

---

Natalija Ilijin

## Ispitivanje citotoksičnih i antiproliferativnih efekata izotiocijanatima bogatih ekstraktata crne slačice i brokolija na COS-7 ćelijsku liniju

---

*Ispitivan je uticaj alil izotiocijanatima (AITC) bogatih ekstraktata crne slačice (Brassica nigra) i sulforafanom (SPN) bogatih ekstraktata brokolija (Brassica oleracea) na imortalizovanu COS-7 ćelijsku liniju, u cilju poređenja dejstva ova dva ekstrakta, s obzirom na strukturnu sličnost alil izotiocijanata sa sulforafanom. Za sulforafan se zna da indukuje apoptozu kod kancerskih ćelija inhibicijom histon deacetilaze (HDAC), dok kod nekancerskih ćelija putem aktivacije Nrf2 podstiče antioksidativni odgovor. COS-7 ćelije tretirane su AITC-bogatim ekstraktom crne slačice (u koncentracijama 0,8, 2,4 i 4 µL/mL) i SPN-bogatim ekstraktom brokolija (4 µL/mL). Bojenjem akridin oranžom nisu ustanovljene promene u odnosu na kontrolne grupe. Komet esejem su detektovana oštećenja DNK kod grupa tretiranih AITC-bogatim ekstraktima crne slačice u koncentracijama od 2,4 i 4 µL/mL, dok u kontrolnim grupama oštećenja DNK nisu detektovana. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalno različito dejstvo AITC-bogatih ekstraktata crne slačice i SPN-bogatog ekstrakta brokolija na COS-7 ćelijsku liniju.*

---

### Uvod

Sulforafan je organosulfurno jedinjenje koje poseduje izotiocijanatnu grupu ( $-N=C=S$ ) sa alkil skeletom i sulfoksidnom grupom. Sulforafan je prisutan u kruciferanim biljkama, a najviše ga ima u brokoliju (*Brassica oleracea*) i to u ob-

liku glukozionalat glukorafanina. Usled mehaničkog oštećenja biljnog tkiva ili izlaganja niskim temperaturama dolazi do aktivacije enzima mirozinaze koji uklanja glukozidnu komponentu glukorafanina i transformiše ga u sulforafan (Perocco *et al.* 2006).

Oksidativni stres se javlja kao rezultat disbalansa u homeostazi prooksidanata i antioksidanata, što rezultuje prekomernom produkcijom slobodnih radikala ili reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i reaktivnih vrsta azota (RNS). ROS uključuju superoksid ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilne radikale ( $OH^-$ ) i druga jedinjenja. Mnoge studije su pokazale da ROS, prisutne u manjim koncentracijama, mogu indukovati prelaz iz G1 u S fazu i proliferaciju ćelija. Ipak, u prekomernim količinama ROS mogu da interaguju sa različitim molekulima u ćeliji i time izazovu oštećenja lipidnih i proteinskih komponenti ćelije. Svojim interakcijama sa molekulima ćelije, ROS remete i sve signalne puteve u ćeliji što dalje može dovesti do degeneracije ćelije ili apoptoze. Svojom aktivnošću ROS su u stanju da oštete i samu DNK izazivajući oksidaciju azotnih baza, ali i jednonančane i dvolančane prekide. Studije su pokazale da je oksidovana forma DNK jedna od najučestalijih u tumorskih tkivima (Li *et al.* 2002). U prethodnim studijama pokazana je i veza između povećane koncentracije ROS i supstitucije guanina u timin kod p53 gena. Istraživanja su pokazala i vezu između povećane količine oksidovanih baza kod kancera i inflamatornih oboljenja (Marnett *et al.* 2000).

