

Received: 2003.07.18

Accepted: 2003.12.19

Published: 2004.02.27

Genisteina – izoflawonoid soi o zróżnicowanym mechanizmie działania – implikacje kliniczne w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych

Genistein: a soy isoflavone revealing a pleiotropic mechanism of action – clinical implications in the treatment and prevention of cancer

Czesław Radzikowski, Joanna Wietrzyk, Grzegorz Gryniewicz*, Adam Opolski

Zakład Immunologii Nowotworów, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirsfelda, PAN we Wrocławiu

*Instytut Farmaceutyczny w Warszawie

Streszczenie

Naturalny izoflawonoid, genisteina, wykazuje działanie przeciwnowotworowe, przeciwprzerzutowe i antyangiogenne opisane w wielu modelach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo*. Ponadto, wyniki badań epidemiologicznych sugerują, że spożywanie nasion soi może się przyczynić do rzadszego występowania raków piersi, okrężnicy, gruczołu krokowego, tarczycy oraz raków głowy i szyi. Działanie protekcyjne diety zawierającej nasiona soi jest związane m.in. z dużą zawartością genisteiny. Z drugiej jednak strony, genisteina może wzmacniać proliferację niektórych estrogenozależnych ludzkich raków piersi oraz wzmacniać ich wzrost u myszy bezgrasiczych. Praca przedstawia zróżnicowanie biologicznego działania genisteiny, jej potencjalne kliniczne zastosowanie ze szczególnym uwzględnieniem prewencji chorób nowotworowych.

Słowa kluczowe:

genisteina • izoflawonoidy soi • działanie przeciwnowotworowe • hamowanie angiogenezy • prewencja chorób nowotworowych • działanie estrogenne i antyestrogenne

Summary

Genistein, a naturally occurring isoflavonoid, displays antitumor, antimetastatic and antiangiogenic properties, described in various experimental *in vitro* and *in vivo* models. The results of several epidemiological studies suggest that soybean consumption may contribute to lower incidence of breast, colon, prostate, thyroid, and head and neck cancers. This protective effect of soy consumption is attributed, among others, to genistein. On the other hand, genistein may enhance the proliferation of some estrogen-positive human breast cancer cells *in vitro* and the growth of mammary gland and mammary cancer cells in athymic mice. In this paper, various aspects of the diverse biological activities of genistein and their potential clinical implications, especially in the treatment and prevention of cancer, are reviewed and discussed.

Key words:

genistein • soybean derived isoflavones • antitumor activity • angiogenesis inhibition • cancer chemo-prevention • estrogenic and antiestrogenic properties



Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5212.pdf

Word count: 6109

Tables: 4

Figures: 1

References: 87

Adres autora: doc. dr hab. Adam Opolski, Zakład Immunologii Nowotworów Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: opolski@iitd.pan.wroc.pl

WSTĘP

Soja (*Glycine max.* Merrill) jest rośliną subtropikalną, której udomowienie (uprawę) lokuje się na obszarze północno-wschodnich Chin, w okresie panowania dynastii Shang (1700–1100 p.n.e.). Obecnie jest jednym z głównych produktów rolniczych w skali globalnej, cenionym jako źródło białka i tłuszczu do celów spożywczych, ale poziom spożycia samej soi oraz jej przetworów pozostaje wielokrotnie wyższy w krajach azjatyckich w porównaniu z obszarem cywilizacji zachodniej. Podstawowy surowiec żywnościowy – nasiona (fasolki) soi, zawierają 70% wody, a prawie połowę pozostałości (suchej masy) stanowią proteiny. Głównymi produktami pozyskiwanymi z soi w procesach przemysłowych są: białka i koncentraty białkowe, olej spożywczy i lecytyna. Zawartość błonnika cennego jako „nieodżywczy“ środek spożywczy, ocenia się na około 2%. O wartości surowca stanowią także składniki o bardzo małej zawartości (na 100 g nasion): minerały (78 mg Ca, 158 mg P, 3,8 mg Fe), witaminy (0,40 mg tiaminy, 0,17 mg ryboflawiny, 1,5 mg niacyny i 27 mg kwasu askorbinowego) oraz fitosterole i flawonoidy. Ta ostatnia klasa metabolitów wtórnych, zaliczana pod względem funkcjonalnym do kategorii fitoestrogenów, obecna w surowcu na poziomie 50–300 mg/100 g stanowi zespół składników o dużej, wielokierunkowej aktywności farmakologicznej, które znamienne wpływają na parametry zdrowia obserwowane w skali epidemiologicznej. Surowe nasiona soi nie nadają się do spożycia, ze względu na obecność składników toksycznych (saponiny, enzymy np. inhibitor Bowmana-Birka), które jednak ulegają szybkiej dezaktywacji w procesach fermentacji lub obróbki termicznej (np. gotowanie) [20].

W świetle wielowiekowej regionalnej tradycji najludniejszych obszarów świata, bezpieczeństwo stosowania soi w żywieniu człowieka jest sprawą bezsporną. Mniej oczywista jest sytuacja dostępnych obecnie w wielu krajach preparatów o charakterze dodatków do żywności (nutraceutyków), do produkcji których stosuje się tzw. koncentraty lub izolaty flawonoidowe, których specyfikacja często pozostawia wiele do życzenia. W natywnej matrycy biologicznej (tkanka nasion *Glycine max.*) występuje wiele składników z grupy izoflawonów o znanej strukturze chemicznej, ale słabo rozpoznanych właściwościach farmakologicznych. Wyjątek stanowi główny składnik tej frakcji: izoflawon genisteina, którego aktywność biologiczna jest przedmiotem intensywnych badań, a ich wyniki są ogłaszane w setkach publikacji w skali rocznej. Mimo to, poglądy na efekty fizjologiczne diety bogatej w przetwory sojowe zawierające genisteinę (lub stosowa-

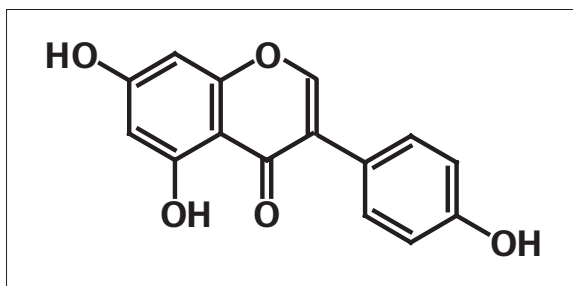
nia suplementacji żywności) wcale nie są jednoznaczne! Na taką paradoksalną sytuację składa się kilka czynników, które nie zawsze są uwzględniane w interpretacji wyników.

Biosynteza izoflawonów soi jest rezultatem aktywności genów szlaku wytwarzającego fenylopropanoidy (shikimate – malonate pathway), które w różnych roślinach spełniają funkcje barwników oraz substancji sygnalizacyjnych i ochronnych (fitoaleksyn). Większość flawonoidów ulega posttranslacyjnej modyfikacji przez enzymy z klasy glikozydaz lub glikozylotransferaz. Zgodnie z tym przyjmuje się obecnie, że naturalną postacią strukturalną genisteiny w tkankach roślinnych jest jej pochodna glikozylowa: 7-O-β-D-glukopiranozylogenisisteina, znana pod nazwą genistyny, oraz jej estry z niższymi kwasami karboksylowymi, zwłaszcza malonowym i octowym. Związki te są z łatwością wykrywane w pierwotnym materiale biologicznym z zastosowaniem współczesnych metod analitycznych wysokiej czułości (np. HPLC-MS). W miarę przerobu lub przechowywania surowca ich zawartość ulega znacznemu obniżeniu, czemu towarzyszy proporcjonalny wzrost zawartości aglikonu – genisteiny [68]. Ma to bardzo istotne znaczenie w ocenie biodostępności i farmakokinetyki genisteiny pochodzącej z różnych źródeł, gdyż zarówno właściwości fizykochemiczne (np. rozpuszczalność w wodzie i płynach ustrojowych) jak i losy cząsteczki w matrycy biologicznej (zwłaszcza biodystrybucja i metabolizm) są różne, w przypadku aglikonów oraz odpowiadających im glikozydów [66]. Względna biodostępność genistyny i genisteiny jest ciągle przedmiotem pewnych kontrowersji [60,65]. W dawniejszej literaturze przedmiotu dominuje pogląd, że absorpcja genisteiny zachodzi dopiero po uwolnieniu aglikonu pod działaniem nieswoistych β-glikozydaz bakteryjnych obecnych w jelicie grubym. Ostatnio jednak udowodniono, że układ trawienny ssaków dysponuje skutecznym systemem enzymatycznym (lactase phlorizin hydrolase of the small intestine - LPH; EC 3.2.1.62) [16], uwalniającym aglikony izoflawonowe niezależnie od aktywności flory bakteryjnej przewodu pokarmowego.

