

ANTIMUTAGENNÍ A IMUNOMODULAČNÍ ÚČINKY SULFORAFANU A INDOL-3-KARBINOLU

L. Mandelová, O. Zendulka, J. Totušek
ÚPL LF MU v Brně

Úvod

Je známo, že výživa a životní styl, vedle genetických faktorů, hrají klíčovou roli v etiologii nádorového onemocnění. Exogenní faktory vzniku malignit značně převyšují endogenní a mohou se spolupodílet až na vzniku 90 % nádorů. Mnoho epidemiologických studií naznačuje, že zvýšená konzumace ovoce a zeleniny, zvláště brukvovité (brokolice, zelí, kapusta, květák, růžičková kapusta) je spojována s redukcí výskytu nádorového onemocnění (1,2).

Brukvovitá zelenina je bohatým zdrojem glukosinolátů, skupiny látek sekundárního metabolismu rostlin. Glukosinoláty, ale nejsou přímo spojovány s antikarcinogenními vlastnostmi. Pokud je však rostlina krájena, žvýkána či macerována, dochází k uvolnění rostlinného enzymu myrosinázy, která katalyzuje rozpad glukosinolátů na isothiokyanáty, indoly a nitrily. Jsou to právě isothiokyanáty, které jsou nejčastěji spojovány s antikarcinogenní aktivitou brukvovité zeleniny (3).

Výzkumy brukvovité zeleniny potvrzují výskyt čtyř hlavních glukosinolátů: glukobrassicin, glukorafanin, sinigrin a progoitrin (3). V posledních letech se výzkumy zaměřují především na sloučeninu s označením 4-methylsulfinylbutylisothiokyanát – sulforafan. Jeho prekurzorem je glukosinolát glukorafanin. Nejvíce je zastoupen v brokolici, ředkvi a ředkvičce. Další látky poutající pozornost vědců jsou rozkladné produkty indolových glukosinolátů, které se nachází ve většině běžně konzumovaných druhů zeleniny a tvoří podstatný podíl ze všech zastoupených glukosinolátů. Jedním z nejvýznamnějších je 3-indolylmethyl – indol-3-karbinol. Jeho prekurzorem je glukosinolát glukobrassicin.

Náš experiment se soustředí právě na tyto dvě vybrané látky ze skupiny glukosinolátů a na jejich antimutagenní a imunomodulační účinky.

Materiál a metodika

Chemikálie

Jako modelové mutageny byly použity 2-amino-3-methyl-3H-imidazo-(4,5-f)-quinoline (firma MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA) a N-nitroso-N-methylurea (firma Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, ČR).

D,L-Sulforafan byl zakoupen u firmy MP Biomedicals, LLC (Ohio, USA), indol-3-karbinol, fetální bovinní sérum, luminol a zymosan byly nakoupeny od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha, ČR).

Experimentální zvířata

Pokus byl prováděn na 7 - 10 týdnů starých samcích BALB C myši, o hmotnosti 18 - 20 g, získaných z chovného a dodavatelského zařízení LF MU (Brno, ČR). Zvířata byla udržována za standardních laboratorních podmínek při 12ti hodinovém cyklu světlo/tma, při teplotě 22 ± 2 °C. Zvířata byla krmena kompletní laboratorní směsí pro laboratorní myši a potkany v SPF chovech, voda byla podávána *ad libidum*. Zvířata byla jeden týden před experimentem ponechána v klidu pro aklimatizaci.

Aplikace testovaných substancí

Pokus byl rozdělen do třech fází. V první a druhé fázi jsme testovali indol-3-karbinol (I3K) v dávce 250 a 125 mg.kg⁻¹, ve třetí fázi sulforafan 3 μmol na myš. Zvířata byla rozdělena do 6 skupin po 7 myších v 1. a 2. fázi a po 5 myších ve 3. fázi. Testované substance (I3K, sulforafan) byly aplikovány první až třetí skupině myši po dobu 3 dnů v objemu 0,1ml/10g hmotnosti myši. Třetí den byl druhé a čtvrté skupině podán jednorázově, jednu hodinu po aplikaci testovaných substancí, mutagen 2-amino-3-methyl-3H-imidazo-(4,5-f)-chinolin (IQ) v dávce 20 mg.kg⁻¹. Třetí a páté skupině byl ve stejný čas podán mutagen N-nitroso-N-methylurea (MNU) v dávce 50 mg.kg⁻¹. Šestá kontrolní skupině byl aplikován 7 % dimethylsulfoxid (DMSO), který byl používán pro rozpouštění mutagenu a testovaných substancí. Všechny podávané substance byly aplikovány *per os* sondou v objemu 0,1ml/10g hmotnosti myši.

