



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2017, 2, 8-15
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

MECHANIZM DZIAŁANIA INDOLO-3-KARBINOLU I 3,3'-DIINDOLIOMETANU W CHEMOPREWENCJI CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Teresa Żółek*, Aleksandra Trzeciak

Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

* autorka korespondująca, tel.: +4822 5720 659, e-mail: tzolek@wum.edu.pl

Otrzymano 1.02.2017, zaakceptowany 6.03.2017, zamieszczony 29.03.2017

STRESZCZENIE

Pochodne indolu to aromatyczne, heterocykliczne związki organiczne, które mają duże znaczenie przy poszukiwaniu nowych substancji leczniczych. Indolo-3-karbinol (I3C) i 3,3'-diindolilometan (DIM) występują naturalnie w roślinach krzyżowych, ale ich pochodne są także syntetyzowane w laboratorium. Wyniki badań *in vitro* wskazują, że I3C oraz DIM hamują proliferację komórek nowotworowych w fazie G1 i wywołują ich apoptozę. Dowiedziono, że mają wpływ na metabolizm estrogenów. Mikromacierzowe profilowanie ekspresji genów wskazuje, że pochodne indolu regulują ekspresję wielu genów, które mają istotne znaczenie dla kontroli cyklu komórkowego, apoptozy komórek, transdukcji sygnałowej, w angiogenezie oraz inwazji komórek. W badaniach na modelach zwierzęcych stwierdzono, że pochodne indolu zapobiegają powstawaniu nowotworów piersi i szyjki macicy. W badaniach klinicznych (faza II i III) oceniono I3C i DIM jako potencjalne środki chemoprewencyjne do stosowania w profilaktyce i wczesnych etapach rozwoju nowotworów piersi, jajnika oraz śródnaabłonkowej neoplazji sromu. Dokładny mechanizm molekularny działania przeciwnowotworowego pochodnych indolu wciąż jest przedmiotem badań. Omawiane związki (I3C i DIM) są składnikami suplementów diety, zalecanych do prewencyjnego stosowania przy chorobach nowotworowych.

SŁOWA KLUCZOWE: indolo-3-karbinol, 3,3'-diindolilometan, chemoprewencja, rak szyjki macicy, rak piersi, rośliny kapustowate.

ABSTRACT

THE MECHANISM OF ACTION OF INDOLE-3-CARBINOL AND 3,3'-DIINDOLYLMETHANE IN CANCER CHEMOPREVENTION

Indole derivatives are aromatic heterocyclic organic compounds important in the development of new pharmaceuticals. Indole-3-carbinole (I3C) and 3,3'-diindolylmethane (DIM) occur naturally in cruciferous plants, but their derivatives can be also obtained synthetically. *In vitro* studies indicate that I3C and DIM inhibit cancer cell proliferation at the G1 phase and induce their apoptosis. It has been demonstrated that they alter estrogen metabolism. Microarray gene expression profiling indicates that indole derivatives affect the expression of multiple genes that are involved in the control of the cell cycle, apoptosis, signal transduction, angiogenesis, and cell invasion. It was found that in animal models indole derivatives prevent the onset of breast and cervical cancer. In phase II and phase III clinical trials, I3C and DIM have been identified as a potential chemopreventive agents against human breast and ovarian cancer, and vulvar intraepithelial neoplasia. The precise molecular mechanism, by which indole derivatives exert their tumor suppressive effects is still under study. I3C and DIM are components of dietary supplements recommended in cancer prevention.

KEYWORDS: indole-3-carbinol, 3,3'-diindolylmethane, chemoprevention, cervical cancer, breast cancer, *Brassicaceae* plants.

1. Wstęp

Nowotwory od wielu lat są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Najnowsze statystyki Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wskazują, że liczba osób chorych na nowotwory w 2025 r. wzrośnie do 19 mln, w 2030 - do 22 mln, a w 2035 - aż do 24 mln [1]. W związku ze wzrastającą liczbą osób chorych jednym z najważniejszych celów współczesnej nauki są badania nad nowymi środkami leczniczymi o skuteczności przeciwnowotworowej. Obecnie projektowanie leków przeciwnowotworowych zmierza w kierunku tworzenia substancji zapobiegających skutkom zmian genetycznych prowadzących do kancerogenezy [2].