Znacznie trudniejsza jest interpretacja wyników z powodu niejednorodności stosowanych preparatów pochodzenia naturalnego, w tym żywności, nutraceutyków i produktów ziołowych. Dokładne określenie zawartości indywidualnych składników (np. flawonoidów) o potencjalnie dużej aktywności biologicznej, często na poziomie mikrogramów i części na milion na ogół przekracza znacznie możliwości specyfikacji, kontroli jakości i certyfikacji, którymi dysponuje producent (ale także wymagania reje-

stracyjnie dotyczące tego rodzaju produktów). Tymczasem, na przykład w dostępnych na rynku preparatach „genisteinowych“ znajdujemy często porównywalną ilość strukturalnie pokrewnych izoflawonów (daidzeina, biochanina A, glycyteina, formononetyna, etc.), których właściwości biologiczne są bardzo słabo (w porównaniu z genisteiną) rozpoznane, a o potencjalnych interakcjach (np. aktywacji lub hamowaniu aktywności cytochromów i innych enzymów metabolizmu) wiadomo niewiele. Oczywiście dodatkowe elementy niepewności wnosi badany układ biologiczny, który na każdym stopniu organizacji „oddziałuje“ na ksenobiotyki w sposób selektywny. Współczesne metody analizy, dysponują możliwością identyfikacji i kwantyfikacji naturalnych izoflawonów (zarówno aglikonów jak glikokoniugatów) oraz ich metabolitów, na poziomie nanomolowym, co powinno znacznie ułatwić interpretację wyników badań [53].

Nader często jednak opinię medyczną kształtują wyniki i oceny samego działania biologicznego, pozbawione elementu bilansu materiałowego badanej próbki i krytycznej analizy ilościowej w odniesieniu do substancji aktywnej. W celu uświadomienia sobie, z jakim stopniem komplikacji mamy do czynienia w interpretacji danych aktywności biologicznej, warto uwzględnić informacje z amerykańskiej bazy fitochemicznej: Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases; Agricultural Research Service (<http://www.ars-grin.gov/duke/>). Wykaz wyników badania aktywności biologicznej materiału roślinnego (liście, pędy, nasiona, korzenie, hodowle tkankowe) soi (*Glycine max.* Merrill), zawiera kilkaset pozycji! Podobnej objętości jest lista związków chemicznych, wyodrębnionych z tej rośliny lub zidentyfikowanych jako jej składniki. Są to w większości metabolity wtórne, obecne w ilościach submikrogramowych licząc na 1 g materiału, jednakże poziom ich aktywności biologicznej jest często wystarczająco wysoki do zarejestrowania działania biologicznego, zwłaszcza kumulacyjnego, na poziomie spożycia charakterystycznym dla tradycyjnej diety azjatyckiej. Przykładowo podajemy niektóre kategorie substancji obecnych w soi, mogących wpływać (synergistycznie lub antagonistycznie, np. przez aktywację lub hamowanie aktywności CYP 450), na właściwości biologiczne uznawane za typowe dla fitoestrogenów o strukturze izoflawonów: aminokwasy i peptydy, saponiny, sterole, lipidy, kwasy karboksylowe alifatyczne i aromatyczne w tym hydroksykwas i fenolokwas, cukry proste i złożone oraz ich estry, witaminy, ligniny, flawonole, etc. Nawet w ramach tej samej grupy znanych i strukturalnie pokrewnych metabolitów wtórnych roślin, w wyniku włączenia ich w procesy metaboliczne ssaków, generowane są nowe związki o trudnych do przewidzenia właściwościach. W eksperymentach *in vitro* wykazano, że zarówno genisteina jak i daidzeina są doskonałymi substratami dla cytochromów P450. Pierwszy z tych izoflawonów jest przekształcany do czterech różnych pochodnych monohydroksylowanych i dwu dihydroksylowanych. Daidzeina jest transformowana do dziewięciu metabolitów, z czego cztery mają jedną dodatkową grupę hydroksylową, cztery po dwie a jeden różni się od związku wyjściowego obecnością trzech dodatkowych hydroksyli [30]. Przykład ten można uznać za typowy i dobitnie potwierdzający tezę, że należy skrupulatnie odróżniać opinie i rzekome wska-



Ryc. 1. Wzór chemiczny genisteiny

zania medyczne odnoszące się do preparatów złożonych, od wyników badań uzyskanych po zastosowaniu pojedynczej substancji certyfikowanej o znanym (wysokim) stopniu czystości chemicznej.

DANE EPIDEMIOLOGICZNE O OCHRONNYM DZIAŁANIU GENISTEINY (SOI)

Genisteina (ryc. 1) obok daidzeiny jest głównym, najlepiej poznanym izoflawonowym składnikiem soi, której spożycie w krajach azjatyckich wielokrotnie przewyższa spożycie w krajach europejskich i Ameryki Północnej. W opinii epidemiologów te różnice w spożyciu soi, a także inne różnice w sposobie odżywiania się w krajach uprzemysłowionych (więcej pokarmów mięsnych, tłuszczów zwierzęcych, mniej roślinnych, mniej ziaren zbóż i włókniaka) powinny być brane pod uwagę w zestawieniu z niższą śmiertelnością z powodu raka piersi, przewodu pokarmowego i gruczołu krokowego w populacji azjatyckiej [10,47, 49,50]. Niedawne doniesienia wskazują na możliwość prewencyjnego działania genisteiny także w nowotworach tarczycy [25]) oraz rakach głowy i szyi [3].

Jak podaje Zhou i współpr. [85] w tradycyjnym pożywieniu Japończyków mieszkających na wsi znajduje się dziennie około 39–54 g produktów sojowych, w tym około 10–20 mg genisteiny. Przekonujące są wyniki badań stężenia izoflawonów w moczu u 14 mieszkańców miast w Finlandii w porównaniu z 14 mieszkańcami wsi w Japonii. Średnia określonego indywidualnie całkowitego poziomu izoflawonów w moczu była 7–110 razy wyższa u badanych mężczyzn z Japonii niż w Finów. Najwyższe stwierdzone stężenie w moczu wynosiło 276 nM [2].

Punktem zwrotnym w zakrojonych na szeroką skalę badaniach nad rolą soi i zawartych w niej składników w obniżeniu ryzyka zachorowania na nowotwory, zwłaszcza piersi, gruczołu krokowego i przewodu pokarmowego była międzynarodowa konferencja pt. „The Role of Soy Products in Reducing Risk of Cancer“ (konferencja sponsorowana przez Narodowy Instytut Badań nad Rakiem – NCI, NIH, Bethesda), która odbyła się w czerwcu 1990 roku w Bethesda, Maryland). Na konferencji tej zwrócono uwagę na potrzebę podjęcia badań w następujących kierunkach:

1. Rola soi, jej produktów oraz zawartych w niej substancji czynnych w diecie wykazującej działanie prewencyjne.
2. Badanie właściwości biologicznych soi i jej składników, które mogą wyjaśnić mechanizm wpływania na przebieg procesu nowotworowego oraz obniżania ryzyka rozwoju nowotworu [46].



Tabela 1. Działanie ochronne genisteiny *in vivo* w doświadczalnej kancerogenezie

| Indukowany nowotwór | Czynnik rakotwórczy | Działanie | Piśmiennictwo |
|----------------------|---------------------------------------|---|---------------|
| Rak sutka; szczury | 7,12-dimetylo-benzantracen (DMBA) | Opóźnienie pojawiania się nowotworów, mniejsza ich liczba | [33] |
| Rak jelita; szczury | Azoksymetan | Brak zmian przednowotworowych | [74] |
| Rak stercza; szczury | N-metylonitrozo-mocznik i testosteron | Opóźnienie pojawiania się nowotworów, mniejsza ich liczba | [56] |
| Rak skóry; myszy | DMBA + TPA (12-O-tetrahydroksyforbol) | Blokowanie etapów inicjacji i promocji | [78] |

W pracy szczególną uwagę zwrócono na publikacje, w których wyniki wskazują na właściwości genisteiny, uzasadniające jej potencjalne stosowanie w programach prewencji chorób nowotworowych. Właściwości te, to m.in.:

- aktywność antyproliferacyjna [26,76,84,85],
- wpływ na cykl komórkowy i uczestniczące w nim cząsteczki o działaniu regulatorowym [76,85],
- zdolność do indukcji różnicowania [77],
- działanie proapoptotyczne [85],
- wpływ na receptory czynników wzrostowych, na onkogeny i geny supresorowe oraz na białka i cząsteczki uczestniczące w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych [11,22,35,36],
- działanie ochronne przed genotoksycznością czynników rakotwórczych [62],
- oraz wpływ na proces angiogenezy nowotworowej i uczestniczące w nim komponenty komórkowe i molekularne [19,82,85].

PREWENCYJNE STOSOWANIE GENISTEINY W MODELACH EKSPERYMENTALNYCH

Dane epidemiologiczne dotyczące działania ochronnego genisteiny u ludzi potwierdzone są również badaniami jej wpływu ochronnego przed rozwijającymi się spontanicznie lub indukowanymi chemicznie nowotworami u zwierząt [5,78]. Wykazano, że soja lub zawarte w niej składniki przeważnie opóźniały pojawianie się nowotworów, a także obniżały ich liczbę u zwierząt poddanych działaniu różnych czynników kancerogennych (tabela 1). Jak podaje Bingham i współpr. [7], w siedmiu z dziewięciu przeprowadzonych doświadczeń u szczurów ekspozycyjnych na działanie kancerogenów wykazano korzystne działanie diety wzbogaconej w soję w porównaniu ze zwierzętami odżywianymi dietą standardową. Jeżeli z diety wzbogaconej w soję usunięto izoflawony, to działania ochronnego tej diety nie obserwowano. Ponadto wykazano, że genisteina jest zdolna do hamowania indukcji czynnikami chemicznymi nowotworów gruczołu mlekowego u niedojrzałych płciowo samic szczurów, prawdopodobnie poprzez wpływ na różnicowanie się komórek tego gruczołu [33]. Wykazano także działanie ochronne genisteiny w modelu dwustopniowego procesu kancerogenezy skóry u myszy [78] (tabela 1).