---

Natalija Ilijin (1996), Stara Pazova, Svetozara Markovića 1, učenica 4. razreda Gimnazije „Branko Radičević”

MENTORI:

Anđelika Kalezić, student Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Ana Petronijević, student Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Enzimski antioksidansi u samoj ćeliji uključuju S-transferazu (GST), glutation reduktazu (GR), glutation peroksidazu (GPx), hem oksigenazu (HO1) i mnoge druge. Aktivnost ovih enzima regulisana je radom dva proteina: Nrf2 i Keap 1. Pokazano je da sulforafan ostvaruje svoju antioksidativnu aktivnost direktno delujući na Keap1 tako što se kovalentno vezuje za njegove tiolske grupe (Dinkova-Kostova *et al.* 2002). Na ovaj način sulforafan povećava ekspresiju Nrf2 koji se dalje vezuje za antioksidativne elemente odgovora u ćeliji (ARE) (Dinkova-Kostova *et al.* 2002).

Alil izotiocijanati su organosulforne komponente prisutne u velikoj koncentraciji u crnoj slačici (*Brassica nigra*). U crnoj slačici alil izotiocijanati postoje u obliku glukozinolata sinigrina, dok je proces transformacije glukozinolata sinigrina u alil izotiocijanat sličan procesu nastajanja sulforafana u brokoliju.

Zbog strukturne sličnosti alil izotiocijanata i sulforafana u ovom radu ispitivan je uticaj alil izotiocijanata bogatih ekstrakata crne slačice i sulforafanom-bogatog ekstrakta brokolija na immortalizovanu COS-7 ćelijsku liniju.

## Materijal i metode

**Ekstrakcija sulforafana iz brokolija.** Sulforafan je izolovan iz smrznutog brokolija. 250 g biljke je odležano i usitnjeno najpre sečenjem, a potom u blenderu. Uzorci su čuvani na 4°C oko sat vremena. U 40 uzorka je dodato 160 mL tople vode (50°C) i mešano na magnetnoj mešalici 5 min, a smeša je zatim centrifugirana (3500 min<sup>-1</sup>, 5min). Supernatant je filtriran, a sulforafan je ekstrahovan dihlormetanom u levku za odvajanje.

**Ekstrakcija alil izotiocijanata iz crne slačice.** Alil izotiocijanat je izolovan ekstrakcijom vodenom parom u dve paralelne ekstrakcije. 35 g crne slačice je usitnjeno u avanu i balon je napunjen do 500 mL destilovanom vodom. Ekstrahovani uzorci su skupljani u 15 mL dihlormetana. Ekstrakcije je trajala 2.5 sata. Ovako dobijeni ekstrakti su čuvani na -20°C.

**Ćelijske kulture.** COS-7 ćelije su kultivisane u RPMI 1640 medijumu sa 10% PBS, 1% Pen/Strep. Ćelije su čuvane u flaskovima i pločama sa 24/96 bunarčića u inkubatoru na 37°C i

vlažnosti vazduha od 95%, sa protokom ugljen-dioksida od 5%.

**Tretiranje ćelija.** COS-7 ćelije koje nisu bile tretirane predstavljale su kontrolnu grupu. Ćelije su tretirane SPN-bogatim ekstraktom brokolija u koncentraciji od 4 µL/mL (SPN) i AITC-bogatim ekstraktima crne slačice u koncentracijama od 0.8 µL/mL (AITC 1), 4 µL/mL (AITC 2) i 2.4 µL/mL (AITC 3).

**Bojenje akridin oranžom.** Akridin oranž bojenje je korišćeno za detekciju nivoa kondenzacije hromatina u ćelijama, kao i eventualnih jednolančanih regiona DNK, korišćen akridin oranž. Na taj način, omogućeno je analiziranje faza ćelijskog ciklusa, eventualnih oštećenja DNK i apoptoze.