Mikronukleus test in vivo

In vivo mikronukleus test je metoda určená pro detekci chemikálií s klastogenním účinkem (schopnost vyvolávat chromozomální zlomy). Zvýšený počet mikrojader v polychromatických erytrocytech indikuje ve srovnání s kontrolní skupinou, že testovaná chemikálie vyvolává poškození chromozomů v erytrocytech kostní dřeně (4).

Chemiluminiscenční test

Chemiluminometrické měření umožňuje stanovit fagocytární aktivitu leukocytů u myši. Fagocytóza se podílí na odstraňování cizorodých struktur antigenů zevního i vnitřního prostředí. Během fagocytózy cizorodého materiálu dochází k aktivaci fagocytujících buněk tzv. respiračnímu vzplanutí. Jde o řadu biochemických reakcí při nichž jsou produkovány volné kyslíkové radikály (O₂, H₂O₂, OH). Vznik produktů nebo meziproduktů takových oxidačních reakcí v elektronově excitovaném stavu je provázen vyzařováním energie ve formě světelných kvant => vznik viditelného světla. Tento jev se nazývá chemiluminiscence. Tvorba volných kyslíkových radikálů je důležitá ve vztahu k zánětlivým a nádorovým nemocem, ale také v procesu stárnutí.

Statistické zpracování dat

Pro statistickou analýzu byl použit program Statistika 7a statistický balík STATGRAPHICS 5.0.

Výsledky

Mikronukleus test

Jak je vidět z tab. 1 a 2, I3K podávaný *per os* sondou redukuje počty mikrojader v II. (3 x I3K 125 nebo 250 mg.kg⁻¹, 1 x IQ 20 mg.kg⁻¹) a III. (3 x I3K 125 nebo 250 mg.kg⁻¹, 1 x MNU 50 mg.kg⁻¹) skupině ve srovnání s pozitivními kontrolami, kterým byly podávány pouze samotné mutageny (IV. sk. 1 x IQ 20 mg.kg⁻¹ a V. sk. MNU 50 mg.kg⁻¹). Počty mikrojader se statisticky významně nelišily u I. skupiny, které sloužila jako negativní kontrola a které byl aplikován pouze I3K (3 x 250 nebo 125 mg.kg⁻¹), ve srovnání se VI. skupinou, která sloužila také jako negativní kontrola (7 % DMSO). V IV. a V. skupině, které byl podán pouze jednorázově mutagen (IQ, MNU) byl statisticky vyznaný rozdíl ve srovnání se VI. skupinou (7% DMSO). Výsledky byly prokázány na hladině významnosti $p < 0,05$ (tab.1 a 2).

Srovnání výsledků použitých dávek I3K (250 a 125 mg.kg⁻¹) nebylo statisticky významné.

Sulforafan také inhiboval počty mikrojader ve II. (3 x sulforafan 3 μmol, 1 x IQ 20 mg.kg⁻¹) a III. (3 x sulforafan 3 μmol, 1 x MNU 50 mg.kg⁻¹) skupině ve srovnání

s pozitivními kontrolami (IV. sk. 1 x IQ 20 mg.kg⁻¹ a V. sk. MNU 50 mg.kg⁻¹). Počty mikrojader se statisticky významně nelišily u I. skupiny, které sloužila jako negativní kontrola a které byl aplikován pouze sulforafan (3 x 3 µmol), ve srovnání se VI. skupinou, která sloužila také jako negativní kontrola (7 % DMSO) (tab. 3).