Thiagarajan i współpr. [74] zastosowali genisteinę, a także inne składniki soi jako dodatek do diety zawierającej tłuszcz i białko pochodzące albo z soi albo z kazeiny, z dodatkiem 0,5 lub 1,0% wapnia. Szczury szczepu F344, w 21 i w 28 dniu życia otrzymały czynnik kancerogeny - azoksymetan. Od 35 dnia życia, a więc w tydzień po drugiej iniekcji azoksymetanu szczury otrzymywały dietę do-

świadczalną, zawierającą dodatek soi, jej produktów lub genisteinę przez 12 tygodni. W preparatach z jelita grubego oceniano liczbę uznawanych za stan przednowotworowy zmienionych krypt (większa średnica i wysokość oraz liczba zmienionych krypt). Największe działanie ochronne, tzn. najniższą liczbę zmienionych krypt stwierdzono u szczurów, otrzymujących dietę z dodatkiem 0,5% wapnia albo 0,015% genisteiny [74].

Stwierdzono także efekt ochronny genisteiny przed genotoksycznym działaniem DMBA (7, 12-dimetylobenz(a) antracenu) *in vivo* u myszy samic szczepu ICR. Działanie to wyrażone było niższą niż w kontroli liczbą wytworzonych przez kancerogen adduktów z DNA oraz obniżeniem wymiany chromatyd siostrzanych (SCE) i indeksu proliferacji. Myszy przed ekspozycją na DMBA otrzymywały genisteinę przez 3 lub 6 dni, a następnie wprowadzono im podskórnie bromodezoksyrydynę i podawano dootrzewnowo DMBA (50 mg/kg m.c.) i kolchicynę (4 mg/kg m.c.). Po 24, 23 lub po 2 godzinach badano komórki szpiku kostnego, wątroby i przewodów gruczołów piersiowych [21].

ZASTOSOWANIE GENISTEINY JAKO LEKU PRZECIWNOWOTWOROWEGO

Inni autorzy badali skutki stosowania genisteiny (1 mg/dzień/mysz) drogą pokarmową u myszy zaszczepionych podskórnie komórkami czerniaka B16. U myszy otrzymujących genisteinę wykazano o połowę mniejsze guzy nowotworowe w porównaniu z myszami kontrolnymi (tabela 2) [59].

Z kolei Menon i współpr. [45] obserwowali działanie przeciwprzerzutowe genisteiny u myszy, którym dożylnie podano komórki czerniaka B16F10. Podawanie drogą pokarmową genisteiny w dawce 200 μ M dziennie powodowało zmniejszenie o 54% liczby przerzutów nowotworowych w płucach myszy. Obserwowano także wydłużenie ich czasu przeżycia [45].

W badaniach własnych, wykazano obniżenie zdolności do przerzutowania komórek przeszczepialnych nowotworów mysich [80]. Genisteina stosowana pojedynczo lub po jednorazowej dawce cyklofosfamidu (CY) myszom zaszczepionym różnymi drogami komórkami czerniaka B16F-10 lub komórkami przeszczepialnego raka płuc Lewis (LL2), wykazała działanie przeciwprzerzutowe. Efekt ten obserwowano u myszy zaszczepionych dożylnie komórkami raka LL2, którym podawano wyłącznie genisteinę lub genisteinę po pojedynczej dawce CY (odpowiednio: 94 i 85% redukcji liczby przerzutów). Słabszy efekt obserwowano po przeszczepieniu tego nowotworu pod-

Tabela 2. Aktywność przeciwnowotworowa genisteiny *in vivo* w zwierzęcych modelach doświadczalnych

| Pochodzenie komórek nowotworowych | Nazwa linii | Działanie | Piśmiennictwo |
|-----------------------------------|---|---|-------------------------|
| Czerniak; mysz | B16F-10 B16 B16F-10, B16 | Hamowanie przerzutów w płucach, przedłużenie życia Hamowanie wzrostu guza podskórnego Hamowanie wzrostu guza i przerzutów w płucach, hamowanie angiogenezy | [45] [59] [80,82] |
| Rak płuc; mysz | LL2 | Hamowanie wzrostu guza i przerzutów w płucach, hamowanie angiogenezy | [80-82] |
| Rak pęcherza; mysz | MB 49 | Hamowanie wzrostu guza, hamowanie angiogenezy | [85] |
| Rak sutka; ludzki | MDA-MB 231, MCF 7 ksenoprzeszczep u myszy bezgrasiczych | Hamowanie angiogenezy, obniżenie wytwarzania VEGF, TGF β 1 | [69] |
| Rak jelita; ludzki | HSC 41E6, HSC 45M2 SH101P4 ksenoprzeszczep u myszy bezgrasiczych | Brak hamowania wzrostu | [84] |

skórnice (odpowiednio: 34 i 55% redukcji masy guza). W przypadku myszy zaszczerpionych śródskórnice lub dożylnie komórkami czerniaka obserwowano także działanie przeciwnowotworowe genisteiny podanej jako jedyny lek (42% redukcji masy guza i 27% redukcji liczby kolonii nowotworowych w płucach); w skojarzonym podaniu z CY obserwowano wzmoczenie efektu (69% redukcji masy guza i 66% redukcji liczby kolonii nowotworowych w płucach). W omówionych doświadczeniach stosowano genisteinę w dawce dziennej 100 mg/kg m.c. przez 10 dni, rozpoczynając podawanie od 4. dnia po przeszczepieniu nowotworu lub od 4 dnia po podaniu CY [80].

Biorąc pod uwagę antyangiogenne działanie genisteiny przeprowadzono także wiele doświadczeń w modelach mysich nowotworów rozwijających się pod skórą, które po osiągnięciu odpowiedniej masy (model zaawansowanej choroby nowotworowej) były usuwane operacyjnie, po czym rozpoczynano podawanie genisteiny (w stadium choroby szczątkowej) [81]. Jedynie w modelu raka płuc LLC wykazano działanie przeciwprzerzutowe genisteiny. Nie obserwowano wpływu genisteiny na aktywność stosowanego w tym modelu CY. Wykazano także antyangiogenne działanie genisteiny mierzone zawartością krwi w guzie nowotworowym, czyli jego ukrwieniem, w modelu raka płuc LLC i czerniaka B16. W modelu raka płuc LLC zaobserwowano działanie addytywne genisteiny stosowanej w skojarzeniu z CY, mierzone ukrwieniem guza nowotworowego. W przypadku modelu czerniaka B16F-10 nie wykazano antyangiogennego działania genisteiny [82].

Antyangiogenne działanie genisteiny wykazali także inni autorzy w doświadczeniach *in vivo*, w których oceniano nie tylko działanie przeciwnowotworowe, ale także przeciwprzerzutowe (tabela 2). Taką aktywność stwierdzono w modelu czerniaka, raka płuc, a także przeszczepialnego raka pęcherza moczowego myszy [85]. W modelu przeszczepu ludzkich komórek raka piersi myszom bezgrasiczym Shao i współpracownicy [69] obserwowali zahamowanie angiogenezy oraz obniżenie wytwarzania czynników regulujących ten proces, a mianowicie czynnika wzrostowego dla śródbłonek naczyń (VEGF) i transformującego czynnika wzrostowego beta (TGF- β).

Przykładem doświadczeń, w których nie wykazano hamowania wzrostu nowotworów u myszy bezgrasiczych, po

podaniu 4 mg/mysz genisteiny, są badania Yanagihara i współpracownicy [84] przeprowadzone na ludzkich komórkach nowotworowych 3 linii pochodzących z raków żołądka.

HAMOWANIE PROLIFERACJI KOMÓREK PRZEZ GENISTEINĘ

W badaniach działania przeciwo proliferacyjnego genisteiny *in vitro* (tabela 3) stosowano komórki różnych linii nowotworowych pochodzących od myszy i szczurów, a także prawidłowe komórki śródbłonna naczyniowego. Badano linie pochodzące ze śluzówki jelita, komórki transformowane onkogenem Ha-ras, komórki raka embrionalnego, czerniaka oraz raka pęcherza moczowego. Wykazano, że genisteina powoduje zahamowanie proliferacji komórek, a za to odpowiadać może indukowanie apoptozy, jak również indukcja różnicowania. Ponadto wykazano zahamowanie inwazyjności i działanie antyangiogenne *in vitro* pod wpływem ekspozycji komórek na genisteinę (tabela 3). Wyniki uzyskane przez różnych autorów wskazują na aktywność biologiczną genisteiny w zastosowanych modelach i schematach doświadczalnych *in vitro*.