COS-7 ćelije su presejane na pokrovna stakalca u Petrijevim šoljama tako da na svakom pokrovnom stakalcu bude 5×10<sup>3</sup> ćelija. Ćelije su inkubirane 24 h na 37°C. Grupe ćelija su ispitivane u duplikatima. Nakon tretmana ćelije su isprane PBS puferom, pa je na svako pokrovno staklo u petri šolji dodato 200 µL rastvora akridin oranža, koncentracije 10 µg/mL, rastvorenog u PBS-u i ćelije su bojene 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, petri šolje su ispirane PBS-om, a zatim su ćelije fiksirane sa 1 mL 4% paraformaldehida 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon još jednog ispiranja u PBS-u ćelije su analizirane na konfokalnom mikroskopu (Olympus Fluoview FV1000).

**Komet esej.** Komet esej je tehnika korišćena da bi se ustanovila potencijalna oštećenja DNK nakon tretmana ćelija pri čemu broj prekida na samom lancu DNK direktno korelira sa dužinom „komete”.

Za ovaj test korišćene su COS-7 ćelije koje su presejane na pločama sa 24 bunarčića tako da u svakom bunarčiću bude 1×10<sup>4</sup> ćelija i inkubirane 24 h na 37°C.

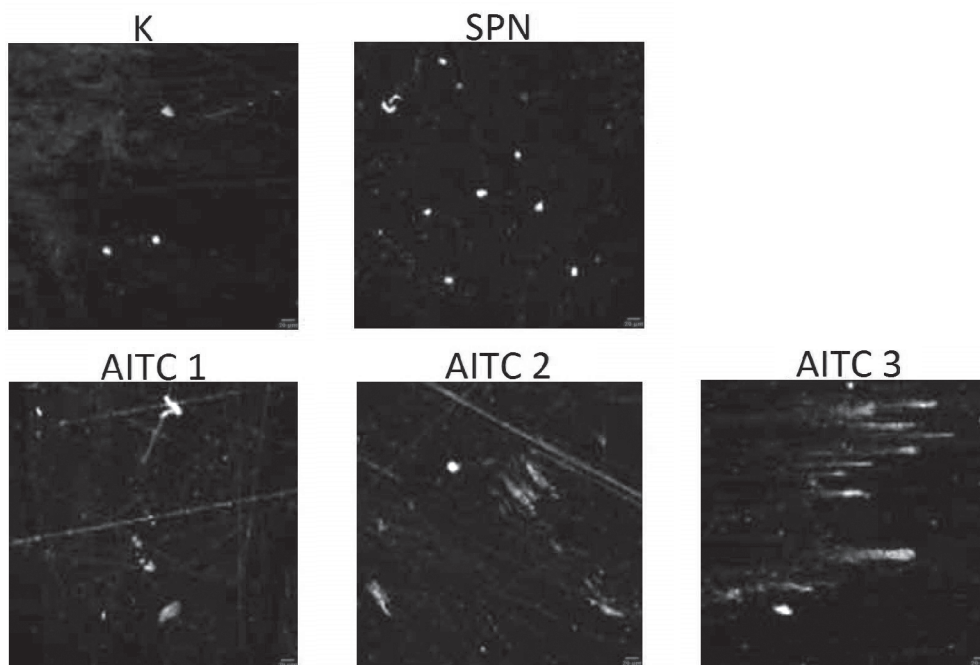
Predmetna stakalca su potopljena u rastvor agaroze koncentracije 0.75×10<sup>-2</sup> g/mL. Potom je 0.065 g agaroze sa niskom tačkom topljenja (Low-melting agarose-LMA) dodato u 10 mL ranije spremljenog rastvora PBS. Rastvor je zagrevan do tačke ključanja. U svaku Eppendorf tubu u vodenom kupatilu (37°C) dodato je 250 µL LMA koji je zatim pomešan sa suspenzijama COS-7 ćelija negativne kontrole i suspenzijama ćelija tretiranih ekstraktom sulforafana (SPN) i

