresji DR5	[54]
Komórki raka trzustki MIA PaCa-2	>10	inhibicja proliferacji (5 μM), naruszenie integralności błony komórkowej, aktywacja kaspazy 3 i 8, ↓ MMP, ↓ poziomu wewnątrzkomórkowych antyoksydantów	[75]
Komórki raka stercza PC-3	40	generacja ROS, ↓ MMP, fragmentacja DNA, kondensacja chromatyny, rozkład PARP, wydzielanie cytochromu c, Bcl-2 ↓, ↑ Fas, rozpad Bid, ↑ ekspresji BimEL i Bok, aktywacja kaspazy 8	[86]
	20–40	zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, ↓ cyklina B1, Cdc 25B i 25C, ↑ fosforylacji Cdc25C, aktywacja Chk2	[85]
	20–30	↓ Bcl-2, aktywacja AP-1, fosforylacja ERK1/2, JNK1/2, Elk-1, c-Jun	[97]
	15	inhibicja HDAC, acetylacja histonów H3 i H4, ↑ ekspresji białek p21 ^{Cip1/Waf1} i Bax, ↓ Bcl-2, aktywacja kaspaz	[67]
DU145	40	fragmentacja DNA, wydzielanie cytochromu c, rozkład PARP, rozkład pre-kaspazy 8, zwiększenie stresu oksydacyjnego	[86]
	10	blokowanie cyklu w fazie G2/M, indukcja apoptozy, rozkład PARP, generacja ROS, aktywacja JNK, aktywacja kaspaz	[13]
LNCaP	20-40	stabilizacja p53, ↑ Apaf-1, aktywacja Bax, ↓ białek z rodziny IAP, fragmentacja DNA, PARP, ↓ Bcl-2, ↓ Bak	[14]

Tabela 1 c.d. Przykładowe działania SFN na komórki nowotworowe *in vitro*

Typ komórek nowotworowych	Dawka SFN [μ M]	Mechanizm działania	Piśmiennictwo
Komórki nowotworów mózgu komórki glejaka T98G U87MG	20 i 40	indukcja apoptozy: kondensacja chromatyny, \uparrow wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , fragmentacja DNA, wydzielanie cytochromu c, aktywacja kaspazy 3 (40 μ M), indukcja rozkładu kaspaz 9 i 12 (40 μ M), wydzielanie AIF do cytosolu (40 μ M), \uparrow wydzielania Smac/Diablo (40 μ M), \downarrow IAP w cytoplazmie (40 μ M), \uparrow Bax/Bcl-2, aktywacja kalpajny (40 μ M), \downarrow NF κ B (40 μ M), \uparrow I κ B α (40 μ M)	[48]
U251	25	inhibicja formowania kolonii i migracji komórek, działanie antyproliferacyjne, \downarrow PCNA i cykliny D1, \uparrow translokacji Bax, \uparrow wydzielania cytochromu c, aktywacja kaspazy 3, \downarrow ekspresji fosfo-Akt	[44]
komórki rdzeniaka DAOY	10	fragmentacja DNA, kondensacja chromatyny, aktywacja kaspaz 3 i 9, rozkład PARP i wimentyny	[31]

sam zespół badawczy sugeruje, że wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) przez SFN stanowiło podstawowy mechanizm indukcji śmierci komórek nowotworowych [84]. Stymulacja procesu odbywała się poprzez uruchamianie szlaku wewnętrznego, zapoczątkowanego zmianami strukturalnymi w mitochondriach. Potwierdzeniem są m.in. wyniki badań *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej PC-3 [86]. We wspomnianych doświadczeniach wprowadzenie SFN do hodowli komórek nowotworowych PC-3 powodowało formowanie ROS, które inicjowały zmianę potencjału błony mitochondrialnej, a następnie uwolnienie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej do cytoplazmy. Jednak autorzy dowiedli, że SFN bierze udział również w uruchamianiu innych dróg prowadzących do apoptozy. W komórkach eksponowanych na działanie SFN zaobserwowano także zmiany stężenia białek Fas, uczestniczących w regulacji szlaku związanego z błonowymi receptorami śmierci. W innych badaniach na tym samym modelu SFN również wpływał na zewnętrzną ścieżkę apoptotyczną, zapoczątkowaną aktywacją kinaz białkowych MAPK [97]. Uruchamianie tego szlaku prowadziło ostatecznie do aktywacji AP-1, ważnego transaktywatora genów proapoptotycznych.

Istotnych informacji dostarczyły badania na komórkach ostrej białaczki T-komórkowej Jurkat, wskazujące na różnice w podatności na sygnały apoptotyczne indukowane przez SFN w zależności od fazy cyklu komórkowego. Wykazano, że komórki charakteryzowały się największą wrażliwością na indukcję procesu w fazie G1, mniejszą w fazie G2/M, a najmniejszą w fazie S [24].

