

Genisteina i 3,3'-diindolilometan w chemoprewencji nowotworów

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Śląski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu i Katedry: prof. dr hab. n. farm. Anna Sułkowska

GENISTEIN AND 3,3'-DIINDOLYLMETHANE IN CANCER CHEMOPREVENTION

SUMMARY

Cancer is one of the most common causes of death in the world. There are some agents that can delayed, arrested or reversed the multi-step process of carcinogenesis. This approach is named chemoprevention and is known from more than 30 years. Some of these agents with chemopreventive properties are natural substances such as genistein and 3,3'-diindolylmethane. Each of the compounds shows broad spectrum of biological activity in vitro. There are many examples of epidemiological observations which confirm in vitro studies. This review summaries the basic data on genistein and 3,3'-diindolylmethane with chemopreventive activity in cancer.

KEY WORDS: CHEMOPREVENTION, 3,3'-DIINDOLYLMETHANE – DIM – GENISTEIN

Wykaz skrótów

AhR – receptor węglowodorów aromatycznych; Akt – kinaza serynowo-treoninowa B; AR – receptor androgenowy; ALP – fosfataza alkaliczna; ATF – aktywujący czynnik transkrypcyjny; Bad, Bax – białka proapoptotyczne, Bcl-2, Bcl-xL – białka antyapoptotyczne; CREB – czynnik transkrypcyjny; EGFR – receptor czynnika wzrostu naskórka; ER – receptor estrogenowy; ERK – kinazy regulowane przez sygnał zewnątrzkomórkowy; GADD – grupa białek naprawczych; IFN γ – interferon γ ; JNK – kinaza domeny N-końcowej białka Jun; MMP-9 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9; p-21 – inhibitor kinaz zależnych od cyklin; NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny; p-38 – kinaza białkowa aktywowana mitogenami; PSA – swoisty antygen sterczowy; ROS – reaktywne formy tlenu; TGF β – transformujący czynnik wzrostu β ; u-PA – aktywator plazminogenu typu urokinazy; VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu.

Wstęp

Od wielu lat najczęstszymi przyczynami zgonów na świecie, obok chorób układu krążenia, są nowotwory

złośliwe. W 2010 roku, według Raportów Centrum Onkologii, w Polsce odnotowano ogółem ponad 140 000 zachorowań na nowotwory złośliwe oraz około 80 000 zgonów z powodu tej choroby. Wśród kobiet najczęstszą przyczyną zachorowań jest nowotwór złośliwy sutka (15 784 nowych zachorowań w 2010 roku). Rak płuca stanowi najczęstszą przyczynę zachorowań i zgonów u mężczyzn (14 794 nowych zachorowań w 2010 roku) (1). Z dostępnych danych wynika, że zarówno zachorowalność, jak i śmiertelność z powodu nowotworów złośliwych, pozostają na bardzo wysokim poziomie.

Jedną z form profilaktyki przeciwnowotworowej jest chemoprewencja. Koncepcja chemoprewencji zrodziła się ponad 30 lat temu za sprawą badań Sporna nad retinoidami (2). Zakłada ona stosowanie naturalnych lub farmakologicznych czynników, dzięki czemu możliwe jest zatrzymanie lub spowolnienie przebiegu kancerogenezy, a także regresja już powstałych zmian. Są to działania zapobiegawcze ingerujące w możliwie najwcześniejsze etapy procesu nowotworowego (3). Należy jednak zaznaczyć, że główna rola chemoprewencji nie polega na hamowaniu wzrostu zaawansowanego nowotworu, a raczej na odwracaniu wczesnych zmian przedrakowych i zapobieganiu przekształcaniu się ich w formę złośliwą (2). Czynniki chemoprewencyjne możemy podzielić, ze względu na ich aktywność na różnych etapach transformacji nowotworowej, na czynniki hamujące etap inicjacji (blokujące) i czynniki wpływające na etapy promocji i progresji kancerogenezy (supresyjne) (4).

Niniejsza publikacja przedstawia charakterystykę dwóch substancji pochodzenia naturalnego o aktywności przeciwnowotworowej – genisteiny i 3,3'-diindolilometanu, które mogą mieć zastosowanie w chemoprewencji nowotworów.

Genisteina

Genisteina jest głównym flawonowym składnikiem nasion soi (*Glycyne max.* Merrill), występuje również w nasionach roślin strączkowych. Soja oraz jej przetwory są najbogatszym źródłem genisteiny. Zawartość

genisteiny w wybranych produktach sojowych została przedstawiona w tabeli 1 (5).