ekstraktima alil izotiocijanata (AITC 1, AITC 2, AITC 3). Sadržaj iz ependorf tuba je naliven na predmetna stakla, preko čega je stavljeno pokrovno stakalce. Pripremljena stakalca su ostavljena 1-2 min na ledu, a potom 1-2 min u frižider. Pripremljen je pufer za liziranje (2.136 M NaCl, 0.124 M Na<sub>2</sub>EDTA i 11 mM Tris), pH 10. 30 min pre početka ekperimenta u pufer je dodato 2mL Triton X-100 i 20 mL DMSO). Pločice su stavljene u komoricu i prelivene puferom za liziranje. Pufer za elektroforezu (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA i 0.3 M NaOH, a pH je podešen na 13) je spremljen dok su ćelije na pokrovnim stakalcima lizirane u trajanju od 2 h. Nakon liziranja ćelija, pločice su prebačene u komoru za elektroforezu i prelivene puferom. Elektroforeza je izvršena u trajanju od 30 min pri 25 V i 300 mA. Neutralizacija baza izvršena je u 0.4 M Tris puferu

pri pH 7.5. Spremljen je pufer za neutralizaciju (0.4 M Tris podešen na 7.5, rastvor je prebačen u frižider). Predmetna stakla su vraćena u sud u kom su ćelije lizirane i prelivene su puferom za neutralizaciju. U 100 mL destilovane vode rastvoreno je 80 µL etidijum bromida koji je korišćen za bojenje DNK. Maksimalno vreme bojenja jedne pločice bilo je 1 min. Ćelije su analizirane na konfokalnom mikroskopu (Olympus Fluoview FV1000).

## Rezultati

Rezultati bojenja akridin oranžom nisu pokazali razlike između ćelija tretiranih ekstraktima i kontrolne grupe. Nukleusi su emitovali samo zelenu fluorescenciju, te u ćelijama pre



Slika 1. Rezultati komet eseja.

Netretirane COS-7 ćelije predstavljale su negativnu kontrolnu grupu (K). COS-7 ćelije su tretirane SPN-bogatim ekstraktom brokolija u koncentraciji od 4 µL/mL (SPN) i ekstraktom i AITC-bogatim ekstraktom crne slačice u koncentraciji od 0.8 µL/mL (AITC 1), 4 µL/mL (AITC 2) i 2.4 µL/mL (AITC 3).

Figure 1. Results of the comet assay.

Untreated COS-7 cells represented a negative control group (K). COS-7 cells were treated with SPN-rich broccoli extract in concentrations of 4 µL/mL (SPN) and with AITC-rich black mustard extract in concentrations of 0.8 µL/mL (AITC 1), 4 µL/mL (AITC 2) and 2.4 µL/mL (AITC 3).

svega imamo dvolančanu DNK, dok je sam hromatin dekonkondenzovan.

Kako bi se ispratio efekat alil izotiocijanata na DNK rađen je komet esej i grupe ćelija su posmatrane na konfokalnom mikroskopu. Kod grupe tretirane ekstraktom sulforafana 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (SPN) i ekstraktom alil izotiocijanata u koncentraciji od 0.8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (AITC 1) nije primećeno prisustvo kometa. U grupi tretiranoj ekstraktom alil izotiocijanata u koncentraciji od 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (AITC 2) primećeno je prisustvo kometa sa kratkim repom, dok je u koncentraciji od 2.4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (AITC3) primećeno prisustvo kometa sa jasno izraženim i dugim repom (slika 1).

## Diskusija i zaključak

Sulforafan iskazuje različit vid delovanja na kancerske i nekancerske ćelijske linije. Pokazano je da sulforafan kod nekancerskih linija ostvaruje antioksidativnu aktivnost direktno delujući na Keap1, kovalentno se vezujući za njegove tiol grupe (Dinkova-Kostova *et al.* 2002). Na ovaj način sulforafan povećava ekspresiju Nrf2 koji se vezuje za antioksidativne elemente odgovora u ćeliji (ARE). Kod kancerskih ćelijskih linija sulforafan iskazuje antikancersko dejstvo putem inhibicije histon deacetilaze (HDAC). HDAC su enzimi koji smanjuju nivo acetilacije histona, čime posredno dovode do smanjenja intenziteta transkripcije, što za posledicu ima nemogućnost ekspresije tumor-supresorskih gena. U kancerskim ćelijama prostate inhibicija HDAC sulforafanom dovodi do intenzivnije interakcije acetilovanog H4 histona sa promoterskim regionom p21 i bax gena, što dalje rezultira zaustavljanjem ćelijskog ciklusa i apoptozom kancerskih ćelija (Myzak *et al.* 2007).