INHIBICJA DEACETYLAZY HISTONOWEJ

Innym celem aktywności antynowotworowej SFN jest deacetylaza histonowa (HDAC). Zwiększona aktywność i ekspresja HDAC jest kojarzona z wieloma nowotworami; skutkuje tłumieniem transkrypcji i wpływa na rozregulowanie mechanizmów kontrolujących różnicowanie, cykl komórkowy i apoptozę. Co więcej HDAC poprzez deacetylację genów supresorowych nowotworu, między innymi genu *p21*, prowadzi do wyciszenia ich transkrypcji lub całkowitego wyłączenia. Badania wskazują, że nadaktywność HDAC i hipocetylacja mogą się przyczyniać do progresji nowotworów stercza i jelita grubego. Dowodów dostarcza

praca Selingsona i wsp., w której wykazano korelację między zmniejszeniem acetylacji histonów a zwiększeniem częstości zachorowań i ryzyka nawrotów raka stercza [78]. Natomiast inni autorzy zaobserwowali, że wyłącznie HDAC2 stymuluje śmierć komórek nowotworowych jelita grubego linii HT29 [104]. Badania *in vitro* wskazują na obniżenie aktywności HDAC w nowotworowych komórkach jelita grubego HCT 116 traktowanych SFN w stężeniach 3–15 μ M [68]. Późniejsze prace potwierdzają opisywaną aktywność w stosunku do komórek nowotworowych linii PC-3, LNCaP i BPH-1 pochodzących z raka stercza [67]. Inhibicji HDAC w tych komórkach indukowanej SFN towarzyszył ogólny wzrost acetylacji histonu jądrowego H3 i H4 sprzężony z miejscową hiperacetylacją w obrębie promotora *p21*.

Podobne osiągnięcia przyniosły doświadczenia na myszach *Apc^{min}*. U zwierząt, którym podano jednorazowo 10 μ moles SFN lub 10 μ moles jego metabolitu NAC-SFN nastąpiła inhibicja aktywności HDAC w błonie śluzowej jelita grubego po 6 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu [66]. Zastosowanie dłuższej suplementacji SFN (~6 μ moles/dzień przez 70 dni) zaowocowało zmniejszeniem tworzenia spontanicznych polipów jelitowych u myszy *Apc^{min}*. Po zbadaniu chromatyny komórek jelita grubego i cienkiego okazało się, że w wyniku spożywania SFN zachodziła jednocześnie acetylacja histonów związanych z regionem promotorowym genów *p21* i *bax*.

Pilotowe badania kliniczne przeprowadzone przez zespół Myzak potwierdziły zależność między jednorazowym spożyciem kiełków brokułowych (68 g), stanowiących bogate źródło SFN, a poziomem aktywności HDAC w komórkach krwi obwodowej [69]. Wyniki opisywanych badań dostarczyły pierwszych dowodów, że korzystne działanie widoczne jest po 3–6 godzinach od zjedzenia kiełków brokułowych (inhibicja HDAC), a efekt hiperacetylacji utrzymuje się przez 48 godzin. Co ważniejsze, osiągnięty poziom inhibicji HDAC i hiperacetylacji histonów w komórkach krwi obwodowej był zbliżony lub większy niż uzyskiwany po zastosowaniu preparatów terapeutycznych, takich jak Vorinostat. Obecnie SFN jako silny inhibitor HDAC może być uważany za obiecujący czynnik wspomagający chemioterapię poprzez epigenetyczne mechanizmy. Jednak wyjaśnienie dokładnego mechanizmu inhibicji HDAC w różnych rodzajach komórek

oraz określenie skutków modulacji tego enzymu w komórkach prawidłowych wymaga dalszych badań.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA W FAZIE PROGRESJI KANCEROGENEZY

INHIBICJA ANGIOGENEZY I PRZERZUTOWANIA

Angiogeneza, czyli proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych z już istniejących, jest niezbędna w patogenezie wielu chorób, w tym nowotworowych. Guzek nowotworowy do wzrostu i rozwoju wymaga nienaruszonego systemu naczyń krwionośnych, zaopatrujących go w tlen i składniki odżywcze. Aktywność SFN polegająca na hamowaniu naczyniotworzenia zaobserwowano w nielicznych do tej pory doświadczeniach *in vitro*.

W badaniach na komórkach śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC wykorzystywanych jako model opisywanego procesu wykazano, że SFN uczestniczy w regulacji różnych etapów naczyniotworzenia. Aktywność substancji w tym zakresie polegała na ograniczaniu formowania naczyń oraz szybkości namnażania komórek śródbłonna [2]. Zmniejszanie aktywności proliferacyjnej komórek linii HUVEC pod wpływem SFN następowało w sposób zależny od dawki przez indukcję apoptozy.

Zapobieganie migracji i formowaniu naczyń na macierzy błony podstawnej na skutek działania SFN zaobserwowano również w doświadczeniach na ludzkich mikronaczyniowych komórkach śródbłonkowych HMEC-1 [7]. W komórkach tej linii SFN obniżał ekspresję receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego Flk-1/KDR.