Booth i współpracownicy [8] badali wpływ genisteiny na pasażowane *in vitro* komórki nabłonka jelitowego szczura, linii IEC6 i IEC18 (tabela 3) oraz ludzkie komórki raka jelita grubego linii oznaczonych symbolami SW620 i HT29 (tabela 4). Działanie genisteiny i innych izoflawonów porównywano z działaniem tamoksyfenu (działanie antyestrogenowe) i inhibitora kinazy tyrozynowej (tyrphostin). Spośród siedmiu badanych preparatów genisteina okazała się najsilniejszym inhibitorem proliferacji, induktorem apoptozy i wykazywała działanie hamujące aktywność kinazy tyrozynowej. W innej pracy tej samej grupy [9] badano działanie ochronne genisteiny dla komórek klonogennych krypt jelita cienkiego myszy oraz wobec nabłonka śluzówki tego jelita. Określono wpływ genisteiny na zdolność tych komórek do proliferacji i apoptozy po napromienianiu. W zastosowanym protokole doświadczenia nie wykazano wpływu ochronnego genisteiny, oceniając liczbę i rozmieszczenie komórek proliferujących w kryptach. Natomiast genisteina powodowała obniżenie wrażliwości na napromienianie komórek klonogennych. Autorzy podają wyniki doświadczeń Sorensena i współpracownicy [73] przeprowadzonych na myszach heterozygotycznych dla allelu MIN (multiple inte-



Tabela 3. Aktywność przeciwwzrostowa genisteiny *in vitro* wobec zwierzęcych komórek nowotworowych

| Pochodzenie komórek | Nazwa linii | Działanie | Piśmiennictwo |
|--------------------------------|--------------|---|---------------|
| Jelito cienkie; szczur | EC 18, IEC 6 | Hamowanie proliferacji, indukcja apoptozy | [8] |
| Rak embrionalny, mysz | F-9 | Indukcja różnicowania | [29] |
| VAL 12 komórki stransformowane | NIH 3T3 | Hamowanie proliferacji | [52] |
| Ha-ras; mysz | | | |
| Czerniak; mysz | B 16 | Hamowanie proliferacji, indukcja różnicowania | [59] |
| | B 16 BL-6 | Hamowanie inwazyjności <i>in vitro</i> | [83] |
| Rak pęcherza; mysz | MB 49, MBT 2 | Hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2-M, indukcja apoptozy | [85] |
| Śródbłonek | Różne linie | Hamowanie angiogenezy <i>in vitro</i> | [19] |

Tabela 4. Aktywność przeciwwzrostowa genisteiny *in vitro* wobec ludzkich komórek nowotworowych

| Pochodzenie komórek nowotworowych | Nazwa linii | Działanie | Piśmiennictwo |
|-----------------------------------|---|--|---------------------|
| Rak piersi | MCF-7 (ER+) | Współzawodnictwo z estradiolem – antyproliferacyjny | [41,55] |
| | MCF-7 (ER+) i MDA MB 231 (ER–) | Antyproliferacyjne, blok cyklu w fazie G2-M indukcja apoptozy, antyinwazyjne (MMP-9, TIMP-9) | [69] |
| | ZR-1, ER-ZR-75-9a1 (oporna na tamoksyfen) ER-ZR-PR-LT (ER+) (wrażliwa na tamoksyfen) | Antyproliferacyjne | [18] |
| Rak stercza | PC 3 (wrażliwa na androgen) | Indukcja apoptozy, inaktywacja działania czynników uszkodzających DNA | [14] |
| | LNCaP (niewrażliwa na androgen) | Antyproliferacyjne, indukcja apoptozy | [31] |
| | PC 3 i PC 3 M (odmiana przerzutująca) DU 145 (niewrażliwa na androgen) | Indukcja apoptozy, hamowanie sygnałów wewnątrzkomórkowych | [4] |
| Raki przewodu pokarmowego | HT 29 i SW 620 (raki jelita grubego) | Antyproliferacyjne – indukcja apoptozy, | [8,38,42,48] |
| | HEP G 2 (rak wątroby) | antyproliferacyjne, antyproliferacyjne, wzrost ekspresji | |
| | HGC 27 (rak żołądka) HPAF-11 i Su 86.86 (raki trzustki) | K-ras i genu <i>mdr 1</i> | |
| Rak pęcherza moczowego | HT 1376, UM-UC-3, RT 4, J 82, TCCSUP | Antyproliferacyjne, apoptoza, blok cyklu komórkowego | [85] |
| Czerniak | 5 linii | Indukcja różnicowania | [27] |
| Białaczki szpikowe | K 562, HL-60, ML-1, MO 7 E, U 937, MOLT 4, HL-60 | Indukcja różnicowania, antyproliferacyjne | [12,24,39,40,76,79] |

(ER+) – wrażliwa na estrogen; (ER–) – niewrażliwa na estrogen

stinal neoplasia – mysi odpowiednik APC – adenomatous polyposis coli u ludzi). Badania przeprowadzone u myszy MIN nie wykazały wpływu genisteiny na częstość występowania ani też na wielkość pojawiających się u tych myszy nowotworów [73].

Na uwagę zasługują wyniki badań autorów chińskich [83], z użyciem jako modelu komórek mysiego czerniaka B16BL-6 (tabela 3). Autorzy wykazali, że genisteina (24-godzinna ekspozycja komórek na 200 nM) powoduje zahamowanie adhezji komórek czerniaka do macierzy pozakomórkowej (ECM), w wyniku zahamowania fosforylacji białka. Zdaniem autorów, obserwowane zmiany w oddziaływaniu komórek czerniaka z ECM mogą być odpowiedzialne za utratę zdolności do wzrostu inwazyjnego.

Aktywność przeciwwzrostową genisteiny, podobnie jak i innych preparatów pochodzących z soi badano w komórkach linii wywodzących się z różnych nowotworów. W tabeli 4 podano wybrane przykłady działania genisteiny hamujące proliferację komórek nowotworowych utrwalonych linii oraz przyjęte przez autorów podanych

prac wyjaśnienie mechanizmu obserwowanego efektu. Ze zrozumiałych względów najwięcej prac dotyczy komórek raka piersi i to zarówno mających receptor estrogenowy, jak bez jego ekspresji. Jak podano wcześniej badania epidemiologiczne zwróciły uwagę na znacząco niższą umieralność z powodu raka piersi u kobiet w Azji, w porównaniu do kobiet w Ameryce Północnej i w Europie Zachodniej. Zwrócono uwagę na istotne różnice w odżywianiu się, głównie na wielokrotnie (20–50 razy) wyższe spożycie soi i jej produktów.

Działanie antyproliferacyjne genisteiny wykazano na komórki z obecnym receptorem estrogenowym ER+ (linia MCF-7), jak i bez receptora ER- (linie komórkowe MDA MB231 i ZR-1). Działanie antyproliferacyjne wykazano także na komórki wrażliwe, jak i odporne na tamoksyfen o różnej ekspresji receptora dla nabłonkowego czynnika wzrostowego (EGFR), a także wykazujących obecność lub brak receptora estrogenu. W badaniu mechanizmu wyjaśniającego efekt biologiczny brano pod uwagę współzawodniczenie z estradiolem o wiązanie z receptorem [18,70–72].

Shao i wspólr. [71] wykazali, że działanie antyproliferacyjne genisteiny jest związane z blokiem cyklu komórkowego w fazie G2-M, indukcją ekspresji białka p21 (WAF1/CIP1) i apoptozą. Działanie ochronne genisteiny może być związane z działaniem regulatorowym czynników, których ekspresja jest związana z progresywnym wzrostem, a mianowicie MMP-9, tj. metaloproteazy 9 macierzy pozakomórkowej (obniżenie ekspresji) i jej tkankowego inhibitora TIMP-9 (podwyższenie ekspresji). Mechanizm ten wyjaśnia także wykazane *in vivo* działanie antyangiogenne genisteiny u myszy bezgrasiczych, którym przeszczepiono ludzkie komórki raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231. Wyrażało się to zmniejszeniem gęstości naczyń krwionośnych w guzach nowotworowych i obniżeniem poziomu VEGF i TGF-1 β (tabela 3).

El-Zarruk i van den Berg [18] zwrócili uwagę na zróżnicowane działanie antyproliferacyjne genisteiny, zależnie od ekspresji receptora nabłonkowego czynnika wzrostowego (EGF) i stopnia hamowania kinazy tyrozynowej, związanej z tym receptorem. Aktywność genisteiny była większa wobec komórek o mniejszej ekspresji EGFR (linia ZR-PR-LT), natomiast mniejsza wobec komórek linii ZR-75-9a1 wykazujących dużą ekspresję receptora EGF.

McIntyre i Sylvester [43] badali wpływ genisteiny na zależną od EGF proliferację zdrowego mysiego nabłonka gruczołu piersiowego w hodowli *in vitro*, a także na poziom receptora EGF i jego autofosforylację. Wykazali, że przedłużona ekspozycja na genisteinę w dawkach 6,25–100 μ M powodowała zależny od dawki spadek wywoływanej podaniem EGF proliferacji nabłonka. Przedłużone podawanie genisteiny w większych dawkach powodowało spadek poziomu komórkowego receptora EGF (EGFR) i obniżenie intensywności jego autofosforylacji. Zdaniem autorów hamowanie przez genisteinę proliferacji komórek nabłonka gruczołu piersiowego zależnej od EGF, nie zależy od bezpośredniego wpływu obniżającego aktywność kinazy tyrozynowej receptora, ale raczej od obniżenia poziomu receptora EGF z następowym obniżeniem wrażliwości komórek na mitogenne działanie EGF [43].