Poszukuje się nowych związków działających bardziej selektywnie, które jednocześnie nie wykazują działań niepożądanych. Równoległe do poszukiwań nowych leków przeciwnowotworowych propaguje się profilaktykę. Zaleca się poprawę stylu życia, obejmującą zmianę złych nawyków żywieniowych, zwiększenie aktywności fizycznej oraz profilaktykę farmakologiczną. W ostatnich latach znacznie zwiększyło się zainteresowanie jedną z form profilaktyki jaką jest chemoprewencja [3-6].

Chemoprewencja jest metodą polegającą na stosowaniu naturalnych lub syntetycznych substancji w celu zahamowania, odwrócenia lub opóźnienia kancerogenezy u osób

z wysokim ryzykiem rozwoju chorób nowotworowych. W dzisiejszych czasach na rynku dostępnych jest wiele substancji chemoprewencyjnych. Należą do nich środki farmakologiczne oraz substancje pochodzenia naturalnego, do których należą związki znajdujące się w warzywach z rodziny *Brassicaceae*, hamujące proces nowotworzenia na poszczególnych etapach kancerogenezy.

Badania epidemiologiczne wykazują, że zwiększone spożywanie substancji znajdujących się w warzywach krzyżowych (kapusta, brukselka, brokuły, kalafior) sprzyja zmniejszeniu częstości występowania chorób nowotworowych u ludzi. Działanie ochronne warzyw z rodziny *Brassicaceae* dotyczy przede wszystkim raka jelita grubego [7,8], raka żołądka [9], raka piersi [10,11], tarczycy [12], międzybłoniaka optycznej [13], szyjki macicy [14] oraz raka gruczołu krokowego [10]. W celu potwierdzenia działania antykancerogenego warzyw krzyżowych zostały przeprowadzone badania na zwierzętach [15-17].

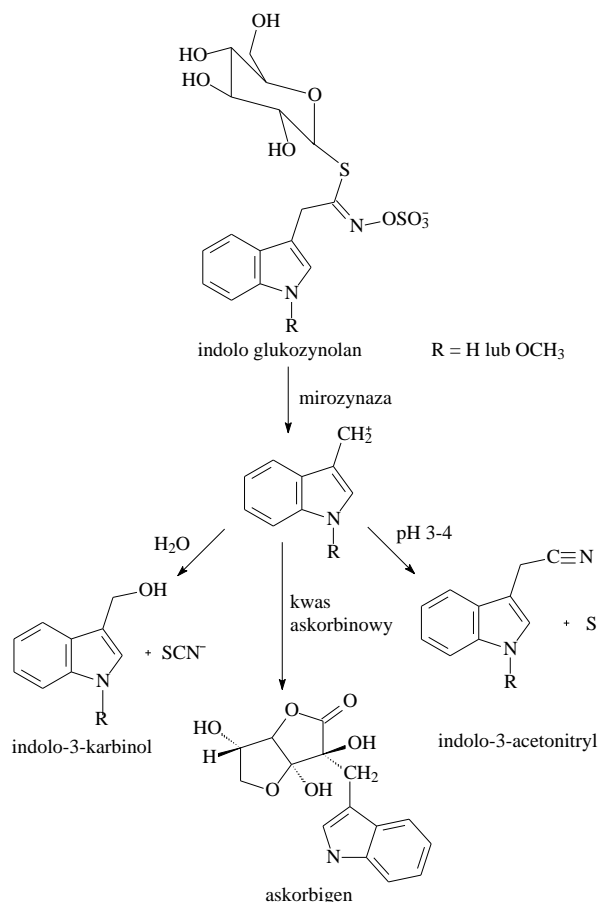
Warzywa z rodziny *Brassicaceae* zawierają duże ilości glukozylanów, takie jak glukobrassycyna i neoglukobrassycyna [18-19]. Glukobrassycyna ulega hydrolizie za pomocą enzymu mirozynyazy, który występuje w komórkach roślinnych rodziny *Brassicaceae*. Enzym ten jest uwalniany z komórek w procesach mechanicznych np. w czasie żucia w jamie ustnej, czy podczas przygotowywania potraw. Inaktywacja mirozynyazy następuje w temp. 90°C. Proces degradacji glukozylanów przebiega w różny sposób w zależności od pH środowiska. Produktami hydrolizy są: tiocyaniany, izotiocyaniany, nityle i indole (ryc. 1). Hydroliza glukobrassycyny prowadzi do powstania indolo-3-karbinolu (I3C) [20].