Omawiany związek występuje w swojej naturalnej formie w nieaktywnej postaci tj. 7-O- β -D-glukopiranozylogenisteiny (genistyna) oraz w postaci estrów z niższymi kwasami karboksylowymi (przede wszystkim malonowym i octowym). Pod wpływem działania żołądkowego kwasu solnego oraz nieswoistych β -glukozydaz bakteryjnych przewodu pokarmowego lub obecnych w żywności (endogennych lub dodanych podczas przetwarzania) następuje hydroliza glikozydu i powstaje aktywny aglikon – genisteina (6). Dalsze przemiany metaboliczne omawianego izoflawnonu (reakcje dehydroksylacji, demetylacji i redukcji)

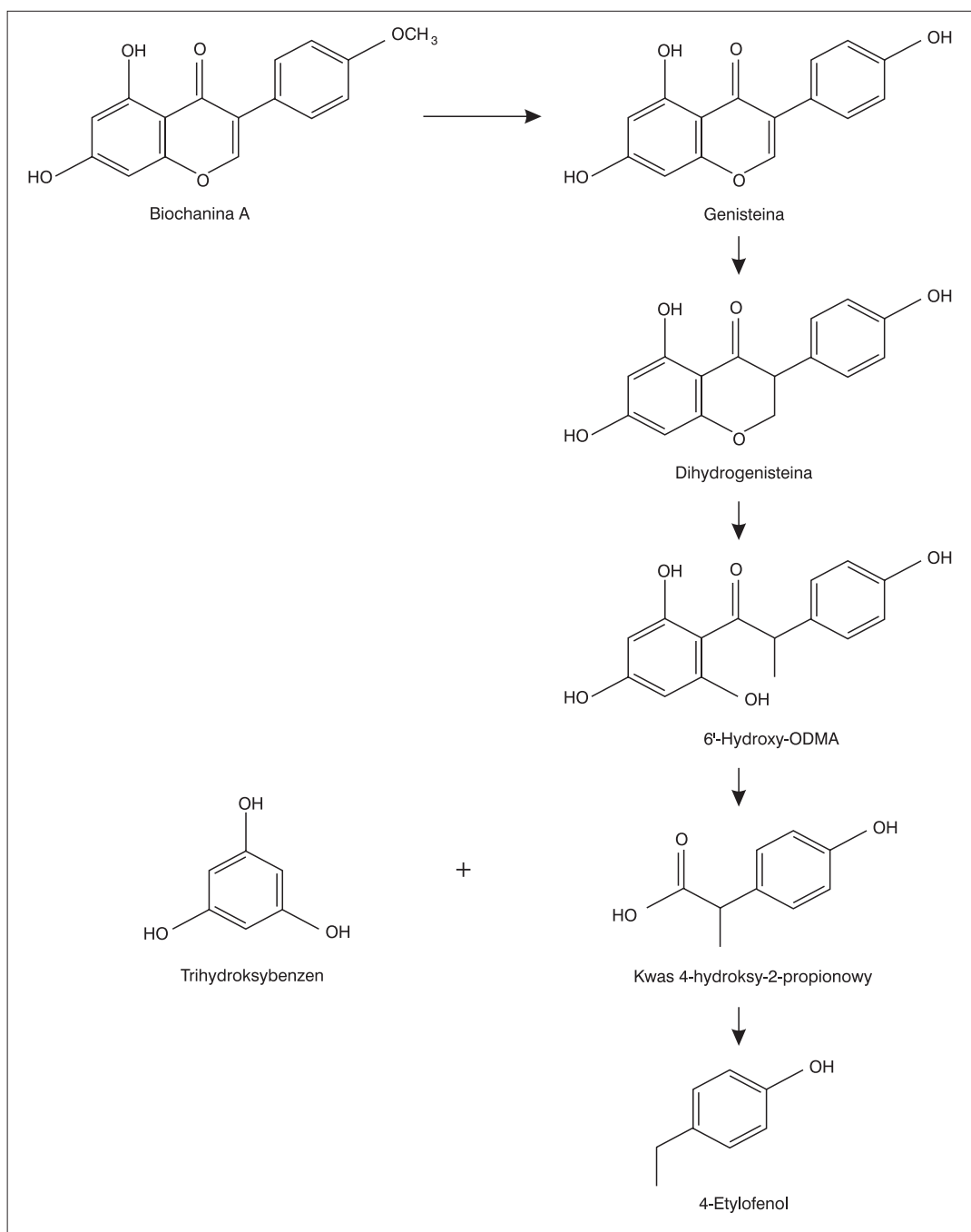
zachodzą w jelicie, są złożone i nie zostały do końca poznane (7). Zaproponowano, że genisteina najpierw jest przekształcana przez bakterie jelitowe do dihydrogenisteiny. Następnie przez rozszczepienie pierścienia C powstaje 6'-hydroxy-ODMA, który dalej może być rozkładany przez mikroflorę jelitową do kwasu 4-hydroksy-2-propionowego i trihydroksybenzenu. Dekarboksylacja kwasu 4-hydroksy-2-propionowego może prowadzić do powstania produktu metabolizmu 4-etylofenolu (8). Możliwe ścieżki metaboliczne dla genisteiny przedstawia rycina 1.