Uzyskane wyniki wskazują, że SFN zakłóca podstawowe etapy procesu unaczyniania, od sygnałów proangiogennych do migracji i formowania naczyń krwionośnych przez komórki śródbłonkowe.

Zdolność komórek nowotworowych do rozsiewu z pierwotnego ogniska do węzłów chłonnych oraz do najbliższych i odległych tkanek i narządów jest nieodłączną cechą nowotworów złośliwych. Inwazyjność nowotworu i przerzutowanie stanowią główną przyczynę niepowodzeń w leczeniu tych schorzeń. Proces powstawania przerzutów jest kaskadą wielu zjawisk. Rozsiew komórek rakowych zapoczątkowuje wnikięcie komórek uwolnionych z pierwotnego nowotworu do naczyń chłonnych lub krwionośnych. Krążące komórki drogą naczyń mogą dotrzeć do otaczających tkanek, gdzie osiedlają się i proliferują, tworząc ogniska przerzutowe. Wędrowka w krwiobiegu lub w układzie limfatycznym i „ekstrawazacja” komórek nowotworowych przez ściany naczyń wymaga aktywacji enzymów proteolitycznych, zdolnych do degradacji macierzy pozakomórkowej, otaczającej warstwę śródbłonna naczyń, czy też budującą błonę podstawną tkanki nabłonkowej różnych narządów. Na tym etapie niezbędna jest indukcja enzymów proteolitycznych, takich jak proteinazy systemu plazminy, proteinazy serynowe oraz metaloproteinazy macierzowe [94].

Dowodzono, że aktywność SFN na tym etapie kancerogenezy polega głównie na supresji wymienionych enzymów. W badaniach Rose i wsp. analizowano wpływ ekstraktu z brokułów na aktywność metaloproteinazy 9,

głównego enzymu w procesie przerzutowania. Warto dodać, że w tkankach nowotworowych stwierdzono relatywnie dużą ekspresję i aktywność tego enzymu [96]. W cytowanej pracy wykazano, że SFN, występujący w ekstrakcie z brokułów w stosunkowo dużych ilościach, hamował aktywność metaloproteinazy 9. Ponadto badany ekstrakt zmniejszał zdolność komórek raka piersi MDA-MB-231 do przerzutowania. Kolejne badania *in vitro* nad wpływem SFN na metaloproteinazy w komórkach śródbłonna dostarczają niejednoznacznych rezultatów. Podczas gdy wykazano supresję transkrypcji metaloproteinazy 2 macierzy w komórkach HMEC-1 [7], w komórkach HUVEC SFN nie wpływał na zmiany w wytwarzaniu enzymów tej klasy [2].

Thejass i Kuttan wykazali, że SFN hamuje rozwój nowotworu *in vivo* i zapobiega powstawaniu przerzutów czerniaka B16F-10, którego komórki tworzą kolonie guzków nowotworowych w płucach [90]. W doświadczeniach przeprowadzonych na myszach C57BL/6 zaobserwowano przede wszystkim znaczny spadek masy tkanki nowotworowej i redukcję formowania guzków. Stwierdzono również zmniejszenie zawartości hydroksyproliny w kolagenie, co w istotny sposób ogranicza proces włóknienia płuc. Zmiany w komórkach B16F-10 *in vitro*, indukowane za pomocą SFN, polegały na zmniejszeniu inwazyjności komórek nowotworowych wobec macierzy kolagenowej, w porównaniu z komórkami nietraktowanymi izotiocyjanianem. Jednocześnie zaobserwowano dużą cytotoksyczność SFN względem komórek nowotworowych oraz wyraźny potencjał antyproliferacyjny związku [90].

FARMAKOKINETYKA SFN A POTENCJAŁ PRZECIWNOWOTWOROWY

Badania Petriego i wsp. nad wchłanianiem i metabolizmem SFN wskazują na efektywną absorpcję SFN w jelicie czczym *in vivo* ($P_{\text{eff}} = 18,7 \pm 12,6 \times 10^{-4}$ cm/s) [74]. Ze względu na hydrofobowość oraz niską masę molową SFN prawdopodobnie jego transport przez nabłonek jelitowy zachodzi w wyniku dyfuzji biernej [95]. Autorzy wykazali, że SFN po absorpcji przez enterocyty ulega sprzężeniu z glutationem i w postaci skoniugowanej jest w znacznej części wydzielany z powrotem do światła jelit. Wcześniejsze badania *in vitro* sugerują udział P-glikoproteiny w wydzielaniu koniugatu 'SFN-GSH' poza komórki [19,102].