Jak wynika z przytoczonych informacji, genisteina ma złożone, wielokierunkowe działanie tłumiące proliferację i rozrost komórek raka piersi, co sugerować może także jej działanie ochronne, na co wskazują wyniki badań epidemiologicznych.

Działanie genisteiny hamujące proliferację wykazano także wobec komórek nowotworowych linii wyprowadzonych z ludzkich raków przewodu pokarmowego i pęcherza moczowego (tabela 4). Wynik działania genisteiny wobec 10 linii nowotworowych pochodzących z przewodu pokarmowego (z ludzkich raków żołądka, przełyku i jelita grubego) badano w warunkach hodowli komórkowej *in vitro*. Yanagihara i wspólr. [84] stosując genisteinę w dawce 10 μ g/ml, a także inne izoflawony, wykazali ich cytostatyczność. W wyższych stężeniach (dla genisteiny powyżej 20 μ g/ml) obserwowano efekt cytotoksyczny. Za efekt antyproliferacyjny genisteiny wobec komórek linii wywodzących się z raków żołądka odpowiedzialna była aktywacja szlaku transdukcji sygnału prowadzącego do apoptozy. Genisteina, w odróżnieniu od biochaniny A nie

hamowała jednak wzrostu guzów nowotworowych u myszy bezgrasiczych, którym przeszczepiono komórki 3 linii nowotworowych wyprowadzonych z ludzkich raków żołądka [84].

Badania właściwości antyproliferacyjnych genisteiny *in vitro* na ludzkich komórkach raka trzustki przeprowadzili Lyn-Cook i wspólr. [38]. Dysponowali oni liniami nowotworowymi pochodzącymi z trzustki mężczyzny (linia HPAF-11) i kobiety (linia Su 86.86). Komórki obu linii eksponowano przez 24 godziny na działanie genisteiny w stężeniu 1–10 μ M (linia HPAF-11) i 1,0 μ M (Su 86.86). Wykazano, iż genisteina stymuluje proliferację komórek linii HPAF-11, natomiast nie ma wpływu na komórki drugiej linii. W komórkach obu linii obserwowano wzrost ekspresji K-ras, a tylko w komórkach linii HPAF-11 wzrost ekspresji genu oporności wielolekowej (mdr-1). Wyniki uzyskane przez autorów omawianej pracy są trudne do interpretacji. Autorzy w dyskusji podają informację o braku receptora estrogenowego w komórkach raka trzustki linii HPAF-11, natomiast jego obecność w komórkach linii Su 86.86, co w pewnym stopniu może tłumaczyć wykazane różnice we wrażliwości na antyproliferacyjne działanie genisteiny [38].

Wpływ genisteiny, jak i innych izoflawonów z soi badano również na komórkach linii wyprowadzonych z ludzkich raków pęcherza moczowego. Zhou i wspólr. [85] analizowali wpływ na proliferację, cykl komórkowy i apoptozę komórek 5 linii ludzkich raków pęcherza moczowego. Symbole linii komórkowych podano w tabeli 4. Jednocześnie badano komórki uzyskane z raków pęcherza myszy; wyniki tych badań omówiono wcześniej. Obserwowanemu zahamowaniu proliferacji towarzyszył blok cyklu komórkowego w fazie G2-M. Autorzy nie wyjaśniają mechanizmu obserwowanych zmian, jednakże na podstawie obserwacji własnych i danych z piśmiennictwa sugerują, że genisteina, podobnie jak inne izoflawony wpływa na fosforylację i defosforylację białek regulujących przebieg cyklu komórkowego.

Grupa badaczy z Karmanos Cancer Institute Uniwersytetu Stanowego w Detroit, MI, w wyjaśnieniu obserwowanego działania genisteiny, hamującego proliferację komórek raka stercza i indukującego apoptozę, niezależnie od wrażliwości komórek na androgen, skoncentrowała się nad poznaniem białek odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego i wyjaśnieniem mechanizmu molekularnego indukowanej genisteiną apoptozy. Autorzy ci wykazali, że genisteina wywołuje blok cyklu komórkowego w fazie G2/M i moduluje aktywność białek regulujących cykl komórkowy – wpływa obniżająco na ekspresję cykliny B i powoduje wzrost ekspresji białka p21 (WAF1) [13].

W celu wyjaśnienia proapoptotycznego działania genisteiny, badania skoncentrowano na poznaniu jej wpływu na jądrowy czynnik transkrypcyjny (NF-(B)), znany ze swego działania ochronnego w procesie apoptozy. Davis i wspólr. [14] oraz Li i Sarkar [35] wykazali, że:

1. Genisteina obniża wiązanie czynnika NF- κ B w komórkach raka stercza, promując sygnał proapoptotyczny.
2. Przeciwdziała aktywacji czynnika NF- κ B indukowanej przez czynniki uszkadzające DNA (H₂O₂ i TNF- α).



3. Blokując translokację czynnika NF- κ B do jądra komórkowego przez wybiórcze hamowanie aktywności kinazy Akt, powodując podatność komórki na programowaną śmierć (apoptozę).

Agarwal [4] z Center for Cancer Prevention AMC Cancer Research Center w Denver (Kolorado) w badaniach z użyciem linii ludzkiego raka stercza DU145 (niezależnej od androgeny) wykazał, że genisteina działa na sygnał mitogeny przekazywany przez receptor EGF (-erbB1-Shc-ERK1/2) i modulując na regulatory cyklu komórkowego, w szczególności na kinazy zależne od cyklin CDK1s, CDKs, doprowadzając do zahamowania proliferacji i śmierci komórek. Wykazano także aktywację ERK1/2 (pozakomórkowa regulatorowa kinaza białkowa), co sugeruje, że uszkadza aktywację szlaku sygnałowego erbB1-Shc-ERK1/2 w komórkach DU145. Genisteina indukowała ekspresję białek Cip1/p21 i Kip1/p27, a obniżała poziom CDK4 i w mniejszym stopniu CDK2 oraz cyklinę D1 i E [4].

Kyle i współpracownicy [31] potwierdzili działanie przeciwwzrostowe i proapoptyczne genisteiny na komórki raka stercza *in vitro*, zwracając szczególną uwagę na obserwację, że dla komórek przerzutującej linii PC3 zahamowanie wzrostu było niezależne od działania estrogennego genisteiny. Genisteina obniżała żywotność nieadherentnych komórek, co sugerowało brak zależności pomiędzy adhezją i hamowaniem wzrostu. Autorzy zwracają uwagę na różnice molekularne i kinetyczne w działaniu genisteiny na wzrost komórek przylegających i nieprzylegających. Stwierdzono wybiórcze tłumienie aktywności FAK (focal adhesion kinase) poprzedzającej indukcję apoptozy, odpowiedzialnej za zahamowanie wzrostu przylegających komórek [31]. Istnieją również dowody na to, że prewencyjne działanie genisteiny w rakach piersi i gruczołu krokowego wynika z jej zdolności do indukowania i utrzymania „protektynowego” profilu metylacji DNA [17].

GENISTEINA I NOWOTWORY GRUCZOŁU KROKOWEGO

Zhou i współpracownicy [86] uzyskali dodatkowe dowody doświadczalne wyjaśniające protekcyjne działanie bioaktywnych preparatów sojowych. W doświadczeniach *in vitro* i *in vivo* (z zastosowaniem przeszczepionego ortotopowo ludzkiego raka gruczołu krokowego wrażliwego na androgen), autorzy ci wykazali działanie hamujące proliferację, antyangiogenne, a także przeciwnowotworowe zastosowanego preparatu SPC (soy phytochemical concentrate) stosowanego łącznie z zieloną i czarną herbatą. Stosowaniu łącznie preparatu SPC i czarnej herbaty towarzyszyło obniżenie poziomu testosteronu i dihydrotestosteronu [86, 87].

Jednym z możliwych mechanizmów działania genisteiny w przypadku nowotworów gruczołu krokowego, może być także jej działanie antyandrogenne, wykazane po raz pierwszy w komórkowym modelu *in vitro*, w którym genisteina w stopniu zależnym od dawki hamowała wydzielanie PSA [15].

Zdaniem autorów omówionych prac, ich wyniki wykazujące aktywność genisteiny w zastosowanych modelach ra-

ka stercza oraz wyjaśniony na poziomie molekularnym mechanizm działania proapoptycznego, upoważniają do rekomendowania genisteiny jako czynnika chemioprewencyjnego, wykazującego także działanie przeciwnowotworowe. Wykonane na poziomie komórkowym i molekularnym badania nie wyjaśniają w pełni mechanizmu działania genisteiny *in vivo*, na które to działanie prewencyjne wskazują obserwacje epidemiologiczne o niższej umieralności na raka stercza mężczyzn spożywających większe ilości soi, której głównymi pod względem ilościowym składnikami są izoflawoidy (daidzeina i genisteina), w porównaniu z populacją mężczyzn o innym sposobie odżywiania się [34].