W wyniku reakcji hydroksylacji powstaje 3'-OH-genisteina (3',4',5,7-tetrahydroksy-izoflawnon), znana również jako orobol, która jest co najmniej tak samo aktywna jak genisteina w wielu testach *in vitro* (9). Można założyć, że genisteina jest poddana dalszej biotransformacji (O-metylacja) przez katecholo-O-metylotransferazę (COMT), ponieważ produkty aromatycznej hydroksylacji genisteiny mogą zawierać ugrupowanie katecholowe lub pirogalolowe (10). Może to być o tyle istotne, że katecholowe metabolity estrogenów są potencjalnymi kancerogenami biorącymi udział w etiologii raka sutka (11). W warunkach *in vivo* stwierdzono jednak bardzo małe ilości metylowanych pochodnych genisteiny, co świadczy o tym, że metylacja przez COMT nie odgrywa ważnej roli w biotransformacji tego izoflawnonu *in vivo* (10). W wątrobie, przy udziale enzymów fazy II (UDP-glukuronozylotransferazy i sulfotransferazy) zachodzi sprzężanie metabolitów z kwasem glukuronowym lub/i kwasem siarkowym. Glukuronidowe i siarczanowe koniugaty genisteiny trafiają następnie do krążenia wątrobowo-jelitowego. Genisteina jest wydalana z moczem jako monoglukuronid na poziomie około 53-76% oraz w znacznie mniejszym stopniu jako diglukuronid (12-16%) i sulfoglukuronid (2-15%) (8). Jedynie 1-2% genisteiny wydalane jest z moczem w postaci niezmienionej (7).

Genisteina jest flawonoidem, który od dawna wzbudza ogromne zainteresowanie naukowców. Wpływ na to miały niewątpliwie wyniki badań dotyczących epidemiologii nowotworów. Wykazały one odwrotną zależność pomiędzy spożywaniem znacznych ilości produktów sojowych, które obfitują w genisteinę, a zachorowalnością na nowotwory sutka i prostaty oraz śmiertelnością z powodu tych nowotworów. Ustalono, że stężenie genisteiny w płynach ustrojowych w populacjach azjatyckich w porównaniu do mieszkańców krajów zachodnich, jest wielokrotnie wyższe (od 7 do 110 razy w osoczu i ok. 30 razy w moczu) (12). Śmiertelność z powodu raka sutka i prostaty w populacjach Dalekiego Wschodu (spożycie 20-80 mg genisteiny dziennie) jest 4-10 razy niższa w porównaniu do

Tabela 1. Zawartość genisteiny w produktach sojowych (mg/100g) (wg 5).

Źródło genisteiny	Zawartość w żywności (mg/100 g)
Mąka sojowa pełnotłusta	98,77
Mąka sojowa odtłuszczona	87,31
Nasiona soi dojrzałe, świeże	80,99
Nasiona soi dojrzałe, suche, prażone (w tym orzechy sojowe)	75,78
Natto	37,66
Chipsy sojowe	27,45
Nasiona soi dojrzałe, w puszkach	25,15
Miso	23,24
Błonnik sojowy	21,68
Tofu smażone	18,43
Pasta sojowa	17,79
Jogurt sojowy	16,59
Tofu świeże przygotowane z siarczanem wapnia	12,99
Lecytyna sojowa	10,30
Jogurt tofu	9,40
Napój sojowy	5,10
Makaron sojowy	3,70
Ser sojowy, mozzarella	2,60
Mleko sojowe, wszystkie smaki, z dodatkiem witaminy A i D oraz wapnia, niskotłuszczowe	1,51
Ser sojowy, parmezan	0,80
Mleko sojowe, wszystkie smaki, z dodatkiem witaminy A i D oraz wapnia, beztłuszczowe	0,41



Ryc. 1. Możliwe szlaki metaboliczne biochaniny A lub genisteiny do 4-etylofenolu (wg 8).

śmiertelności z powodu tych nowotworów w krajach Zachodu (spożycie 1-3 mg genisteiny dziennie) (13). Badania przeprowadzone przez Yamamoto i wsp. (14) w Japonii wskazują, że częste spożycie izoflawonów jest związane z zmniejszeniem ryzyka raka sutka. Również badania Cotterchio i wsp. (15) wśród kobiet z Kanady wykazały ujemną korelację między spożyciem fitoestrogenów, a ryzykiem zachorowania na raka sutka. Okazało się jednak, że redukcja ryzyka była istotna statystycznie jedynie wśród kobiet przed menopauzą,

które mają nadwagę (BMI > 25). U kobiet po menopauzie nie wykazano istotnego statystycznie związku zaobserwowanego między ryzykiem zachorowania na raka sutka a spożyciem fitoestrogenów. Również badania na modelach zwierzęcych potwierdzają hamujący wpływ diety bogatej w genisteinę na proces kancerogenezy indukowany czynnikami chemicznymi lub promieniowaniem (12).