Badania farmakokinetyki SFN na modelach zwierzęcych i ludzi wskazują, że stężenie tego związku we krwi osiąga wartości rzędu kilku μM . Z badań nad dystrybucją izotiocyjanianów w ludzkim organizmie wynika, że po godzinie od spożycia kiełków brokułowych zawierających 200 μmoli izotiocyjanianów, stężenie w osoczu może wynosić 0,943–2,27 μM . [99]. Hu i wsp. w późniejszych badaniach z wykorzystaniem szczurów, godzinę po podaniu 50 μmoli SFN uzyskali we krwi zwierząt stężenie $\sim 20 \mu\text{M}$, a okres półtrwania związku oszacowano na 2,2 godziny [38]. Po zastosowaniu u myszy 3-tygodniowej diety zawierającej 5 i 10 μmoli SFN/dzień, związek utrzymywał się we krwi i jelicie na poziomie 0,124–0,254 μmoli i 3–13 nmoli/g tkanki. Poza tym u myszy Apc^{min} izotiocyjanian w wymienionych dawkach zapobiegał powstawaniu gruczolaków [39]. Badania na szczurach wykazały gromadzenie się metabolitów SFN w gruczolach sutkowych zwierząt po spożyciu 150 μmoli tego związku. Osiągnięty poziom pochodnych SFN wystarczał do efektywnej modulacji ekspresji genów kodujących enzymy II fazy. W grupie zwierząt, u których

zastosowano jednorazową suplementację zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów *NQO1* i *HO-1* [18]. Pilotowe badania Corblatta i wsp. pozwoliły na oszacowanie biodostępności SFN i dystrybucji w tkance piersiowej kobiet [18]. U ośmiu pacjentek po spożyciu jednej porcji kielbów brokułowych zawierającej 200 μ mol pochodnej glukorafaniny uzyskano stężenia metabolitów SFN w tkance piersiowej na poziomie 1,45 \pm 1,12 (lewa pierś) i 2,0 \pm 1,95 (prawa pierś) nmoli/g tkanki. W badanych tkankach również zaobserwowano aktywność ochronną dostarczonych składników polegającą na regulowaniu genów *NQO1* i *HO-1* [18]. Uzyskane wyniki stanowią dobrą podstawę do dalszych badań nad możliwościami zastosowania kielbów brokułowych w chemioprewencji nowotworu piersi.

WPLYW PODŁOŻA GENETYCZNEGO NA SKUTECZNOŚĆ OCHRONNEGO DZIAŁANIA IZOTIOCYJANANÓW

Do tej pory w badaniach klinicznych testowano wpływ diety bogatej w izotiocyaniany lub warzywa krzyżowe, a nie suplementacji SFN lub jego prekurorem glukorafaniną, na ryzyko występowania chorób nowotworowych. Wyniki badań populacyjnych wskazują, że zdolność izotiocyanianów do zapobiegania chorobom nowotworowym prawdopodobnie zależy od uwarunkowań genetycznych poszczególnych osobników. Biorąc pod uwagę to odkrycie próba zastosowania SFN jako efektywnego środka chemioprewencyjnego może nie przynieść oczekiwanych rezultatów dla wszystkich. Decydującą rolę w korzystnym oddziaływaniu izotiocyanianów odgrywa prawdopodobnie polimorfizm genów izoenzymów S-transferazy glutationu GSTM1 i GSTT1. GST jest zaangażowana w detoksyfikację wielu karcynogenów chemicznych i odpowiada za metabolizm spożywanych izotiocyanianów. Badania kohortowe wskazują na ochronne działanie diety bogatej w warzywa krzyżowe przeciwko nowotworom płuc, jelita grubego i piersi jedynie u pacjentów pozbawionych GSTM1 i GSTT1 [57,80]. Ze względu na to, że GST uczestniczy w przemianach metabolicznych SFN i przez to wpływa na jego wydalanie, mniejsza aktywność enzymu u osób z polimorfizmem genu GST może skutkować wolniejszą eliminacją i dłuższą ekspozycją komórek nowotworowych na ten

związek dostarczony wraz z dietą. Seow i wsp. zaobserwowali większe wydalanie izotiocyanianów poza organizm, a tym samym krótszy czas oddziaływania na tkanki u osób z genem GSTT1 w porównaniu z badanymi pozbawionymi tego genu [79]. Późniejsze wyniki badań potwierdziły korelację między dużym spożyciem warzyw krzyżowych a obniżeniem ryzyka zachorowania na raka jelita grubego u osób pozbawionych GSTM1 i GSTT1 [81].

Z kolei Gasper i wsp. zaobserwowali odwrotne zależności: większe stężenie metabolitów SFN w moczu i szybszą eliminację z organizmu zanotowano u osób nieposiadających genu *GSTT1* [30]. W innych badaniach wykazano wpływ diety wzbogaconej w warzywa krzyżowe na obniżenie zapadalności na raka stercza jedynie w grupie mężczyzn posiadających izoenzym GSTM1, bez potencjału ochronnego w stosunku do pacjentów pozbawionych GSTM1 [47].

Mimo niejednoznacznych wyników, wymagających podjęcia dalszych badań, wpływ polimorfizmu genów GST na biodostępność SFN wydaje się mieć istotne znaczenie w kształtowaniu indywidualnej odpowiedzi organizmu na przeciwnowotworowe działanie tego związku.