Należy brać pod uwagę, że genisteina działając jako estrogen może pobudzać wzrost estrogenozależnych nowotworów. Na brak ochronnego działania genisteiny w przypadku raka piersi wskazują badania opublikowane przez McMichael-Phillipsa i współpracowników [44]. Wpływ uzupełnienia diety białkiem sojowym badano u 48 kobiet z łagodnymi i złośliwymi nowotworami piersi. Pacjentki otrzymały dietę normalną lub wzbogaconą o 60 g soi (w tym 45 mg stanowiły izoflawony) dziennie przez 14 dni. Materiał biopsyjny pobierano z prawidłowej tkanki gruczołu piersiowego, piętnowano znakowaną trytem tymidyną w celu ustalenia liczby komórek w fazie S, wyznaczano indeks znakowania i immunocytochemicznie barwiono w celu wykazania obecności antygenu proliferacji Ki67. Poziom fitoestrogenów, w tym genisteiny oznaczano w surowicy pacjentek przed i po zastosowaniu wzbogacanej diety. Po 14 dniach stosowania takiej diety obserwowano w materiale biopsyjnym od kobiet w okresie przedmenopauzalnym wyraźny wzrost indeksu proliferacji (liczba komórek w fazie S), uwzględniając w ocenie wyników dzień cyklu i wiek pacjentek. Obserwowano także niewielki wzrost ekspresji receptora progesteronowego.

Wnioski autorów pracy są bardzo ostrożne. Uważają, że należy zbadać przedłużone w czasie stosowanie diety wzbogacanej w soję. Jak podają, na podstawie wcześniej wykonanych badań, w których stosowano u kobiet w okresie przedmenopauzalnym dietę wzbogaconą w soję przez cały miesiąc, obserwowano zmiany długości trwania cyklu menstruacyjnego i wzrost stężenia hormonu luteinizującego (LH) oraz stymulującego pęcherzyki (FSH), czyli działanie antyestrogenowe, prawdopodobnie regulowane przez przysadkę [44].

Na uwagę zasługują także badania Rao i współpracowników [58], w których genisteinę podawano doustnie szczurom, u których wywoływano raki jelita grubego iniekcją azoksymetanu (AOM). Szczury, samce szczepu F344, od 5 tygodnia życia otrzymywały dietę zawierającą 200 ppm genisteiny, a od 7 tygodnia życia wstrzykiwano im AOM w dawce 15 mg/kg m.c. jeden raz w tygodniu przez kolejne dwa tygodnie. Wzbogaconą w genisteinę dietę utrzymywano przez kolejne 52 tygodnie. Po tym czasie szczury uśmiercano, badano częstość występowania nowotworów jelita i liczbę zmian nowotworowych w jelicie, a także wykonano badania histologiczne zmian. W niezmienionej ścianie jelita i w zmianach nowotworowych oznaczano poziom aktywności 8-izoprostanu, cyklooksigenazy (COX) i dehydrogenazy 15-hydroksyprostaglandyny F2 α (15-PDGH). Obser-

wowano zahamowanie aktywności 15-PDGH i obniżenie poziomu 8-izoprostanu, co zdaniem autorów wskazuje pośrednio na antyoksydacyjne działanie genisteiny. W badaniu histologicznym jelita stwierdzono wyraźny wzrost częstości występowania nieinwazyjnych zmian nowotworowych w jelicie grubym i sumarycznie wyższą liczbę ognisk raka gruczołowego u szczura w grupie otrzymującej genisteinę. Nie obserwowano natomiast wpływu na częstość występowania gruczolakoraków i liczbę zmian inwazyjnych w jelicie cienkim. Autorzy nie wyjaśniają mechanizmu obserwowanego wzmocnienia przez genisteinę rakotwórczego działania AOM. Rozważają możliwość udziału w tym mechanizmie obniżenia (o 35%) poziomu PGDH, odgrywającego istotną rolę w metabolizmie prostaglandyn - mediatorów uczestniczących w procesie nowotworzenia [58].

Działanie kancerogenne genisteiny wykazano także na modelu myszy podatnych na powstawanie raków macicy po zastosowaniu dietylstilbestrolu (DES). Myszy te eksponowano na estrogeną dawkę DES (0, 001 mg/kg m.c./dzień) lub genisteiny (50 mg/kg m.c./dzień) przez 5 pierwszych dni życia. Po 18 miesiącach gruczolakoraki macicy występowały u 35% zwierząt otrzymujących genisteinę i u 31% otrzymujących DES. Świadczy to o kancerogennym działaniu genisteiny, jeśli stosowana jest w krytycznym okresie różnicowania organizmu [51]. Inni autorzy wykazali natomiast zwiększone występowanie raków sromu u myszy szczepu 129/J [75].

W 1999 roku ukazał się artykuł, w którym autor wyraża kontrowersyjny pogląd, że białaczki występujące u dzieci w Japonii, których matki spożywają duże ilości soi mogą zależeć od obecności genisteiny, która przechodzi przez łożysko. Niemowlęce białaczki, występujące w ciągu pierwszych 12 miesięcy życia, charakteryzują się wysoką liczbą leukocytów i zmianami chromosomalnymi polegającymi na translokacji 11q23, złym rokowaniem, niezależnie od typu proliferujących komórek białaczkowych. Wskazywać to może na powstanie klonów białaczkowych jeszcze przed urodzeniem. Podstawy dla swej hipotezy autor bierze z obserwacji, że hodowane *in vitro* limfocyty pod wpływem genisteiny wykazują zmiany chromosomalne podobne do obserwowanych w białaczkach niemowlęcych. Autor przyznaje, że jego hipotezie przeczą obserwacje hematologów dziecięcych, wskazujące na podstawie danych epidemiologicznych i cytogenetycznych, że występowanie białaczek wieku niemowlęcego nie jest częstsze w Japonii, jak w innych krajach świata [1].

Genisteina znana jest ze swego działania hamującego proliferację i inwazyjność *in vitro* komórek ludzkich i mysich linii pochodzących z raka piersi [26,63,64,69], jednakże efekt ten jest osiągnięty tylko w dawkach 10–100 μ M. W niższych dawkach genisteina działa jako czynnik wzmagający proliferację komórek nowotworów estrogenozależnych [26]. Schwarz i współpr. [64] wykazali, że genisteina stosowana w badaniach *in vitro* w stężeniach poniżej 1 μ M (stężenia w zakresie 0,01–1,0 μ M - są stężeniami porównywalnymi do fizjologicznych stężeń w surowicy krwi ludzi spożywających dietę sojową) może odwrócić działanie tamoksyfenu, który obniża ekspresję receptora estrogenowego [64]. Istnieją również doniesienia na te-

mat estrogennego działania genisteiny *in vivo* u myszy bezgranicznych, którym operacyjnie usunięto jajniki. Zwierzętom tym przeszczepiano s.c. komórki ludzkiego raka piersi linii MCF-7. U myszy karmionych paszą wzbogacaną w genisteinę obserwowano przyspieszenie wzrostu nowotworu oraz zwiększenie masy macicy, podobnie jak u zwierząt, które otrzymywały w paszy estradiol [26]. Z kolei Santell i współpr. [61] nie wykazali wpływu genisteiny na rozwój przeszczepialnego ludzkiego raka piersi linii MDA-MB-231 niezależnej od estrogenów. Autorzy sugerują, że stosowanie genisteiny w pożywieniu nie doprowadza do osiągnięcia takiego jej poziomu w surowicy krwi, który hamowałby proliferację komórek nowotworowych, jak to się dzieje w warunkach *in vitro* [61].

W modelu przeszczepialnego raka sutka 16/C, w badaniach własnych wykazano działanie stymulujące genisteiny na rozwój tego nowotworu *in vivo*. Stymulacja wzrostu guza po ortotopowym przeszczepie komórek nowotworowych wynosiła 40% w stosunku do grupy kontrolnej (w 24 dniu eksperymentu). Podobną tendencję (stymulowanie wzrostu) zaobserwowano w modelu raka okrężnicy C38 (dane niepublikowane).

Lamartiniere i współpr. [33] wskazują, że genisteina może działać chemioprewencyjnie, tak jak i inni agonści estrogenów poprzez wzmocnienie różnicowania komórek gruczołu sutkowego, co czyni go mniej podatnym na kancerogenne działanie związków chemicznych [32,33]. Wydaje się to paradoksalne, ponieważ opisano stymulację wzrostu estrogenozależnych nowotworów pod wpływem estrogenów [23]. Prawdopodobnie, krytyczny dla wyników działania jest czas i schemat podawania estrogenów. Jeśli estrogen lub jego agonista jest podawany przed osiągnięciem dojrzałości gruczołu mlecznego i przed ekspozycją na karcynogen, liczba indukowanych guzów jest mniejsza. Jednakże, jeśli estrogen będzie podany zwierzętom już po rozwinięciu się estrogenozależnego nowotworu – wzrost tego nowotworu może być stymulowany [26].