Z wielu badań *in vitro* i *in vivo* wynika, że genisteina charakteryzuje się szerokim wachlarzem działań

biologicznych. Właściwości genisteiny, które uzasadniają stosowanie jej w chemoprewencji nowotworów, to m.in. właściwości przeciwutleniające, hamujące angiogenezę, aktywność antyproliferacyjna, działanie proapoptotyczne, zdolność do indukcji różnicowania, wpływ na cykl komórkowy i uczestniczące w nim cząsteczki o działaniu regulatorowym (6). Jednak jedną z najbardziej znanych właściwości genisteiny jest jej aktywność estrogenowa. Fitoestrogeny mają bardzo podobną chemiczną strukturę do 17 β -estradiolu i wiążą się z receptorami estrogenowymi (ER), z preferencją dla ER- β . I chociaż genisteina wykazuje słabe powinowactwo do receptora estrogenowego, z powodzeniem konkuruje z jego naturalnym substratem – estradiolem o wiązanie z receptorem, a odpowiedni kompleks wywołuje docelowy efekt hormonalny. Z powodu strukturalnego podobieństwa fitoestrogenów do estrogenów fizjologicznych można założyć, że mogą promować kancerogenezę i zwiększać ryzyko zachorowania na raka sutka. Jednak obserwacje epidemiologiczne wskazują, że w krajach, gdzie spożywa się w diecie znaczące ilości fitoestrogenów, występuje najniższa częstość zachorowania na raka sutka.

Podobne obserwacje epidemiologiczne dotyczą niższej umieralności na raka prostaty wśród mężczyzn spożywających większe ilości soi w porównaniu do tych, których sposób odżywiania jest inny (6). Wykazano, że genisteina (w dużych stężeniach) wiąże się z receptorami androgenów i obniża, w granicach 50-80%, stymulujący wpływ hormonów męskich (głównie testosteronu i dihydrotestosteronu) na rozwój raka gruczołu krokowego (16). Ponadto przeciwnowotworowe działanie genisteiny w raku sutka zostało udowodnione w badaniach na zwierzętach i na liniach komórkowych. W eksperymentach na liniach komórkowych wykazano antyproliferacyjny efekt genisteiny w stosunku do komórek z obecnym receptorem estrogenowym ER(+), jak i bez receptora ER(-). Efekt ten został osiągnięty przez zatrzymanie cyklu komórkowego w stadium G2 – M, indukcję i ekspresję p21 oraz w wyniku apoptozy (12). Nie należy jednak wykluczać możliwości pobudzenia przez genisteinę wzrostu estrogenozależnych nowotworów. Badania McMichael-Phillipsa i wsp. (17) wykazały wzrost proliferacji komórek w materiale biopsyjnym (pobrane z prawidłowej tkanki gruczołu piersiowego od kobiet przed menopauzą z łagodnymi i złośliwymi nowotworami piersi) po 14-dniowym stosowaniu diety wzbogaconej o 60 g soi dziennie. Zaobserwowano również niewielki wzrost ekspresji receptora progesteronowego. Autorzy eksperymentu zwracają jednak uwagę na fakt, że przeprowadzone przez nich badanie było badaniem krótkoterminowym i należy zbadać

przedłużone w czasie stosowanie diety bogatej w soję. Genisteina w stężeniach fizjologicznych, w zakresie od 10 nmol/l do 1 μ mol/l, stymuluje proliferację komórek normalnych oraz rakowych. Natomiast w stężeniach większych, przekraczających 10 μ mol/l, działa hamująco na podziały komórek nowotworowych (16).

Genisteina działa również poprzez mechanizmy niezwiązane z receptorami estrogenowymi. Stwierdzono, że genisteina jest inhibitorem proteinowych kinaz tyrozynowych, które pełnią niezwykle ważną rolę w stymulacji procesów proliferacji różnego typu komórek. Zaobserwowano nadmierną ekspresję kinaz tyrozynowych w różnych rodzajach nowotworów, ponadto znaczna część tyrozyn jest kodowana przez onkogeny. Genisteina konkuruje o miejsce aktywne z 5'-trifosforanem adenozy (ATP), który jest substratem kinaz tyrozynowych i w ten sposób hamuje ich działanie. Ponadto genisteina działa również jako inhibitor topoisomerazy II DNA, co zakłóca proces replikacji DNA i prowadzi do osłabienia podziału komórek i ich wzrostu (16). Antyproliferacyjne działanie genisteiny zostało potwierdzone w badaniach na różnych liniach komórek nowotworowych zwierząt. W badaniach tych wykazano, że genisteina hamuje proliferację komórek, a za efekt ten może być odpowiedzialna indukcja apoptozy i indukcja różnicowania. Booth i wsp. (cyt. za 6) porównywali wpływ genisteiny oraz tamoksyfenu i inhibitora kinazy tyrozynowej (tyrphostin) na komórki nabłonka jelitowego szczura oraz ludzkie komórki raka jelita grubego. Okazało się, że genisteina była najsilniejszym inhibitorem proliferacji spośród wymienionych związków, jak również wykazywała najsilniejsze działanie proapoptotyczne, działała również hamująco na aktywność kinazy tyrozynowej.