PODSUMOWANIE

Rezultaty dotychczasowych badań wskazują na złożone mechanizmy przeciwnowotworowego działania SFN, oferujące ochronę na różnych etapach procesu kancerogenezy. Jednak szczególnego znaczenia nabiera możliwość wykorzystania tego związku w tzw. chemioprewencji pierwotnej, ze względu na dobrze udowodnione zdolności do indukowania enzymów detoksykacyjnych i zapobiegania uszkodzeniom DNA indukowanym chemicznie. Pozytywne wyniki badań *in vitro* oraz badań na zwierzętach potwierdzające te właściwości SFN uzyskano przy stosunkowo niewielkich dawkach tego związku, osiągalnych w ludzkim organizmie. Dane wskazują, że zastosowanie SFN u osób zdrowych oraz z grupy podwyższonego ryzyka może się stać racjonalną strategią postępowania profilaktycznego, aczkolwiek wpływ podłoża genetycznego na jego biodostępność wymaga dalszych badań.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ambrosone C.B., McCann S.E., Freudenheim J.L., Marshall J.R., Zhang Y., Shields P.G.: Breast cancer risk in premenopausal women in inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is modified by GST genotype. *J. Nutr.*, 2004; 134: 1134–1138
- [2] Asakage M., Tsuno N.T., Kitayama J., Tsuchiya T., Yoneyama S., Yamada J., Okaji Y., Kaisaki S., Osada T., Takahashi K., Nagawa H.: Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. *Angiogenesis*, 2006; 9: 83–91
- [3] Bacon J.R., Williamson G., Garner R.C., Lappin G., Langouet S., Bao Y.: Sulforaphane and quercetin modulate PhIP–DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 1903–1911
- [4] Banning A., Brigelius-Flohe R.: NF-kappaB, Nrf2, and HO-1 interplay in redox-regulated VCAM-1 expression. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2005; 7: 889–899
- [5] Barcelo S., Gardiner J.M., Gescher A., Chipman J.K.: CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 277–282
- [6] Basten G.P., Bao Y., Williamson G.: Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1399–1404
- [7] Bertl E., Bartsch H., Gerhauser C.: Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 575–585
- [8] Bheemreddy R.M., Jeffery E.H.: The metabolic fate of purified glucoraphanin in F344 rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55: 2861–2866
- [9] Bonnesen C., Eggleston I.M., Hayes J.D.: Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.*, 2001; 61: 6120–6130
- [10] Brooks J.D., Paton V.G., Vidanes G.: Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001; 10: 949–954
- [11] Cheung K.L., Khor T.O., Kong A.N.: Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation. *Pharmaceut. Res.*, 2009; 26: 224–231