I3C jest niestabilny w kwaśnym środowisku jakiego panuje w żołądku człowieka, gdzie ulega reakcji kondensacji do wielopierścieniowych pochodnych [21]. Głównymi produktami tych reakcji chemicznych są: 3,3'-diindolilometan (DIM), triindolilometan oraz indolo[3,2-b]karbazol (ryc. 2) [22,23].

Podczas przeprowadzania badań dotyczących metabolizmu I3C stwierdzono obecność wielu jego pochodnych, które wykazywały działanie przeciwnowotworowe [21,24]. Najwięcej informacji na temat przemian glukobrassycyny pochodzi z badań *in vitro*, które nie uwzględniają obecności kwasu L-askorbinowego. Tymczasem dowiedziono, że podczas degradacji glukobrassycyny oraz neoglukobrassycyny w obecności kwasu L-askorbinowego powstaje askorbigen, związek odpowiedzialny za działanie przeciwnowotworowe i detoksykacyjne diety bogatej w rośliny *Brassicaceae*. Oszacowano, że w zależności od pH środowiska znaczna część (20-60%) indolowych glukozylanów ulega kondensacji do askorbigenu [25,26]. Askorbigen w żołądku ulega dalszej przemianie do indolo[3,2-b]karbazolu. Stwierdzono, że stężenie indolo[3,2-b]karbazolu jest 20 razy większe podczas przemiany indolo-3-karbinolu w obecności kwasu L-askorbinowego niż podczas przemiany samego I3C. Głównym produktem kondensacji indolo-3-karbinolu u ludzi, zidentyfikowanym w płazmie i moczu badanych ochotników, był 3,3'-diindolilometan [27].

Jak wykazują badania, *in vitro* związki znajdujące się w roślinach *Brassicaceae* wykazują największą skuteczność w zapobieganiu nowotworom piersi, szyjki macicy i endometrium [28,29]. Właściwości antykancerogenne tych związków wynikają przede wszystkim z ich wpływu na cykl komórkowy, naprawę uszkodzonego DNA, apoptozę komórek nowotworowych oraz ograniczenie namnażania komó-

rek nowotworowych [30]. Ponadto wykazują zdolność do indukowania ekspresji enzymów fazy II i inhibicję enzymów fazy I odpowiedzialnych za aktywację metaboliczną kancerogenów [31] oraz wpływają na procesy metaboliczne estrogenów [32] i hamują procesy zapalne.

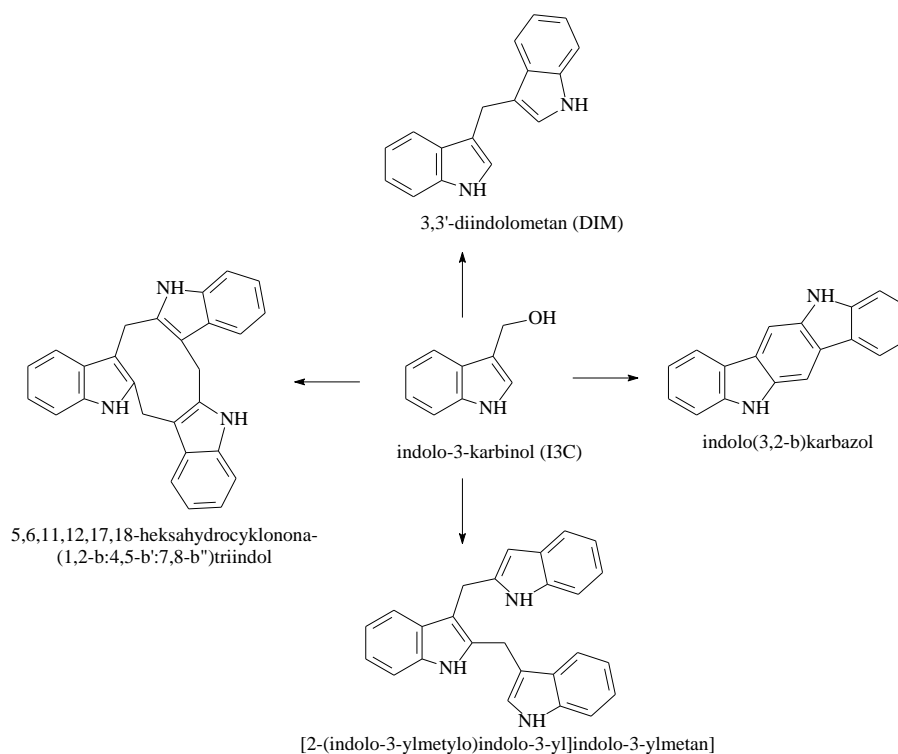


Ryc. 1. Schemat hydrolizy glukobrassycyny i dalszej reakcji z kwasem askorbinowym.