Reaktywne formy tlenu (ROS) pełnią istotną rolę w procesie inicjacji, promocji i progresji nowotworów. Na etapie inicjacji najważniejszą rolę przypisuje się rodnikowi hydroksylowemu \bullet OH, który odpowiada za inaktywację genów supresorowych, aktywację onkogenów i aktywację niektórych kancerogenów. Na etapie promocji nowotworów reaktywne formy tlenu mogą nasilać proliferację komórek znacznie zwiększając stężenie jonów Ca²⁺ w komórkach, co z kolei może aktywować niektóre protoonkogeny (c-fos, c-jun, c-myc i kinazę białkową C) (18). Właściwości antyoksydacyjne genisteiny zostały dobrze udokumentowane w literaturze. Wiadomo, że związek ten wykazuje zdolność hamowania peroksydacji lipidów, a także zdolność wymiatania wolnych rodników tlenowych i ich form reaktywnych. Ogranicza również ich powstawanie w komórkach przez hamowanie aktywności enzymów, które biorą udział w powstawaniu reaktywnych form tlenu (takich jak oksydaza ksantynowa, błonowa

oksydaza NAD(P)H, mieloperoksydaza). Ponadto genisteina działa poprzez stymulowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, katalazy i reduktazy glutationowej oraz zapobiega powstawaniu w komórkach reaktywnego rodnika hydroksylowego przez kompleksowe wiązanie kationów metali przejściowych (miedzi i żelaza). Silne działanie przeciwutleniające genisteiny jest związane z obecnością w jej strukturze grup hydroksylowych w pozycjach C-5, C-7, C-4', wiązania podwójnego w pozycji C-2 i C-3, a także grupy karbonylowej w pozycji C-4 (19, 20). Wei i wsp. (19) porównywali wpływ genisteiny i strukturalnie podobnych izoflawonów na indukowane przez 12-O-tetradekanoilo-13-acetylo-forbol (TPA) wytwarzanie nadtlenu wodoru przez komórki białaczek ludzkich linii HL60. Wyniki pokazały, że genisteina jest najsilniejszym inhibitorem wytwarzania H_2O_2 stymulowanego przez TPA spośród badanych związków. Badacze Ci udowodnili również, że genisteina przeciwdziała tworzeniu anionów ponadtlenkowych z udziałem oksydazy ksantynowej.

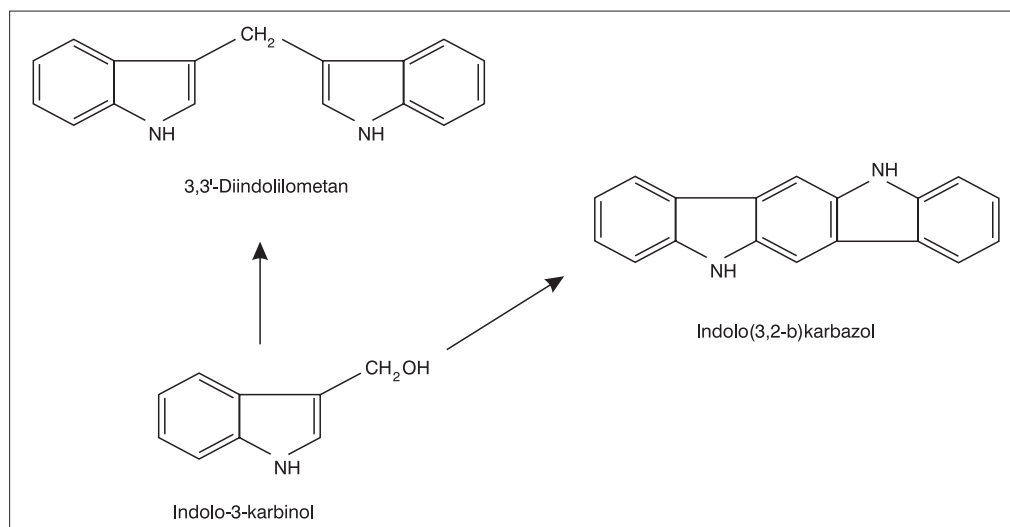
Angiogeneza jest procesem tworzenia nowych naczyń krwionośnych na bazie już istniejących, występuje fizjologicznie i jest niezbędna do prawidłowego rozwoju, wzrostu i dojrzewania organizmu. Jako proces fizjologiczny u zdrowej osoby jest pod stałą kontrolą czynników pro- i antyangiogennych, które pozostają w równowadze. Udowodniono, że proces ten leży również u podstaw patofizjologii wielu chorób, w tym chorób nowotworowych (21). Wykazano, że genisteina jest jednym z najlepszych inhibitorów angiogenezy wśród związków roślinnych. Fotsis i wsp. (22) wykazali, że genisteina

była zdolna do hamowania proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego i angiogenezy *in vitro* w stężeniach odpowiednio 5 i 150 $\mu\text{mol/l}$. Ponadto stwierdzili, że genisteina hamuje proliferację wielu różnych komórek nowotworowych. Inni autorzy również wykazali antyangiogenne działanie genisteiny. Shao i wsp. (cyt. za 6) oprócz zahamowania przez genisteinę angiogenezy, zaobserwowali także obniżenie wytwarzania czynników regulujących ten proces, takich jak VEGF i TGF β .