PODSUMOWANIE

Podsumowując omówione wyniki opublikowanych prac podkreślić należy poznane miejsca działania i mechanizmy, które mogą tłumaczyć aktywność genisteiny rozważanej jako potencjalny czynnik prewencyjny i przeciwnowotworowy:

- hamowanie proliferacji komórek nowotworowych *in vitro* i ich wzrostu w postaci guzów nowotworowych po przeszczepieniu odpowiednim zwierzętom doświadczalnym (hamowanie wzrostu inwazyjnego i procesu przerzutowania) [8,11,45,69,80,84,87],
- działanie ochronne genisteiny przed indukcją nowotworów *in vivo* czynnikami rakotwórczymi [74,78],
- działanie hamujące na funkcję białek zaangażowanych w prawidłowy przebieg cyklu komórkowego i blokujących fazy cyklu komórkowego [76,77],
- hamowanie transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych [28],
- blokowanie translokacji czynnika NF- κ B do jądra komórkowego poprzez specyficzne hamowanie aktywności kinazy Akt, powodujące podatność komórki na programowaną śmierć (apoptozę) [22,35],



- indukowanie i utrzymywanie „protekcynowego“ profilu metylacji DNA, zapobiegającego karcynogenezie gruczołu sutkowego i krokowego [17],
- indukowanie różnicowania się komórek i interferowanie w proces apoptozy [8,29],
- swoiste hamowanie autofosforylacji receptora EGF, którego ekspresja jest podwyższona w komórkach wielu nowotworów [43],
- hamowanie syntezy c-fos i c-jun – czynników transkrypcyjnych DNA [37],
- hamowanie topoizomerazy DNA [12],
- hamowanie angiogenezy i wytwarzania czynników proangiogennych [36,82,85],
- działanie antyoksydacyjne – reaktywne związki tlenowe mogą inicjować transdukcję sygnału przez kinazę MAP [57].

Peeters i współpr. [54] krytycznie ocenili dane epidemiologiczne wskazujące na ochronne działanie soi i jej produktów zawartych w diecie, obniżające ryzyko zachorowania na raka piersi. W swej ocenie uwzględnili dane pochodzące z 18 prac, z których w 13 analizowano zależność pomiędzy indywidualnym spożyciem produktów sojowych i ryzykiem zachorowania na raka piersi. W ocenie autorów nie wykazano efektu protekcynowego diety bogatosojowej. Jedynie w 4 spośród tych badań wykazano

zmniejszenie ryzyka wystąpienia raka piersi, ale bez statystycznej istotności. Również prospektywne badania wykonane u Holenderek (w okresie postmenopauzalnym), w których występował wysoki poziom izoflawonoidów wydalanych z moczem, nie wykazały wyraźnego obniżenia ryzyka zachorowania na raka piersi. Mimo podkreślanego braku efektu protekcynowego przyjmowanych fitoestrogenów, autorzy zwracają jednak uwagę na to, że w badaniach prospektywnych nie uwzględniano czynnika wieku pacjentek, czy okresu życia, w którym spożywano produkty sojowe, co zdaniem autorów, ma znaczenie w badaniach epidemiologicznych. Innym, nieuwzględnianym dotąd w badaniach epidemiologicznych czynnikiem jest rola ekwołu, metabolitu zawartych w diecie izoflawonów (produkt działania bakterii jelitowych). Jak wykazali Setchell i współpr. [67], maksymalny efekt kliniczny obserwowany był u osobników określonych jako dobrzy producenci ekwołu („good equol producers”), w odpowiedzi na dietę zawierającą białka sojowe [67].

Wydaje się, że polecane stosowanie genisteiny może być rozważane w programie prewencji pierwotnej u osób o podwyższonym ryzyku zachorowania oraz prewencji wtórnej, zapobiegającej wznowie procesu nowotworowego czy też rozsiewowi przerzutów nowotworowych [6].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abe T.: Infantile leukemia and soybeans – a hypothesis. *Leukemia*, 1999; 13: 317-320
- [2] Adlercreutz H., Markkanen H., Watanabe S.: Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet*, 1993; 342: 1209-1210
- [3] Alhasan S.A., Aranha O., Sarkar F.H.: Genistein elicits pleiotropic molecular effects on head and neck cancer cell. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 4174-4181
- [4] Agarwal R.: Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60: 1051-1059
- [5] Barnes S.: Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *J Nutr.*, 1995; 125: 777S-783S
- [6] Barnes S.: Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1998; 217: 386-392
- [7] Bingham S.A., Atkinson C., Liggins J., Bluck L., Coward A.: Phytoestrogens: where are we now? *Br. J. Nutr.*, 1998; 79: 393-406
- [8] Booth C., Hargreaves D.F., Hadfield J.A., McGown A.T., Potten C.S.: Isoflavones inhibit intestinal epithelial cell proliferation and induce apoptosis *in vitro*. *Br. J. Cancer.*, 1999; 80: 1550-1557
- [9] Booth C., Hargreaves D.F., O’Shea J.A., Potten C.S.: *In vivo* administration of genistein has no effect on small intestinal epithelial proliferation and apoptosis, but a modest effect on clonogen survival. *Cancer Lett.*, 1999; 144: 169-175
- [10] Bouker K.B., Hilakivi-Clarke L.: Genistein: does it prevent or promote breast cancer? *Environ. Health. Perspect.*, 2000; 108: 701-708
- [11] Chen W.F., Huang M.H., Tzang C.H., Yang M., Wong M.S.: Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2003; 1638: 187-196
- [12] Constantinou A., Kiguchi K., Huberman E.: Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res.*, 1990; 50: 2618-2624
- [13] Davis J.N., Singh B., Bhuiyan M., Sarkar F.H.: Genistein-induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Nutr. Cancer.*, 1998; 32: 123-131
- [14] Davis J.N., Kucuk O., Sarkar F.H.: Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutr. Cancer.*, 1999; 35: 167-174
- [15] Davis J.N., Kucuk O., Sarkar F.H.: Expression of prostate-specific antigen is transcriptionally regulated by genistein in prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.*, 2002; 34: 91-101
- [16] Day A.J., Canada F.J., Diaz J.C., Kroon P.A., Mclauchlan R., Faulds C.B., Plumb G.W., Morgan M.R.A., Williamson G.: Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.*, 2000; 468: 166-170
- [17] Day J.K., Bauer A.M., DesBordes C., Zhuang Y., Kim B.E., Newton L.G., Nehra V., Forsee K.M., MacDonald R.S., Besch-Williford C., Huang T.H., Lubahn D.B.: Genistein alters methylation patterns in mice. *J. Nutr.*, 2002; 132(8 Suppl): 2419S-2423S
- [18] El-Zarruk A.A., van den Berg H.W.: The anti-proliferative effects of tyrosine kinase inhibitors towards tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant human breast cancer cell lines in relation to the expression of epidermal growth factor receptors (EGF-R) and the inhibition of EGF-R tyrosine kinase. *Cancer Lett.*, 1999; 142: 185-193
- [19] Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., Breit S., Rasku S., Adlercreutz H., Wahala K., Montesano R., Schweigerer L.: Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer Res.*, 1997; 57: 2916-2921
- [20] Friedman M., Brandon D.L.: Nutritional and health benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 2001; 49: 1069-1086
- [21] Giri A.K., Lu L.J.: Genetic damage and the inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a]anthracene-induced genetic damage by the phytoestrogens, genistein and daidzein, in female ICR mice. *Cancer Lett.*, 1995; 95: 125-133
- [22] Gong L., Li Y., Nedeljkovic-Kurepa A., Sarkar F.H.: Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene*, 2003; 22: 4702-4709
- [23] Henderson B.E., Ross R., Bernstein L.: Estrogen as a cause of human cancer. *Cancer Res.*, 1988; 48: 246-253
- [24] Honma Y., Okabe-Kado J., Kasukabe T., Hozumi M., Umezawa K.: Inhibition of abl oncogene tyrosine kinase induces erythroid differentiation of human myelogenous leukemia K562 cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1990; 81: 1132-1136
- [25] Horn-Ross P.L., Hoggat K.J., Lee M.M.: Phytoestrogens and thyroid cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002; 11: 43-49