Tab. 1: Vliv I3K (250 mg.kg⁻¹) na mutagenitu IQ a MNU v mikronukleus testu

Skupina	Aplikované látky	Mean MNPCE ± SD
I.	I3K (3 x 250 mg.kg ⁻¹)	2,00 ± 1,29
II.	I3K (3 x 250 mg.kg ⁻¹) + IQ (1 x 20 mg.kg ⁻¹)	3,86 ± 0,69*
III.	I3K (3 x 250 mg.kg ⁻¹) + MNU (1 x 50 mg.kg ⁻¹)	11,14 ± 0,90*
IV.	IQ (1 x 20 mg.kg ⁻¹)	8,14 ± 0,90**
V.	MNU (1 x 50 mg.kg ⁻¹)	19,14 ± 1,57**
VI.	7 % DMSO	2,43 ± 1,27

Tab. 2: Vliv I3K (125 mg.kg⁻¹) na mutagenitu IQ a MNU v mikronukleus testu

Skupina	Aplikované látky	Mean MNPCE ± SD
I.	I3K (3 x 125 mg.kg ⁻¹)	2,14 ± 0,90
II.	I3K (3 x 125 mg.kg ⁻¹) + IQ (1 x 20 mg.kg ⁻¹)	4,14 ± 1,22*
III.	I3K (3 x 125 mg.kg ⁻¹) + MNU (1 x 50 mg.kg ⁻¹)	11,71 ± 1,70*
IV.	IQ (1 x 20 mg.kg ⁻¹)	7,86 ± 0,70**
V.	MNU (1 x 50 mg.kg ⁻¹)	19,43 ± 1,51**
VI.	7 % DMSO	2,29 ± 0,76

I3K aplikovaný po dobu tří dnů v dávkách 250 a 125 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti a sulforafan (3 µmol) statisticky významně ($p < 0,05$) inhiboval tvorbu mikrojader vyvolanou aplikací mutagenů. Dosažené výsledky tak prokazují supresivní úlohu I3K a sulforafanu na účinek aplikovaných mutagenů.

Tab. 3: Vliv sulforafanu (3 µmol) na mutagenitu IQ a MNU v mikronukleus testu

Skupina	Aplikované látky	Mean MNPCE ± SD
I.	Sulforafan (3 x 3 µmol)	2,00 ± 1,23
II.	Sulforafan (3 x 3 µmol) + IQ (1 x 20 mg.kg ⁻¹)	3,60 ± 1,52*
III.	Sulforafan (3 x 3 µmol) + MNU (1 x 50 mg.kg ⁻¹)	12,80 ± 2,17*
IV.	IQ (1 x 20 mg.kg ⁻¹)	7,00 ± 0,71**
V.	MNU (1 x 50 mg.kg ⁻¹)	21,60 ± 2,30**
VI.	7 % DMSO	2,60 ± 0,89

MNPCE – počet mikrojader v polychromatických erytrocytech

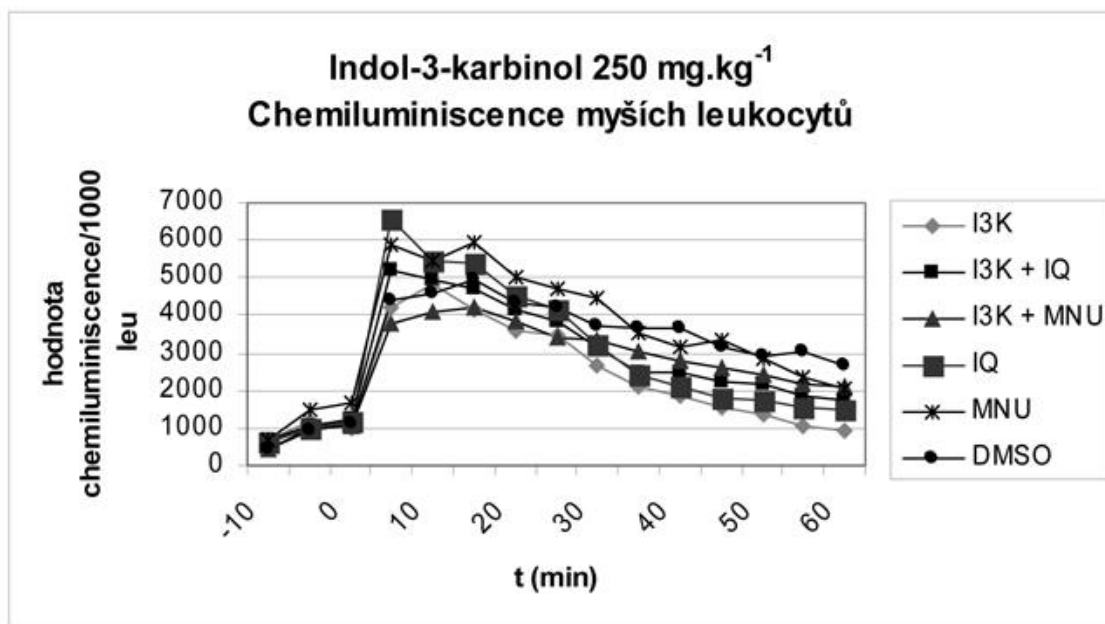
* $p < 0,05$ – signifikantně nižší počet mikrojader ve vztahu k IQ a MNU