Wietrzyk i wsp. (cyt. za 6) przeprowadzili badania, które wykazały, że genisteina stosowana pojedynczo (100 mg/kg m.c. przez 10 dni) lub po jednorazowej dawce cyklofosfamidu (CY) spowodowała obniżenie zdolności do przerzutu komórek przeszczepialnych nowotworów mysich. Efekt ten zaobserwowano po zastosowaniu genisteiny u myszy, którym przeszczepiono dożylnie komórki raka LL2 (94% redukcji liczby przerzutów po podaniu wyłącznie genisteiny i 85% redukcji liczby przerzutów po podaniu genisteiny po pojedynczej dawce CY). Ci sami badacze uzyskali efekt w postaci redukcji masy guza i redukcji liczby kolonii nowotworowych w płucach w przypadku myszy zaszczipionych śródskórnie lub dożylnie komórkami czerniaka po podaniu samej genisteiny (odpowiednio 42% i 27%) oraz po podaniu skojarzonym z CY (odpowiednio 69% i 66%). Badania te dowodzą, że genisteina wykazuje oprócz wielu innych, również działanie zapobiegające przerzutom nowotworów.

3,3'-Diindolilometan

3,3'-diindolilometan (DIM) jest głównym produktem kondensacji indolo-3-karbinolu (I3C) (ryc. 2).



Ryc. 2. Reakcje przemian indolo-3-karbinolu (I3C) zachodzące w kwaśnym środowisku żołądka.

Powstaje w organizmie człowieka po spożyciu roślin krzyżowych, takich jak brokuły, kapusta, brukselka, kalafior. Indolo-3-karbinol występujący w tych roślinach pod postacią glukozynolanu – glukobrasycyny, jest z niej uwalniany pod wpływem enzymu mirozynazy w reakcji enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów. W środowisku kwaśnym żołądka I3C ulega dehydratacji i jest przekształcany (kondensacja) do aktywnych pochodnych, z których głównymi są: DIM oraz indolo(3,2-b)karbazol (ICZ) (23).

DIM, podobnie jak I3C, jest związkiem o wielokierunkowym działaniu i wykazuje potencjał chemoprewencyjny. Udowodniono w badaniach na modelach zwierzęcych, że DIM jest skuteczny przeciw nowotworom sutka (24), prostaty (25), macicy (26), a także okrężnicy (27). DIM może wykazywać działanie chemoprewencyjne poprzez stymulowanie detoksykacji substancji kancerogennych, indukcję apoptozy, aktywność przeciwzapalną, a także poprzez ograniczanie namnażania komórek nowotworowych (aktywność antyproliferacyjna), wpływ na cykl komórkowy i wspomaganie naprawy DNA (23).

Wykazano, że zarówno DIM, jak i I3C, wpływają na przemiany metaboliczne 17β -estradiolu. Związki te zwiększają syntezę 2-hydroksyestronu (2-OHE1), a zmniejszają produkcję 16α -hydroksyestronu (16α OHE1) (28). 2-OHE1 i 16α OHE1 są głównymi metabolitami 17β -estradiolu, przy czym pierwszy z nich ma słabe działanie estrogenne i nie wykazuje działania genotoksycznego, drugi wykazuje dużą aktywność hormonalną, trwale wiąże się z receptorem estrogenowym i ma działanie kancerogenne i genotoksyczne (29). Zaburzenia równowagi przemian 17β -estradiolu i zwiększenie syntezy 16α OHE1 kosztem 2-OHE1 może zwiększać ryzyko zachorowania na raka sutka. DIM może również konkurować z estradiolem o wiązanie do receptora estrogenowego i w ten sposób hamować jego aktywność. Badania wskazują, że DIM oddziałuje na estrogen również poprzez indukcję enzymów, które wpływają na jego metabolizm. Wykazano, że produkty kondensacji I3C mogą wiązać się z receptorem węglowodorów aromatycznych (AhR) i pobudzając go, indukują ekspresję genu cytochromu P450 CYP1A1, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia metabolizmu estrogenu i obniżenia jego poziomu we krwi (30). Wattenberg i wsp. (24) wykazali, że DIM zmniejsza ryzyko powstawania zarówno raka sutka samorzutnego, jak i indukowanego czynnikiem kancerogennym DMBA (7,12-dimetylobenz(a)antracen). Badania Hong i wsp. (31) wykazały, że DIM w stężeniach powyżej $10 \mu\text{mol/l}$ działa zarówno na zależne od estrogenu (linia MCF-7), jak i niezależne od estrogenu (linia

MDA-MB-231) komórki nowotworowe, hamując syntezę DNA i proliferację komórek raka sutka. Badacze zaobserwowali również charakterystyczne oznaki programowanej śmierci komórkowej w obu liniach komórkowych, w tym kondensację chromaty, translokację fosfatydyloseryny i fragmentację DNA. Ponadto zauważyli, że DIM obniżył zarówno w komórkach linii komórkowej MCF-7, jak i MDA-MB-231, poziom białka hamującego apoptozę Bcl-2 i spowodował wzrost poziomu białka Bax, które odpowiada za inicjowanie apoptozy.