Spśród wielu pochodnych indolu z I3C i DIM wiązane są wielkie nadzieje na opracowanie preparatów skutecznych w prewencji chorób nowotworowych. Jako naturalny składnik diety mogą stanowić istotny czynnik strategii w profilaktyce. Niniejsza publikacja przedstawia mechanizmy działania dwóch pochodnych indolu (I3C i DIM, ryc. 2), które pojawiły się na rynku jako składniki suplementów diety wspomagających profilaktykę nowotworów piersi i szyjki macicy.

2. Mechanizm molekularny działania I3C i DIM na nowotwór piersi

Rak piersi jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych u kobiet. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia w 2012 roku zdiagnozowano 1,67 mln nowych przypadków tej choroby, co stanowi 25% wszystkich nowotworów u kobiet [33]. Okazuje się, że główną przyczyną wzrastającej zachorowalności jest późna diagnostyka. Dlatego działania służące wczesnemu wykrywaniu raka piersi powinny skupić się na badaniach osób niemających objawów choroby nowotworowej i profilaktyce.



Ryc. 2. Schemat reakcji indolo-3-karbinolu zachodzących w kwaśnym środowisku.

Zmniejszenie ryzyka można osiągnąć spożywając pomidory, marchew i zielone warzywa bogate w antyoksydanty i witaminy. Eksperymentalne badania wykazały, że u myszy, którym wstrzyknięto dożylnie komórki guza sutka i jednocześnie karmiono suszonymi liśćmi kapusty, zaobserwowano zmniejszoną częstość przerzutów do płuc w porównaniu z tymi, którym nie podawano kapusty [34].

Ważną rolę odgrywa promocja właściwego odżywiania. Wiadomo, że podwyższony poziom 17- β -estradiolu i obecność funkcjonalnego receptora estrogenu w ludzkiej tkance piersiowej zwiększają ryzyko powstania stanu nowotworowego [35,36]. Stwierdzono, że spożycie roślin krzyżowych wpływa na metabolizm 17- β -estradiolu. Zwiększa się stężenie 2-hydroksyestronu (2-OHE₁) w stosunku do 16- α -hydroksyestronu (16- α -OHE₁). Pierwszy z nich wykazuje słabe działanie estrogenne, natomiast drugi może sprzyjać ekspresji onkogenów, dlatego też zwiększenie produkcji 2-OHE₁ i zmniejszenie syntezy 16- α -OHE₁ znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia raka piersi u kobiet [37]. I3C oraz DIM, jak również soki z zielonych warzyw wpływają na ekspresję genów z rodziny CYP1, które kodują kluczowe enzymy syntezy estrogenów [38]. Zwiększenie ekspresji CYP1A1 powoduje wzrost stężenia 2-hydroksyestronu w komórkach sutka [39]. Wykazano, że I3C i jego metabolity znacznie zmniejszają ekspresję receptorów estrogenowych alfa (ER α) w komórkach raka piersi [29,40] i hamują wzrost komórek rakowych zarówno hormonozależnych jak i niezależnych od hormonów.

Przeprowadzono wiele badań wpływu I3C i jego metabolitów na rozwój linii komórkowych ludzkiego raka piersi. Nie zawsze zdefiniowano, czy aktywność związana jest z obecnością I3C czy DIM ze względu na możliwość transformacji I3C w DIM. Uważa się, że I3C zmniejsza poziom kinaz zależnych od cyklin CDK2, CDK4, CDK6 oraz aktywuje ekspresję genu supresorowego p21 oraz p27. Powoduje to zmniejszanie fosforylacji białka Rb [41], które zapobiega