- [12] Chiao J.W., Chung F.L., Kancherla R., Ahmed T., Mittelman A., Conaway C.C.: Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 2002; 20: 631–636
- [13] Cho S.D., Li G., Hu H., Jiang C., Kang K.S., Lee Y.S., Kim S.H., Lu J.: Involvement of c-jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU 145 prostate cancer cells. *Nutr. Cancer*, 2005; 52: 213–224
- [14] Choi S., Lew K.L., Xiao H., Herman-Antosiewicz A., Xiao D., Brown C.K., Singh S.V.: D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 151–162
- [15] Chu F.F., Esworthy R.S., Doroshow J.H.: Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1481–1495
- [16] Chung F.L., Conaway C.C., Rao C.V., Reddy B.S.: Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fisher rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 2287–2291
- [17] Conaway C.C., Getahun S.M., Liebes L.L., Pusateri D.J., Topham D.K., Botero-Omary M., Chung F.L.: Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr. Cancer*, 2000; 38: 168–178
- [18] Cornblatt B.S., Ye L., Dinkova-Kostova A.T., Erb M., Fahey J.W., Singh N.K., Chen M.S., Stierer T., Garrett-Mayer E., Argani P., Davidson N.E., Talalay P., Kensler T.W., Visvanathan K.: Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 1485–1490
- [19] Dietrich C.G., Ottenhoff R., de Waart D.R., Oude Elferink R.P.: Role of MRP2 and GSH in intrahepatic cycling of toxins. *Toxicology*, 2001; 167: 73–81
- [20] Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Cole R.N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y.: Direct evidence that sulphydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 11908–11913
- [21] Fahey J.W., Haristoy X., Dolan P.M., Kensler T.W., Scholtus I., Stephenson K.K., Talalay P., Lozniewski A.: Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 7610–7615
- [22] Fimognari C., Berti F., Cantelli-Forti G., Hrelia P.: Effect of sulforaphane on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2005; 46: 260–267
- [23] Fimognari C., Lenzi M., Cantelli-Forti G., Hrelia P.: Induction of differentiation in human promyelocytic cells by the isothiocyanate sulforaphane. *In Vivo*, 2008; 22: 317–320
- [24] Fimognari C., Lenzi M., Sciuscio D., Cantelli-Forti G., Hrelia P.: Cell-cycle specificity of sulforaphane-mediated apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *In Vivo*, 2007; 21: 377–380
- [25] Fimognari C., Nusse M., Cesari R., Iori R., Cantelli-Forti G., Hrelia P.: Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 581–586
- [26] Fowke J.H., Chung F.L., Jin E., Qi D., Cai Q., Conaway C., Cheng J.R., Shu X.O., Gao Y.T., Zheng W.: Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Res.*, 2003; 63: 3980–3986
- [27] Gamet-Payrastré L., Li P., Lumeau S., Cassar G., Dupont M.A., Chevolleau S., Gasc N., Tulliez J., Terce F.: Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1426–1433
- [28] Gamet-Payrastré L., Lumeau S., Gasc N., Cassar G., Rollin P., Tulliez J.: Selective cytostatic and cytotoxic effects of glucosinolates hydrolysis products on human colon cancer cells *in vitro*. *Anticancer Drugs*, 1998; 9: 141–148
- [29] Garrett M.D.: Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 2001; 5: 515–522
- [30] Gasper A.V., Al-Janobi A., Smith J.A., Bacon J.R., Fortun P., Atherton C., Taylor M.A., Hawkey C.J., Barrett D.A., Mithen R.F.: Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005; 82: 1283–1291
- [31] Gingras D., Gendron M., Boivin D., Moghrabi A., Theoret Y., Beliveau R.: Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables. *Cancer Lett.*, 2004; 203: 35–43
- [32] Giovannucci E., Rimm E.B., Liu Y., Stampfer M.J., Willet W.C.: A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 1403–1409
- [33] Hakama M.: Chemoprevention of cancer. *Acta Oncol.*, 1998; 37: 227–230
- [34] Haristoy X., Angioi-Duprez K., Duprez A., Lozniewski A.: Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 3982–3984
- [35] Hecht S.S.: Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *J. Nutr.*, 1999; 129: 768S–774S
- [36] Heiss E., Herhaus C., Klimo K., Bartsch H., Gerhauser C.: Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 32008–32015
- [37] Herman-Antosiewicz A., Xiao H., Lew K.L., Singh S.V.: Induction of p21 protein protects against sulforaphane induced mitotic arrest in LnCaP human prostate cancer cell line. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 1673–1681
- [38] Hu R., Hebbar V., Kim B.R., Chen C., Winnik B., Buckley B., Soteropoulos P., Tolia P., Hart R.P., Kong A.N.: *In vivo* pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004; 310: 263–271
- [39] Hu R., Khor T.O., Shen G., Jeong W.S., Hebbar V., Chen C., Xu C., Reddy B., Chada K., Kong A.N.: Cancer chemoprevention of intestinal polyposis in Apc min/+ mice by sulforaphane, a natural product derived from cruciferous vegetable. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 2038–2046
- [40] Jackson S.J., Singletary K.W.: Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J. Nutr.*, 2004; 134: 2229–2236
- [41] Jackson S.J., Singletary K.W.: Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis*, 2004; 25: 219–227
- [42] Jakubikova J., Bao Y., Sedlak J.: Isothiocyanates induce cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial potential depolarization in HL-60 and multidrug-resistant cell lines. *Anticancer Res.*, 2005; 25: 3375–3386
- [43] Jakubikova J., Sedlak J., Mithen R., Bao Y.: Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane and erucin induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 69: 1543–1552
- [44] Jiang H., Shang X., Wu H., Huang G., Wang Y., Al-Holou S., Gautam S.C., Chopp M.: Combination treatment with resveratrol and sulforaphane induces apoptosis in human U251 glioma cells. *Neurochem. Res.*, 2010; 35: 152–161
- [45] Jiang Z.Q., Chen C., Yang B., Hebbar V., Kong A.N.: Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Sci.*, 2003; 72: 2243–2253
- [46] Jones S.B., Brooks J.D.: Modest induction of phase 2 enzyme activity in the F344 rat prostate. *BMC Cancer*, 2006; 6: 62–70
- [47] Joseph M.A., Moysich K.B., Freudenheim J.L., Shields P.G., Bowman E.D., Zhang Y., Marshall J.R., Ambrosone C.B.: Cruciferous genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutr. Cancer*, 2004; 50: 206–213
- [48] Karmakar S., Weinberg M.S., Banik N.L., Patel S.J., Ray S.K.: Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. *Neuroscience*, 2006; 141: 1265–1280
- [49] Kassahun M., Davis M., Hu P., Martin B., Baillie T.: Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997; 10: 1228–1233
- [50] Kassie F., Rabot S., Uhl M., Huber W., Qin H.M., Helma C., Schulte-Hermann R., Knasmüller S.: Chemoprotective of garden cress (*Lepidium sativum*) and its constituents towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxic effects and colonic preneoplastic lesions. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1155–1161
- [51] Kassie F., Uhl M., Rabot S., Grasl-Kraupp B., Verkerk R., Kundi M., Chabicovsky M., Schulte-Hermann R., Knasmüller S.: Chemoprevention of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced colonic and hepatic preneoplastic lesions in F344 rat by cruciferous vegetables administered simultaneously with the carcinogen. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 255–261
- [52] Keck A.S., Qiao Q., Jeffery E.H.: Food matrix effects on bioactivity of broccoli-derived sulforaphane in liver and colon of F344 rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51: 3320–3327