Stwierdzono również, że DIM może powodować zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Spowodowane jest to zmniejszeniem poziomu cykliny D1, cykliny E i kinaz zależnych od cyklin CDK2, CDK4 i CDK6 oraz aktywacją inhibitorów kinaz cyklicznych (genów supresorowych p21 i p27). Prowadzi to dalej do zmniejszenia fosforylacji białka Rb, w następstwie czego białko Rb wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F i zapobiega jego transkrypcji. Działania te uniemożliwiają komórce przejście z fazy G1 do fazy S (32). Badania Le i wsp. (25) wykazały, że DIM ma silne działanie antyproliferacyjne oraz działanie antyandrogenne w zależnych od androgeny ludzkich komórkach raka prostaty. Autorzy badania stwierdzili, że DIM jest czystym antagonistą receptora androgenowego. Kong i wsp. (33) badając funkcję czynników angiogennych wydzielanych przez komórki raka gruczołu krokowego wykazali, że DIM hamuje angiogenezę przez zmniejszenie biodostępności VEGF poprzez tłumienie enzymów proteolitycznych rozkładających macierz zewnątrzkomórkową, takich jak MMP-9 i u-PA. Okazało się też, że DIM hamuje aktywność NF- κ B, który pośredniczy w ekspresji wielu zależnych od tego czynnika transkrypcyjnego genów, w tym VEGF, Interleukiny 8 (IL-8), u-PA, oraz MMP-9, z których wszystkie są zaangażowane w angiogenezę, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych. NF- κ B działa również jako ważny czynnik przetrwania w komórkach nowotworowych, ponieważ indukuje transkrypcję genów kodujących białka o działaniu antyapoptotycznym, takich jak surwiwina, białko p53 i białko Bcl-xL. Z tych powodów kluczową rolę w proapoptotycznym działaniu DIM odgrywa inaktywacja NF- κ B w komórkach nowotworowych. DIM ma również zdolność inaktywacji kinazy Akt. Akt promuje przeżycie komórek nowotworowych przez fosforylację i inaktywację proapoptotycznych białek, takich jak kinaza syntazy glikogenowej GSK3, białko Bad (z rodziny Bcl-2) czy kaspaza-9 (23). Niektóre mechanizmy odpowiedzialne za chemoprewencyjną aktywność DIM zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Aktywność biologiczna DIM *in vitro* (wg (34), zmodyfikowana).

Model	Dawka ($\mu\text{mol/l}$)	Wpływ na biomarkery	Rezultat
MCF-7	10-50 1-10 50	\uparrow CYP1A1, \uparrow wiązania z AhR \uparrow ER-DNA \uparrow GADD, \uparrow IFN γ , \uparrow p-JNK, \uparrow p-p38, \uparrow p-Jun, \uparrow p-ATF-2, \downarrow aktywności Cdk2, \downarrow Bcl-2, \uparrow ROS	apoptoza, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G ₁ , zahamowanie wzrostu
MCF10CA1a	15-50 30-50 50	\downarrow NF- κ B-DNA \downarrow p-Akt	zahamowanie wzrostu
MDA-MB231	40-50	\uparrow poziomu mRNA dla p21Cip1, p57Kip2, \downarrow poziomu mRNA dla genów biorących udział w proliferacji i przeżyciu komórki oraz angiogenezie i migracji, \downarrow Bcl-2	apoptoza, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G ₁ , zahamowanie wzrostu
Rak endometrium Ishikawa	1-30	\uparrow p-ERK1/2, \uparrow p-CREB, \uparrow TGF α , ALP i PR	zahamowanie wzrostu
Rak prostaty LNCaP	10 50	\downarrow PSA i poziomu mRNA, wiązanie z AR, \downarrow funkcji AR \downarrow ekspresji AR	zmniejszenie proliferacji
PC-3	40 15-60	\downarrow ekspresji genów: EGFR, PI3K, TGF β 2, FGF, cytokiny E2, ATF, Bcl-2 \downarrow p-Akt, \downarrow aktywności PI3K, \downarrow NF- κ B-DNA, \downarrow EGFR	apoptoza
DU 145	25-50	\downarrow p-Akt, \downarrow Cdk4, \downarrow Cdk6, \uparrow mobilizacji Ca ²⁺	apoptoza, zahamowanie wzrostu, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G ₁
Rak jelita grubego HCT-116	12-25 25-50	\uparrow ekspresji NAG-1 \uparrow ATF3	
Hep G2	30-50	inhibitor topoizomerazy II α	zahamowanie wzrostu, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G ₁
Rak trzustki anc-1 i Panc-28	20	\uparrow GRP78, \uparrow CHOP, \uparrow DR5, \uparrow kaspaza-8, \uparrow kaspaza-3	zmniejszone przeżycie, apoptoza

Podsumowanie

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania stosowaniem biologicznie czynnych substancji roślinnych w profilaktyce raka. Chemoprewencja, jako jedna z form profilaktyki, wydaje się być racjonalną i obiecującą strategią walki z nowotworami. Przedstawione w niniejszej pracy związki charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznej. Zarówno genisteina, jak i 3,3'-indolilometan, wykazują aktywność przeciwnowotworową w stosunku do wielu nowotworów, jednocześnie charakteryzując się mniejszą toksycznością w porównaniu ze standardową terapią.