przejściu komórki z uszkodzonym DNA przez fazę G1 i jej wejściu w fazę S. Dzięki temu uszkodzona komórka nie replikuje się [42]. Inne badania wykazały, że I3C wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach raka piersi przez hamowanie CDK6, ale dopiero w wysokim stężeniu ok. 200 μ M [43]. I3C wpływa też na aktywację fosforylacji białka p53. Aby p53 mogło aktywować ekspresję czynników proapoptotycznych (np. BAX) musi być odpowiednio ufosforylowane. Odpowiadają za ten proces kinazy - HIPK2 oraz MAPK. Inaktywacja białka p53 w komórkach nowotworowych jest zjawiskiem powszechnym, przebiegającym w wyniku działania dwóch głównych mechanizmów. Jednym z nich jest zaburzenie regulacji białka p53 przez jego główny negatywny regulator w komórce - białko MDM2 [44]. I3C zakłóca interakcję białka p53 z białkiem MDM2, w wyniku tego białko p53 jest nadal zdolne do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 [45]. Inne badania sugerują, że I3C wywołuje fosforylację kinazy fosfatydyloinozytolowej-3 (PI3K/AKT), aktywuje p53, indukuje inhibitor CDK białka p21^{WAF1} powodując zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Ponadto, badania przeprowadzone w wielu laboratoriach wykazywały, że obie pochodne indolu są silnymi induktorami apoptozy w komórkach nowotworowych raka piersi [43,46-49]. DIM odgrywa kluczową rolę w indukowaniu apoptozy komórek raka piersi poprzez inaktywację ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K/AKT) oraz jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [50]. PI3K/AKT jest ważnym mediatorem inicjującym przekazywanie sygnałów w komórkach i odgrywa ważną rolę w kontrolowaniu przeżywalności komórek i apoptozy. PI3K/AKT regulują aktywację NF- κ B bezpośrednio przez aktywację kinazy białka I κ B (IKK) lub fosforylację RelA [51]. NF- κ B działa jako czynnik przetrwania w komórkach nowotworowych, indukując transkrypcję genów kodujących białka o antyapoptotycznym działaniu, takich jak surwiwina, p53 i BclXL. Blokowanie przez DIM NF- κ B

zatrzymuje proliferację komórek nowotworowych. Związki I3C i DIM pobudzają również ekspresję genów supresorowych BRCA-1 i BRCA-2 w komórkach raka piersi. Białka kodowane przez te geny odgrywają ważną rolę w utrzymaniu stabilności genomu poprzez udział w mechanizmie naprawy DNA. Indolo-3-karbinol moduluje także ekspresję szeregu białek sygnalizacyjnych, takich jak MMP-9, E-kadheryny oraz receptora chemokinowego CXCR4, które związane są z inwazją i migracją komórek raka piersi [52].

Inne badania wykazały, że I3C obniża ekspresję receptora epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR) w komórkach ludzkiego raka sutka i wywołuje zatrzymanie cyklu komórkowego oraz apoptozę komórek nowotworowych [53]. Ponadto wykazano, że DIM wywołuje hiperpolaryzację wewnętrzną membrany mitochondriów, spadek poziomu ATP komórkowego oraz znacząco stymuluje produkcję reaktywnych form tlenu (ROS). Reaktywne formy tlenu pełnią między innymi rolę mediatorów w procesach wzrostu, dojrzewania i apoptozy komórek, jak również odpowiadają za powstawanie i utrzymywanie stanu zapalnego oraz regulują poziom energii w komórkach. Produkcja ROS doprowadza do aktywacji kinaz aktywowanych stresem z udziałem kinazy NH₂-terminalnej c-Jun (JNK) oraz białka p38, którego funkcja jest zbliżona do kinaz z grupy JNK (funkcją kinaz aktywowanych stresem jest pośrednictwo w działaniu czynników stresowych: cytokin, promieniowania ultrafioletowego, szoku cieplnego, szoku osmotycznego oraz zaangażowanie w różnicowanie komórek i ich apoptozę).

Rolę obu pochodnych indolu w profilaktyce i leczeniu raka piersi badano na modelach zwierzęcych. Badania wykazały, że dieta bogata w warzywa z rodziny *Brassicaceae* znacznie obniża częstość występowania raka sutka indukowanego przez *N*-metylo-*N*-nitromocznik u samic szczurów *Sprague-Dawley* [54]. Ponadto stwierdzono, że doustne podawanie samicom szczurów DIM lub I3C przed podaniem czynnika kancerogennego DMBA (7,12-dimetylobenzo [a]antracen) spowalnia powstawanie nowotworu sutka [55].