- [53] Killeen M.E., Englert J.A., Stolz D.B., Song M., Han Y., Delude R.L., Kellum J.A., Fink M.P.: The phase 2 enzyme inducers ethacrynic acid, DL-sulforaphane, and oltipraz inhibit lipopolysaccharide-induced high-mobility group box 1 secretion by RAW 264.7 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006; 316: 1070–1079
- [54] Kim E., Kim E.H., Eom Y.W., Kim W.H., Kwon K.W., Lee S.J., Choi K.S.: Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-resistant hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of DR5. *Cancer Res.*, 2006; 66: 1740–1750
- [55] Kuroiwa Y., Nishikawa A., Kitamura Y., Kanki K., Ishii Y., Umehura T., Hirose M.: Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.*, 2006; 241: 275–280
- [56] Kushad M.M., Brown A.F., Kurilich A.C., Juvik J.A., Wallig M.A., Jeffery E.H.: Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 47: 1541–1548
- [57] Lampe J.W., Peterson S.: Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *J. Nutr.*, 2002; 132: 2991–2994
- [58] Liang H., Yuan Q.P., Dong H.R., Liu Y.M.: Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *J. Food Comp. Anal.*, 2006; 19: 473–476
- [59] Lin H.J., Probst-Hensch N.M., Louie A.D., Kau I.H., Witte J.S., Ingles S.A., Frankl H.D., Lee E.R., Haile R.: Glutathione transferase null genotype, broccoli, and liver prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7: 647–652
- [60] Lin W., Wu R.T., Wu T., Khor T.O., Wang H., Kong A.N.: Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 2008; 76: 967–973
- [61] London S.J., Yuan J.M., Chung F.L., Gao Y.T., Coetzee G.A., Ross R.K., Yu M.C.: Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet*, 2000; 356: 724–729
- [62] Maheo K., Morel F., Langouet S., Kramer H., Le Ferrec E., Ketterer B., Guillouzo A.: Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Res.*, 1997; 57: 3649–3652
- [63] McWalter G.K., Higgins L.G., McLellan L.I., Henderson C.J., Song L., Thornalley P.J., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D.: Transcription factor nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J. Nutr.*, 2004; 134: 3499–3506
- [64] Mithen R., Faulkner K., Magrath R., Rose P., Williamson G., Marquez J.: Development of isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theor. Appl. Genet.*, 2003; 106: 727–734
- [65] Myzak M.C., Dashwood R.H.: Chemoprotection by sulforaphane: Keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett.*, 2006; 233: 208–218
- [66] Myzak M.C., Dashwood W.M., Orner G.A., Ho E., Dashwood R.H.: Sulforaphane inhibits histone deacetylase *in vivo* and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice. *FASEB J.*, 2006; 20: 506–508
- [67] Myzak M.C., Hardin K., Wang R., Dashwood R.H., Ho E.: Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 811–819
- [68] Myzak M.C., Karplus P.A., Chung F.L., Dashwood R.H.: A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res.*, 2004; 64: 5767–5774
- [69] Myzak M.C., Tong P., Dashwood W.M., Dashwood R.H., Ho E.: Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2007; 232: 227–234
- [70] Pappa G., Bartsch H., Gerhauser C.: Biphasic modulation of cell proliferation by sulforaphane at physiologically relevant exposure times in a human colon cancer cell line. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007; 51: 977–984
- [71] Pappa G., Lichtenberg M., Iori R., Barillari J., Bartsch H., Gerhauser C.: Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from *Brassicaceae*. *Mutation Res.*, 2006; 599: 76–87
- [72] Park S.Y., Kim G.Y., Bae S.J., Yoo Y.H., Choi Y.H.: Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. *Oncol. Rep.*, 2007; 18: 181–187
- [73] Parnaud G., Li P., Cassar G., Rouimi P., Tulliez J., Combaret L., Gamet-Payrastré L.: Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Nutr. Cancer*, 2004; 48: 198–206
- [74] Petri N., Tannergren C., Holst B., Mellon F.A., Bao Y., Plumb G.W., Bacon J., O'Leary K.A., Kroon P.A., Knutson L., Forsell P., Eriksson T., Lennernas H., Williamson G.: Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.*, 2003; 31: 805–813
- [75] Pham N.A., Jacobberger J.W., Schimmer A.D., Cao P., Gronda M., Hedley D.W.: The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol. Cancer Ther.*, 2004; 3: 1239–1248
- [76] Rose P., Huang Q., Ong C.N., Whiteman M.: Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005; 209: 105–113
- [77] Rudolf E., Andelova H., Cervinka M.: Activation of several concurrent proapoptotic pathways by sulforaphane in human colon cancer cells SW620. *Food Chem. Toxicol.*, 2009; 47: 2366–2373
- [78] Seligson D.B., Horvath S., Shi T., Yu H., Tze S., Grunstein M., Kurdستاني S.K.: Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*, 2005; 435: 1262–1266
- [79] Seow A., Shi C.Y., Chung F.L., Jiao D., Hankin J.H., Lee H.P., Coetzee G.A., Yu M.C.: Urinary total isothiocyanate (ITC) in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore: relationship with dietary total ITC and glutathione S-transferase M1/T1/P1 genotypes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7: 775–781
- [80] Seow A., Vainio H., Yu M.C.: Effect of glutathione-transferase polymorphisms on the cancer preventive potential of isothiocyanates: an epidemiological perspective. *Mutat. Res.*, 2005; 592: 58–67
- [81] Seow A., Yuan J.M., Sun C.L., Van Den Berg D., Lee H.P., Yu M.C.: Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 2055–2061
- [82] Shapiro T.A., Fahey J.W., Wade K.L., Stephenson K.K., Talalay P.: Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7: 1091–1100
- [83] Shen G., Xu C., Chen C., Hebbar V., Kong A.N.: p53-independent G1 cell cycle arrest of human colon carcinoma cells HT-29 by sulforaphane is associated with induction of p21CIP1 and inhibition of expression of cyclin D1. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2006; 57: 317–327
- [84] Singh A.V., Xiao D., Lew K.L., Dhir R., Singh S.V.: Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts *in vivo*. *Carcinogenesis*, 2004; 25: 83–90
- [85] Singh S.V., Herman-Antosiewicz A., Singh A.V., Lew K.L., Srivastava S.K., Kamath R., Brown K.D., Zhang L., Baskaran R.: Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 25813–25822
- [86] Singh S.V., Srivastava S.K., Choi S., Lew K.L., Antosiewicz J., Xiao D., Zeng Y., Watkins S.C., Johnson C.S., Trump D.L., Lee Y.J., Xiao H., Herman-Antosiewicz A.: Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 19911–19924
- [87] Singletary K., MacDonald C.: Inhibition of benzo[a]pyrene and 1,6-dinitropyrene-DNA adduct formation in human mammary epithelial cells by dibenzoylmethane and sulforaphane. *Cancer Lett.*, 2000; 155: 47–54
- [88] Spitz M.R., Duphorne C.M., Detry M.A., Pillow P.C., Amos C.I., Lei L., de Andrade M., Gu X., Hong W.K., Wu X.: Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000; 9: 1017–1020
- [89] Svehlikova V., Wang S., Jakubikova J., Williamson G., Mithen R., Bao Y.: Interactions between sulforaphane and apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in Caco-2 cells. *Carcinogenesis*, 2004; 25: 1629–1637
- [90] Thejass P., Kuttan G.: Antimetastatic activity of sulforaphane. *Life Sci.*, 2006; 78: 3043–3050
- [91] Thimmulappa R.K., Mai K.H., Srisuma S., Kensler T.W., Yamamoto M., Biswal S.: Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.*, 2005; 62: 5196–5203