** $p < 0,05$ – signifikantně vyšší počet mikrojader ve vztahu ke kontrole (7% DMSO)

Chemiluminiscenční test

Aplikace I3K v dávce 250 mg.kg⁻¹ vedla ke statisticky významnému snížení chemiluminiscence, což je spojeno se sníženou tvorbou volných kyslíkových radikálů ($p < 0,05$) ve srovnání s negativní kontrolou (7 % DMSO). Aplikace MNU naopak statisticky významně zvyšuje tvorbu ROS ve srovnání I3K. Tento výsledek může naznačovat zvýšenou obranu organismu, ale na druhé straně zvýšené riziko poškození tkání. Ve sledované skupině (kombinace I3K 250 mg/kg + MNU) došlo ke statisticky významnému snížení chemiluminiscence ve srovnání se samotným mutagenem (MNU).

Vliv I3K (250 mg.kg^{-1}) na hodnoty chemiluminiscence znázorňuje obr.1. Výsledky napovídají, že sice samotná aplikace mutagenů zvyšuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species, ale po aplikaci I3K v dávce 250 mg.kg^{-1} dochází ke snížení této tvorby.



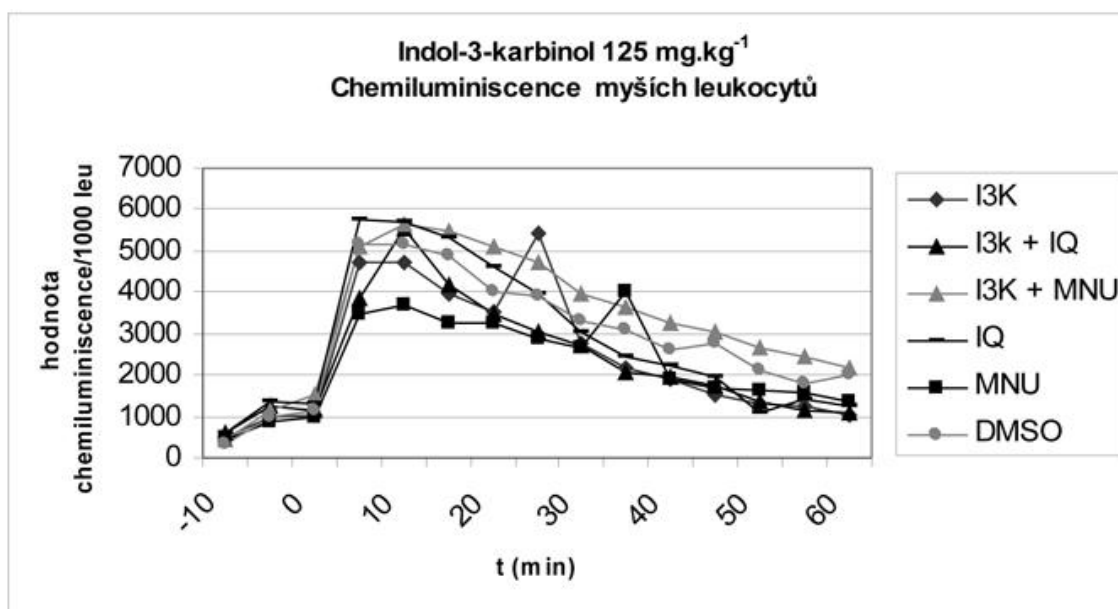
Obr.1: Chemiluminiscence myších leukocytů: Indol-3-karbinol 250 mg.kg^{-1}

Aplikace indol-3-karbinolu v poloviční dávce (125 mg.kg^{-1}) nevedla k signifikantnímu rozdílu ve vztahu k mutagenu IQ. Sledovaná skupina (kombinace I3K 125 mg.kg^{-1} + MNU) vykazovala statisticky významné zvýšení ve vztahu k pozitivní kontrole (MNU). Pozitivní skupina (MNU) vykazovala snížení tvorby ROS ve vztahu k negativní kontrole ($p < 0,05$).