S obzirom na strukturnu sličnost sulforafana i alil izotiocijanata moglo bi se pretpostaviti da ova jedinjenja pokreću slične procese kod kancerskih i nekancerskih ćelija, međutim dosadašnja istraživanja alili izotiocijanata pokazuju u znatnoj meri kontradiktorne rezultate.

Kod kancerskih ćelija alil izotiocijanati, slično sulforafanu, pokazuju antikancersko dejstvo. Mehanizam antikancerskog dejstva dovodi se u vezu sa zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G1 fazi (Tang *et al.* 2004; Hasegawa *et al.* 1993; Smith *et al.* 2004), odnosno sa stimulacijom ace-

tilacije histona nedovoljno ispitanim mehanizmima (Lea *et al.* 2001).

Nasuprot sulforafanu, alil izotiocijanati pokazuju dvojako dejstvo na nekancerske ćelije. Ukoliko su nekancerske ćelije prethodno izložene nekom vidu stresa oni iskazuju protektivno dejstvo i to na sličan način kao i sulforafan, povećavajući ekspresiju Nrf2 (Jeong *et al.* 2005). Nasuprot, kada su nekancerske ćelije izožene samo alil izotiocijanatom, oni pokazuju određeno genotoksično dejstvo (Kassie *et al.* 2000; Murata *et al.* 2000; Charron *et al.* 2013)

Rezultati bojenja COS-7 ćelija akridin oranžom nisu pokazali razlike između ćelija tretiranih ekstraktima bogatim alil izotiocijanatom i kontrolnih grupa. Bojenjem akridin oranžom nisu detektovana oštećenja DNK, niti anomalije u strukturi hromatina, kao ni jasne naznake apoptotsko-nekrotičnih procesa.

Rezultati komet eseja su pokazali da nakon tretmana sulforafanom bogatim ekstraktom brokolija nije došlo do oštećenja DNK, dok je nakon tretmana alil izotiocijanatom bogatim ekstraktima crne slačice primećen porast intenziteta oštećenja DNK sa porastom koncentracije ekstrakta.

Prethodna *in vivo* istraživanja su pokazala prisustvo reverzibilnih DNK oštećenja kod polimorfonuklearnih ćelija periferne krvi, gde su rezultati komet eseja 3 h nakon tretmana pokazali znatna DNK oštećenja u odnosu na kontrolne grupe, dok rezultati istog tipa testa nakon 6 h nisu pokazali razliku u intenzitetu oštećenja između tretiranih i kontrolnih grupa. Ovakvi rezultati prvobitno su pripisani aktivaciji mehanizama reparacije DNK.

U ovom radu, testiranje je vršeno 12 h nakon tretmana COS7 ekstraktima crne slačice, kada su detektovana izvesna DNK oštećenja. Kako bi se utvrdilo da li su, i u kojoj meri, oštećenja DNK pod uticajem alil izotiocijanata reverzibilnog karaktera, dalja istraživanja neophodno je sprovesti na različitim ćelijskim linijama, sa preciznom karakterizacijom intenziteta oštećenja u različitim vremenskim intervalima.

Pored toga, dalja istraživanja u pravcu frakcionisanja ekstrakata različitih krucifernih biljaka dala bi potpuniji uvid u uticaj pojedinačnih alil izotiocijanata, kako na nekancerske tako i na kancerske ćelije.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da alil izotiocijanati, iako ne poseduju citotoksično dejstvo na nekancerske ćelije, poseduju izvestan genotoksični potencijal.