- [92] Wang L., Liu D., Ahmed T., Chung F.L., Conaway C., Chiao J.W.: Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention. *Int. J. Oncol.*, 2004; 24: 187–192
- [93] Wang L.I., Giovannucci E.L., Hunter D., Neuberg D., Su L., Christiani D.C.: Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian population. *Cancer Causes Control*, 2004; 15: 977–985
- [94] Wideł M.S., Wideł M.: Mechanizmy przerzutowania i molekularne markery progresji nowotworów złośliwych. I. Rak jelita grubego. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2006; 60: 453–470
- [95] Winiwarter S., Bonham N.M., Ax F., Hallberg A., Lennernas H., Karlen A.: Correlation of human jejunal permeability (*in vivo*) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J. Med. Chem.*, 1998; 41: 4939–4949
- [96] Woessner J.F. Jr: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, 1991; 5: 2145–2154
- [97] Xu C., Shen G., Yuan X., Kim J.H., Gopalkrishnan A., Keum Y.S.: ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 437–445
- [98] Yang C.S., Smith T.J., Hong J.Y.: Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations. *Cancer Res.*, 1994; 54: 1982s–1986s
- [99] Ye L., Dinkova-Kostova A.T., Wade K.L., Zhang Y., Shapiro T.A., Talalay P.: Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin. Chim. Acta*, 2002; 316: 43–53
- [100] Yeh C.T., Yen G.C.: Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 2138–2148
- [101] Zhang Y.: Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Res.*, 2004; 555: 173–190
- [102] Zhang Y., Callaway E.C.: High cellular accumulation of sulforaphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. *Biochem. J.*, 2002; 364: 301–307
- [103] Zhang Y., Talalay P., Cho G.C., Posner G.H.: A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 2399–2403
- [104] Zhu P., Martin E., Mengwasser J., Schlag P., Janssen K.P., Gottlicher M.: Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2004; 5: 455–463

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.