I3K samotný tedy snižuje tvorbu ROS pouze ve vyšší z použitých koncentrací oproti nižší koncentraci, ve které nebyly statisticky významné rozdíly. Ve sledovaných skupinách vyšší koncentrace I3K vedla k omezení tvorby ROS ve vztahu k MNU, ale nižší použitá koncentrace vedla ke zvýšení tvorby ROS ($p < 0,05$). Vliv I3K v dávce 125 mg.kg^{-1} znázorňuje obr. 2.

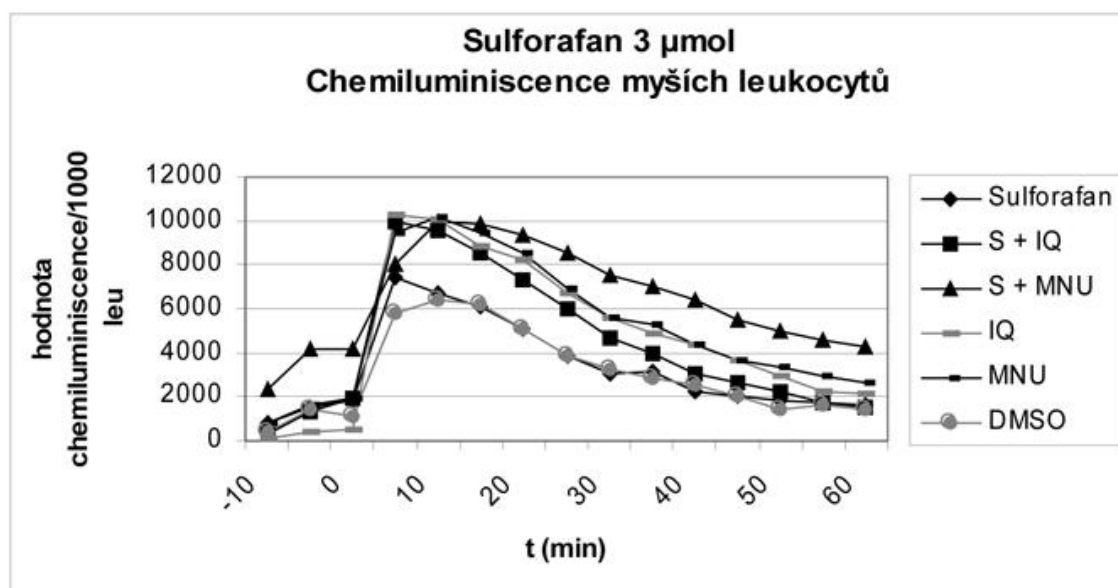
Výsledky chemiluminiscenčního testu (viz obr. 3) naznačují, že aplikace sulforafanu nevedla ke změně chemiluminiscenční křivky ve vztahu k negativní kontrole (7 % DMSO). Sledované skupiny i samotná aplikace mutagenů vedla ke statisticky významnému zvýšení chemiluminiscenční křivky a tedy ke tvorbě ROS ($p < 0,05$). Aplikace sulforafanu s mutageny nevedla ke statisticky významnému snížení této tvorby. Naopak u sledované skupiny (S + MNU) se objevilo statisticky významné zvýšení fagocytární aktivity ve vztahu k samotnému mutagenu (MNU).

Sulforafan tedy pravděpodobně v kombinaci s použitými mutageny nesnižuje oxidační poškození myších leukocytů a nebyl shledán účinným přímým antioxidantem.



Obr. 2: Chemiluminiscence myších leukocytů: Indol-3-karbinol 125 mg.kg⁻¹

Nicméně rozkladné produkty glukosinolátů nejsou známy jako přímo působící antioxidanty, ale jsou silnými induktory antioxidačních enzymů, především chinon reduktázy a glutathion-S-transferázy, které jsou spojeny s jejich antikarcinogenními a antioxidačními vlastnostmi.



Obr. 3: Chemiluminiscence myších leukocytů: Sulforafan 3 μmol

Diskuse

Brukvovitá zelenina a její aktivní sloučeniny, vzniklé z glukosinolátů obsažených v zelenině této čeledi, jsou široce studovány v experimentálních *in vitro* a *in vivo* modelech.