---

## Literatura

Charron C., Clevidence B., Albaugh G., Kramer M., Vinyard B., Milner J., Novotny J. 2013. Assessment of DNA damage and repair in adults consuming allyl isothiocyanate or Brassica vegetables. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **24** (5): 894.

Dinkova-Kostova A., Holtzclaw W., Cole R., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., *et al.* 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99** (18): 11908.

Hasegawa T., Nishino H., Iwashima A. 1993. Isothiocyanates inhibit cell cycle progression of HeLa cells at G2/M phase. *Anti-Cancer Drugs*, **4** (2): 273.

Jeong W., Keum Y., Chen C., Jain M., Shen G., Kim J., *et al.* 2005. Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells. *Journal of Biochemistry and molecular biology*, **38** (2): 167.

Kassie F., Knasmüller S. 2000. Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chemico-Biological Interactions*, **127** (2): 163.

Li D., Firozi P., Zhang W., Shen J., DiGiovanni J., Lau S., *et al.* 2002. DNA adducts, genetic polymorphisms, and K-ras mutation in human pancreatic cancer. *Mutation Research / Genetic*

*Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **513** (1-2): 37.

Murata M., Yamashita N., Inoue S., Kawanishi S. 2000. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. *Free Radical Biology and Medicine*, **28** (5): 797.

Lea M., Randolph V., Lee J., desBordes C. 2001. Induction of histone acetylation in mouse erythroleukemia cells by some organosulfur compounds including allyl isothiocyanate. *International Journal of Cancer*, **92** (6): 784.

Marnett L. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21** (3): 361.

Myzak M., Dashwood M., Orner G., Ho E., Dashwood R. 2007. Sulforaphane Retards the Growth of Human PC-3 Xenografts and Inhibits HDAC Activity in Human Subjects. *Experimental Biology and Medicine*, **232** (2): 227.

Perocco P., Bronzetti G., Canistro D., Valgimigli L., Sapone A., Affatato A., *et al.* 2006. Glucoraphanin, the bioprecursor of the widely extolled chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, induces Phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **595** (1-2): 125.

Tang L., Li G., Song L., Zhang Y. 2006. The principal urinary metabolites of dietary isothiocyanates, N-acetylcysteine conjugates, elicit the same anti-proliferative response as their parent compounds in human bladder cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, **17** (3): 297.

Smith T. 2004. Allyl-isothiocyanate causes mitotic block, loss of cell adhesion and disrupted cytoskeletal structure in HT29 cells. *Carcinogenesis*, **25** (8): 1409.

---

Natalija Ilijin

## Examination of the Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Isothiocyanates-Rich Black Mustard Extract (*Brassica nigra*) and Sulforaphane-Rich Broccoli Extract (*Brassica oleracea*) on the COS-7 Cell Line

In this study we examined the effect of allyl isothiocyanate-rich black mustard extract (*Brassica nigra*) and sulforaphane-rich broccoli extract on the immortalized COS-7 cell line in order to compare the influence of allyl isothiocyanates from black mustard to the influence of sulforaphane (SPN) from broccoli (*Brassica oleracea*). It has been shown that sulforaphane in-

duces apoptosis in cancer cells by inhibiting histone deacetylase (HDAC), while in noncancerous cells it activates Nrf2 and stimulates its antioxidative response. The influence of black mustard extract was compared to the previously described effect of sulforaphane based on structural similarities of allyl isothiocyanates with sulforaphane. COS-7 cells were treated with different concentration of AITC-rich black mustard extract (0.8, 2.4 and 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) and SPN-rich broccoli extract (4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Acridine orange staining showed no difference among the treatments. DNA damage was detected by comet assay in groups treated with AITC-rich black mustard extract at concentrations of 2.4 and 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , while no damage was detected in SPN-rich broccoli extract or in the control group. Data obtained in this study potentially indicates that AITC-rich black mustard extract and SPN-rich broccoli extract exhibit different effects on the COS-7 cell line. ☺