W wielu badaniach *in vitro* wykazano, że związki te indukują zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę w liniach komórek nowotworowych w porównaniu do linii komórkowych innych niż tkanka nowotworowa. Stwierdzono także modulację aktywności wielu białek komórkowych, które mają kluczowe znaczenie dla przeżycia komórek. Wykazano, że związki te hamują proliferację i migrację komórek nowotworowych, mają również działanie antyangiogenne. Należy jednak pamiętać, że niektóre substancje naturalne mogą

wykazywać toksyczność *in vivo*, jeśli podawane są w dużych dawkach (34). Dlatego możliwość praktycznego wykorzystania genisteiny i 3,3'-indolilometanu musi poprzedzać dokładna ocena ich biodostępności, mechanizmu działania, a także określenie, które z wielu mechanizmów działania tych związków są istotne klinicznie.

Piśmiennictwo

1. <http://epid.coi.waw.pl/krn/> 2. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL i wsp. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976; 35:1332-8.
3. Sporn MB, Suh N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:525-30
4. Szczepański MA, Grzanka A. Chemoprewencyjne i przeciwnowotworowe właściwości kurkuminy. *Nowotwory* 2009; 59:377-84.
5. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav_R2.pdf.
6. Radzikowski C, Wietrzyk J, Gryniewicz G i wsp. Genisteina – izoflawonoid soi o zróżnicowanym mechanizmie działania – implikacje kliniczne w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych. *Post Hig Med Dośw* 2004; 58:128-39.
7. Kwiatkowska E. Fitoestrogeny sojowe w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. *Post Fitoter* 2007; (4):207-11.
8. <http://edepot.wur.nl/121793>
9. Tomonaga T, Mine T, Kojima I i wsp. Isoflavonoids, genistein, psi-tectorigenin, and orobol, increase cytoplasmic free calcium in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182:894-9.
10. Kulling SE,

- Honig DM, Metzler M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem* 2001; 49:3024-33. **11.** Bolton JL, Yu L, Thatcher GR. Quinoids formed from estrogens and antiestrogens. *Meth Enzymol* 2004; 378:110-23. **12.** Gryniewicz G i wsp. Bioaktywny izoflawon genisteina – perspektywy zastosowań medycznych. *Post Fitoter* 2000; 3:15-20. **13.** Ball S. Naturalne substancje przeciwnowotworowe. *Medyk*, Warszawa 2000. **14.** Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M i wsp. Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst* 2003; 18:906-13. **15.** Cotterchio M, Boucher BA, Kreiger N i wsp. Dietary phytoestrogen intake – lignans and isoflavones – and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control* 2008; 19:259-72. **16.** Czerpak R, Pietryczuk A, Jabłońska-Trypuć A i wsp. Aktywność biologiczna izoflawonoidów i ich znaczenie terapeutyczne i kosmetyczne. *Post Fitoter* 2009; (2):113-21. **17.** McMichael-Phillips DF, Harding C, Morton M i wsp. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:1431-5. **18.** Grosicka-Maciąg E. Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów. *Post Hig Med Dośw* 2011; 65:357-66. **19.** Wei H, Bowen R, Cai Q i wsp. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208:124-30. **20.** Majewska M, Cieczot H. Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Farm Pol* 2009; 65:369-77. **21.** Mizia-Malarz A, Sobol G, Woś H. Angiogeneza w przewlekłych schorzeniach zapalnych i nowotworowych. *Pol Merk Lek* 2008; 141:185-9. **22.** Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *J Nutr* 1995; 125:790-7. **23.** Maliszewska M. Kurkumina, indolo-3-karbinol i resweratrol w chemoprewencji raka sutka. *Post Fitoter* 2013; (1):28-35 **24.** Wattenberg LW, Loub WD. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res* 1978; 38:1410-3. **25.** Le HT, Schaldach CM, Firestone GL i wsp. Plant-derived 3,3'-diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278:21136-45. **26.** Leong H, Firestone GL, Bjeldanes LF. Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor-alpha expression. *Carcinogenesis* 2001; 22:1809-17. **27.** Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. 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; 61:6120-30. **28.** Jin L, Qi M, Chen DZ i wsp. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999; 59:3991-7 **29.** Struciński P, Ludwicki JK, Góralczyk K i wsp. Wybrane aspekty działania ksenoestrogenów z grupy persystentnych związków chloroorganicznych. *Roczn Państw Zakł Hig* 2000; 3:211-28. **30.** Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH i wsp. Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 1998; 273:3838-47. **31.** Hong C, Firestone GL, Bjeldanes LF. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:1085-97. **32.** Weng JR, Tsai CH, Kulp SK i wsp. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett* 2008; 262:153-63. **33.** Kong D, Li Y, Wang Z. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and u-PA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67:3310-9. **34.** Howells LM, Moiseeva EP, Neal CP. Predicting the physiological relevance of *in vitro* cancer preventive activities of phytochemicals. *Acta Pharmacol Sin* 28:1274-304.

otrzymano/received: 10.06.2013
zaakceptowano/accepted: 15.07.2013

Adres/address:
*mgr Monika Maliszewska
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej
Śląski Uniwersytet Medyczny
ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec
tel.: +48 (32) 364-15-80
e-mail: monika.maliszewska@med.sum.edu.pl