V minulosti si vysloužil velkou pozornost sulforafan jako možná chemopreventivní látka a jeden z nejmocnějších isothiokyanátů přítomných v brukvovité zelenině. Existuje několik studií potvrzujících antimutagenní a antiklastogenní účinky sulforafanu. Shishu a spol. (5) prokázal Amesovým testem silné antimutagenní schopnosti sulforafanu proti heterocyklickým aminům (např. IQ, MeIQ či MeIQx). Dle Barcela a spol. (6) sulforafan

v Amesově testu inhiboval mutagenitu N-nitrosodimethylaminu (NDMA). Některé studie také potvrzují antiklastogenní účinky I3K aplikovaného před podáním karcinogenu (7).

Výsledky naznačují, že chemopreventivní sloučeniny z brukvovité zeleniny mohou ovlivňovat proces karcinogeneze během iniciační a promoční fáze. Podobné jsou i závěry epidemiologických a klinických studií podporující tuto myšlenku. Protektivní účinek sulforafanu je spojován především s indukcí enzymů 2. fáze, např. glutathion-S-transferáza (GST). Enzymy 2. fáze jsou zahrnuty v detoxikaci mnoha karcinogenů a volných kyslíkových radikálů, a také v ochraně buněk proti poškození DNA a následně rozvoji maligní transformace (8).

Experimentální studie na zvířatech exponovaných karcinogenům a krmených sulforafanem (9) potvrzují statisticky významné snížení velikosti a průměru nádorů u myši a potkanů. Některé studie popisují vliv sulforafanu na inhibici nádorů v postiniciační fázi. Tato inhibiční aktivita je spojována s indukcí apoptózy v tkáních.

Brukvovitá zelenina je nízkenergetická, obsahuje málo tuku, je bohatým zdrojem vitaminů, minerálů a vlákniny, dále obsahuje biologicky aktivní sloučeniny (glukosinoláty, fenoly, flavonoidy ...). Všechny tyto látky dohromady se mohou podílet na antikarcinogenním působení této skupiny. Neexistuje však komplexní zhodnocení všech aspektů mezi konzumací brukvovité zeleniny a prevencí nádorového onemocnění. Stále jsme daleko od porozumění účinků chemopreventivně působících látek přítomných v brukvovité zelenině a jejich celkovému mechanismu akcí vedoucích k protektivním účinkům.

Výsledky chemiluminiscenčního testu nejsou jednoznačné a jejich interpretace je vždy komplikovaná. Zvýšenou produkcí volných kyslíkových radikálů (VKR) lze prokázat zvýšenou fagocytární aktivitu leukocytů. Otázkou však zůstává, je-li toto zvýšení pro organismus změnou pozitivní, která může znamenat zvýšenou odolnost organismu vůči patogenním podnětům, a nebo je zvýšená fagocytární aktivita vyvolána poškozením některých buněčných struktur a slouží k udržení homeostázy a odstranění poškozených buněk.

Nevýhodou námi použité chemiluminiscenční metody je použití plné krve, která může obsahovat i jiné zdroje VKR než leukocyty a také látky s antioxidačními vlastnostmi. Tímto způsobem může dojít k ovlivnění naměřené hodnoty a odchylce od reálné hodnoty chemiluminiscence příslušející pouze leukocytům.

Vliv aplikovaných látek na produkci VKR jinými komponentami než leukocyty je zanedbatelný. Mechanismus účinku použitých mutagenů spočívá ve vazbě na DNA či její methylaci a bloku transkripce a translace genetické informace. Snížení produkce VKR by mohlo být pozorováno u isothiokyanátů, protože jsou u nich popisovány antioxidační vlastnosti. I3K a sulforafan jsou však nepřímé antioxidanty, které po krátké stimulaci produkce VKR indukují aktivitu antioxidačně působících enzymů superoxiddismutázy (SOD) a glutathionperoxidázy (GPX). Z porovnání získaných výsledků vyplývá, že aplikace sulforafanu v porovnání s kontrolou neměla na chemiluminiscenci žádný vliv, kdežto u obou koncentrací I3K jsme pozorovali snížení produkce VKR, které bylo u koncentrace 250 mg.kg⁻¹ statisticky významné. Uvedené výsledky lze vyložit buďto tak, že I3K indukuje aktivitu antioxidačních enzymů rychleji než sulforafan, a nebo že má určité imunosupresivní vlastnosti. Vzhledem k použité metodice, která měří světelné impulsy po reakci VKR s luminolem, nelze říci, která z možností je pravděpodobnější. Vysvětlení opírající se o působení antioxidačních enzymů je značně závislé na mechanismu interakce VKR s luminolem a zejména rychlosti této reakce. Vliv látek na imunitní systém bude nutné ověřit na modelu s chronickou administrací těchto látek.