- [26] Hsieh C.-Y., Santell R.C., Haslam S.Z., Helferich W.G.: Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res.*, 1998; 58: 3833-3838
- [27] Kiguchi K., Constantinou A.I., Huberman E.: Genistein-induced cell differentiation and protein-linked DNA strand breakage in human melanoma cells. *Cancer Commun.*, 1990; 2: 271-277
- [28] Kim H., Peterson T.G., Barnes S.: Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signalling pathways. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 68(6 Suppl): 1418S-1425S
- [29] Kondo K., Tsuneizumi K., Watanabe T., Oishi M.: Induction of *in vitro* differentiation of mouse embryonal carcinoma (F9) cells by inhibitors of topoisomerases. *Cancer Res.*, 1991; 51: 5398-5404
- [30] Kulling S.E., Honig D.M., Simat T.J., Metzler M.: Oxidative *in vitro* metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J. Agric. Food. Chem.*, 2000; 48: 4963-4972
- [31] Kyle E., Neckers L., Takimoto C., Curt G., Bergan R.: Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase activity. *Mol. Pharmacol.*, 1997; 51: 193-200
- [32] Lamartiniere C.A.: Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71(6 Suppl): 1705S-1707S
- [33] Lamartiniere C.A., Zhang J.-X., Cotroneo M.S.: Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 68(Suppl): 1400S-1405S
- [34] Lee M.M., Gomez S.L., Chang J.S., Wey M., Wang R.T., Hsing A.W.: Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in china. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 665-668
- [35] Li Y., Sarkar F.H.: Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 2369-2377
- [36] Li Y., Sarkar F.H.: Down-regulation of invasion and angiogenesis-related genes identified by cDNA microarray analysis of PC3 prostate cancer cells treated with genistein. *Cancer Lett.*, 2002; 186: 157-164
- [37] Liu X.J., Yang L., Mao Y.Q., Wang Q., Huang M.H., Wang Y.P., Wu H.B.: Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J. Gastroenterol.*, 2002; 8: 739-745
- [38] Lyn-Cook B.D., Stottman H.L., Yan Y., Blann E., Kadlubar F.F., Hammons G.J.: The effects of phytoestrogens on human pancreatic tumor cells *in vitro*. *Cancer Lett.*, 1999; 142: 111-119
- [39] Makishima M., Honma Y., Hozumi M., Sampi K., Hattori M., Umezawa K., Motoyoshi K.: Effects of inhibitors of protein tyrosine kinase activity and/or phosphatidylinositol turnover on differentiation of some human myelomonocytic leukemia cells. *Leuk. Res.*, 1991; 15: 701-708
- [40] Makishima M., Honma Y., Hozumi M., Nagata N., Motoyoshi K.: Differentiation of human monoblastic leukemia U937 cells induced by inhibitors of myosin light chain kinase and prevention of differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1993; 1176: 245-249
- [41] Martin P.M., Horwitz K.B., Ryan D.S., McGuire W.L.: Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology.*, 1978; 103: 1860-1867
- [42] Matsukawa Y., Marui N., Sakai T., Satomi Y., Yoshida M., Matsumoto K., Nishino H., Aoike A.: Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1328-1231
- [43] McIntyre B.S., Sylvester P.W.: Genistein and erbstatin inhibition of normal mammary epithelial cell proliferation is associated with EGF-receptor down-regulation. *Cell Prolif.*, 1998; 31: 35-46
- [44] McMichael-Phillips D.F., Harding C., Morton M., Roberts S.A., Howell A., Potten C.S., Bundred N.J.: Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 68(6 Suppl): 1431S-1435S
- [45] Menon L.G., Kuttan R., Nair M.G., Chang Y.-C., Kuttan G.: Effect of isoflavones genistein and daidzein in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F-10 melanoma cells. *Nutr. Cancer*, 1998; 30: 74-77
- [46] Messina M., Barnes S.: The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1991; 83: 541-546
- [47] Messina M.J., Persky V., Setchell K.D.R., Barnes S.: Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer*, 1994; 21: 113-131
- [48] Mousavi Y., Adlercreutz H.: Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, 1993; 58: 301-304
- [49] Nagata C., Takatsuka N., Kawakami N., Shimizu H.: A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. *Br. J. Cancer*, 2002; 87: 31-36
- [50] Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y.: Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. *JAOAC Int.*, 2000; 83: 635-650
- [51] Newbold R.R., Banks E.P., Bullock B., Jefferson W.N.: Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4325-4328
- [52] Okura A., Arakawa H., Oka H., Yoshinari T., Monden Y.: Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988; 157: 183-89
- [53] Paganga G., Rice-Evans C.A.: The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.*, 1997; 401: 78-82
- [54] Peeters P.H., Keinan-Boker L., van der Schouw Y.T., Grobbee D.E.L.: Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003; 77: 171-183
- [55] Peterson G., Barnes S.: Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991; 179: 661-667
- [56] Pollard M., Luckert P.H.: Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induced prostate-related cancers in L-W rats. *Nutr. Cancer.*, 1997; 28: 41-45
- [57] Pool-Zobel B.L., Adlercreutz H., Glei M., Liegibel U.M., Sittlington J., Rowland I., Wahala K., Reckemmer G.: Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis.*, 2000; 21: 1247-1252
- [58] Rao C.V., Wang C.X., Simi B., Lubet R., Kelloff G., Steele V., Reddy B.S.: Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res.*, 1997; 57: 3717-3722
- [59] Record I.R., Broadbent J.L., King R.A., Dreosti I.E., Head R.J., Tonkin A.L.: Genistein inhibits growth of B16 melanoma cells *in vivo* and *in vitro* and promotes differentiation *in vitro*. *Int. J. Cancer*, 1997; 72: 860-864
- [60] Rowland I., Faughnan M., Hoey L., Wahala K., Williamson G., Cassidy A.: Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br. J. Nutr.*, 2003; 89(Suppl 1): 838-852
- [61] Santell R.C., Kieu N., Helferich W.G.: Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. *J. Nutr.*, 2000; 130: 1665-1669
- [62] Sarkar F.H., Li Y.: Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.*, 2002; 21: 265-280
- [63] Scholar E.M., Toews M.L.: Inhibition of invasion of murine mammary carcinoma cells by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Cancer Lett.*, 1994; 87: 159-162
- [64] Schwarz J.A., Liu G., Brooks S.C.: Genistein-mediated attenuation of tamoxifen-induced antagonism from estrogen receptor-regulated genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 253: 38-43
- [65] Setchell K.D., Brown N.M., Desai P., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashear W.T., Kirschner A.S., Cassidy A., Heubi J.E.: Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.*, 2001; 131(Suppl 4): 1362S-1375S
- [66] Setchell K.D., Brown N.M., Zimmer-Nechemias L., Brashear W.T., Wolfe B.E., Kirschner A.S., Heubi J.E.: Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002; 76: 447-453
- [67] Setchell K.D., Brown N.M., Lydeking-Olsen E.: The clinical importance of the metabolite equol - a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.*, 2002; 132: 3577-3584
- [68] Song T., Barua K., Buseman G., Murphy P.A.: Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 68(Suppl 6): 1474S-1479S



- [69] Shao Z.M., Wu J., Shen Z.Z., Barsky S.H.: Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, 1998; 58: 4851-4857
- [70] Shao Z.M., Wu J., Shen Z.Z., Barsky S.H.: Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res.*, 1998; 18: 1435-1439
- [71] Shao Z.M., Alpaugh M.L., Fontana J.A., Barsky S.H.: Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J. Cell Biochem.*, 1998; 69: 44-54
- [72] Shao Z.M., Shen Z.Z., Fontana J.A., Barsky S.H.: Genistein's 'ER-dependent and independent' actions are mediated through ER pathways in ER-positive breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 2409-2416
- [73] Sorensen I.K., Kristiansen E., Mortensen A., Nicolaisen G.M., Wijnands J.A., van Kranen H.J., van Kreijl C.F.: The effect of soy isoflavones on the development of intestinal neoplasia in ApcMin mouse. *Cancer Lett.*, 1998; 130: 217-225
- [74] Thiagarajan D.G., Bennink M.R., Bourquin L.D., Kavas F.A.: Prevention of precancerous colonic lesions in rats by soy flakes, soy flour, genistein, and calcium. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 68(Suppl 6): 1394S-1399S
- [75] Thigpen J.E., Locklear J., Haseman J.K., Saunders H., Grant M.F., Forsythe D.B.: Effects of the dietary phytoestrogens daidzein and genistein on the incidence of vulvar carcinomas in 129/J mice. *Cancer Detect. Prev.*, 2001; 25: 527-532
- [76] Traganos F., Ardeli B., Halko N., Bruno S., Darzynkiewicz Z.: Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res.*, 1992; 52: 6200-6208
- [77] Wang H.Z., Zhang Y., Xie L.P., Yu X.Y., Zhang R.Q.: Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells(1). *J. Nutr. Biochem.*, 2002; 13: 421-426
- [78] Wei H., Bowen R., Zhang X., Lebowitz M.: Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis.*, 1998; 19: 1509-1514
- [79] Wei H., Wei L., Frenkel K., Bowen R., Barnes S.: Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer.*, 1993; 20: 1-12
- [80] Wietrzyk J., Opolski A., Madej J., Radzikowski C.: Antitumor and antimetastatic effect of genistein alone or combined with cyclophosphamide in mice transplanted with various tumours depends on the route of tumour transplantation. *In Vivo*, 2000; 14: 357-362
- [81] Wietrzyk J., Opolski A., Madej J., Radzikowski C.: The antitumor effect of postoperative treatment with genistein alone or combined with cyclophosphamide in mice bearing transplantable tumors. *Acta Pol. Pharm.*, 2000; 57(Suppl 1): 5-8
- [82] Wietrzyk J., Boratyński J., Gryniewicz G., Ryczyński A., Radzikowski C., Opolski A.: Antiangiogenic and antitumor effects *in vivo* of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 3893-3896
- [83] Yan C., Han R.: Genistein suppresses adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation and invasion of B16-BL6 melanoma cells. *Cancer Lett.*, 1998; 129: 117-124
- [84] Yanagihara K., Ito A., Toge T., Numoto M.: Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5815-5821
- [85] Zhou J.-R., Mukherjee P., Gugger E.T., Tanaka T., Blackburn G.L., Clinton S.K.: Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Res.*, 1998; 58: 5231-5238
- [86] Zhou J.R., Yu L., Zhong Y., Blackburn G.L.: Soy phytochemicals and tea bioactive components synergistically inhibit androgen-sensitive human prostate tumors in mice. *J. Nutr.*, 2003; 133: 516-521
- [87] Zhou J.R., Yu L., Zhong Y., Nassr R.L., Franke A.A., Gaston S.M., Blackburn G.L.: Inhibition of orthotopic growth and metastasis of androgen-sensitive human prostate tumors in mice by bioactive soybean components. *Prostate*, 2002; 53: 143-153