Předpokládali jsme, že po aplikaci samotného mutagenu bude zvýšená hodnota chemiluminiscence v důsledku poškození buněk a aktivace fagocytárního systému. Naproti tomu kombinace mutagen-isothiokyanát by měla v případě antimutageních

vlastností isothiokyanátů hodnoty chemiluminiscence snižovat. takovéto výsledky jsme však získali pouze při použití sulforafanu a IQ. U ostatních skupin byly výsledky proti předpokládaným odlišné a v některých případech i naprosto opačné, což by naznačovalo synergistický mutagenní účinek použitých látek (sulforafan+MNU, I3K+MNU), což však neodpovídá výsledkům mikronukleus testu.

Zajímavé jsou rozdíly ve výsledcích při použití kombinace MNU-isothiokyanát. Zatímco u nízkých dávek sulforafanu a I3K bylo zjištěno zvýšení chemiluminiscence u dávky I3K 250 mg.kg⁻¹ byl naměřen pokles chemiluminiscence oproti samotnému mutagenu. Vysvětlením může být prooxidační a fagocytózu stimulující působení nízkých dávek isothiokyanátu a opačný efekt vyšších dávek.

Vliv isothiokyanátů na aktivitu imunitního systému bude nutné ověřit v dalších studiích, za použití specifitějších metod.

Závěr

Výsledky získané v této studii prokazují, že třídenní aplikace indol-3-karbinolu a sulforafanu, kterou následovala jednorázová aplikace mutagenů (IQ a MNU) vedla ke statisticky významnému snížení počtu mikrojader, a testované látky tak prokazují chemopreventivní účinky proti vybraným mutagenům ze skupiny heterocyklických aminů a N-nitrososoloučenin.

Výsledky chemiluminiscenčního testu prokazují značnou variabilitu vlivu isothiokyanátů na produkci VKR v závislosti na použité dávce a kombinaci s mutagenem. I3K v obou použitých dávkách snižoval chemiluminiscenci vůči kontrolní skupině, což lze považovat za účinek imunosupresivní. Dále také v dávce 250 mg.kg⁻¹ snižoval chemiluminiscenci v kombinaci s MNU oproti samotné MNU. V dávce 125 mg.kg⁻¹ I3K v kombinaci s MNU a u sulforafanu s MNU zvyšoval chemiluminiscenci oproti skupině kontrolní i skupině s MNU.

Studie byla podpořena grantovým projektem NAZV č. QF 3287 „Funkční potraviny ze zeleniny a ovoce a dalších zemědělských produktů vyrobené za použití vysokotlakového ošetření“.

Poděkování

Autoři děkují za pomoc paní K. Sedlářové, M. Pokludové a K. Havlíčkové a Z. Oplatkové a Mgr. L. Zahradníkové.

Literatura

1. Singh SV, Herman-Antosiewicz A, Singh AV et al. Sulforaphane-induced G₂/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J. Biol. Chem.*, 279, 2004, 24, 25813-25822.
2. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, 96, 1996, 10, 1027-1039.
3. Meskin MS, Bidlack WR, Davies AJ et al. *Phytochemicals: Mechanisms of action*. CRC Press: USA 2004, 107-119. ISBN 0-8493-1672-3.
4. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Res.*, 31, 1975, 9-15.
5. Shishu, Kaur IP. Inhibition of mutagenicity of food-derived heterocyclic amines by sulforaphane-a constituent of broccoli. *Indian J. Exp. Biol.*, 41, 2003, 3, 216-219.
6. Barcelo S, Gardiner JM, Gescher A et al. CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis*, 17, 1996, 2, 277-282.
7. Shukla Y, Srivastava B, Arora A et al. Protective effects of indole-3-carbinol on cyclophosphamide-induced clastogenicity in mouse bone marrow cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, 23, 2004, 5, 245-250.
8. Paolini M, Perocco P, Canistro D et al. Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and *in vitro* cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli. *Carcinogenesis*, 25, 2004, 1, 61-67.

9. [Zhang Y](#), [Kensler TW](#), [Cho CG](#) et al. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91, 1994, 8, 3147-3150.