Zaobserwowano także zdolność hamowania angiogenezy przez DIM. Wyniki wykazują, że DIM silnie hamuje migrację, inwazję i tworzenie kapilar w hodowlach ludzkich komórek pępowinowych śródbłonka żyły. Na bazie przeprowadzonych badań *in vivo* na podłożu hodowlanym *Matrigel*TM, stwierdzono że podanie dawki 5 mg/kg DIM-u hamuje neowaskularyzację o 76% w porównaniu do nieleczonych zwierząt. Dodatkowo ta sama dawka DIM również hamowała rozwój ludzkich komórek raka piersi MCF-7 nawet o 64% u samic myszy pozbawionych grasicy. Co ciekawe, nie stwierdzono utraty wagi lub uszkodzenia głównych organów zwierzęcych [56]. Inne badania wykazują, że podawanie I3C spowolniło powstawanie kapilar w komórkach śródbłonka EA hy926, które były stymulowane przez octan mirystynianu forbolu (PMA). Spowodowało to zahamowanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) i jego receptora VEGF-R [57]. Udowodniono także, że ekstrakty wyizolowane z brokuł zmniejszają inwazję komórek rakowych indukowaną mutagenem TPA (13-octan-12-O-tetradekanoiloforbol) oraz aktywność metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-9), ograniczając inwazyjność komórek raka piersi *in vitro* [58].

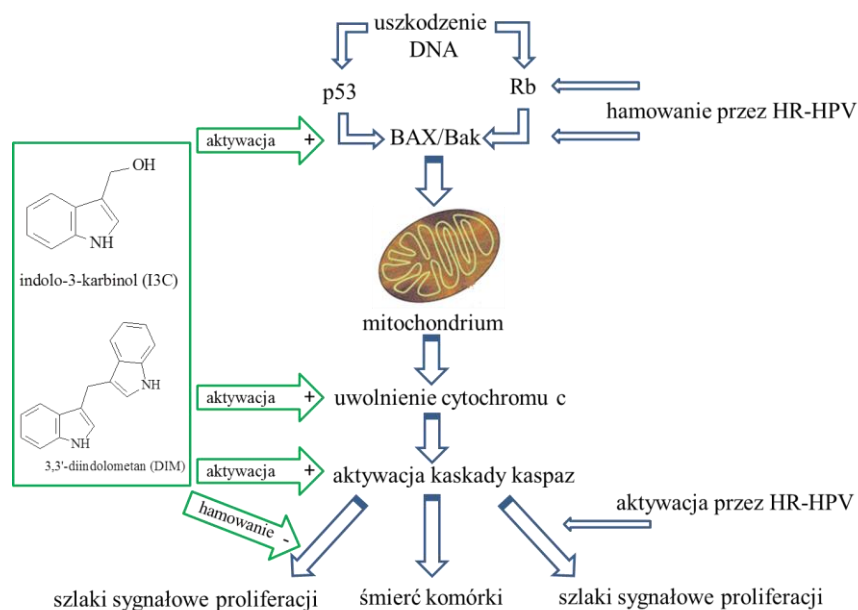
3. Mechanizm molekularny działania I3C i DIM na nowotwór szyjki macicy

W etiologii raka szyjki macicy najważniejszą rolę odgrywa zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV)

[59]. Wirusy brodawczaka zakażają warstwę podstawną komórek nabłonkowych, a pełny ich cykl życiowy zachodzi tylko w zróżnicowanych keratynocytach. Biorąc pod uwagę potencjał onkogenny tych wirusów, możemy je podzielić na wirusy niskiego ryzyka (HPV 6, 11, 42, 43, 44), średniego ryzyka (HPV 26, 53, 66) i wysokiego ryzyka HR-HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82). W komórkach raka szyjki macicy znajdowane są głównie wirusy HPV obdarzone wysokim potencjałem onkogennym (przede wszystkim HPV16 i HPV18). Obecność DNA tych wirusów wykrywano w ponad 99% badanych nowotworów szyjki macicy.

Kancerogeneza wywołana przez HPV zachodzi w kilku punktach cyklu komórkowego. Warunkiem progresji zmian śródnabłonkowych szyjki macicy jest ekspresja onkogenów E6 i E7 HPV oraz produkcja znacznych ilości wirusowych białek onkogennych E6/E7. Wirusowe onkoproteiny mają zdolność wiązania z komórkowymi produktami genów supresorowych p53 i Rb, co prowadzi do zaburzenia cyklu komórkowego i blokowania procesów apoptozy, w związku z czym następuje transformacja komórek nabłonkowych.

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań epidemiologicznych wykazują, że dieta wzbogacona w warzywa zielone zmniejsza ryzyko wystąpienia nowotworów szyjki macicy [60]. Metoda analizy ekspresji genów przy pomocy mikromacierzy pozwoliła ocenić wpływ I3C i DIM na zmiany funkcji ok. 700 genów; niektóre z nich wyraźnie zmniejszały ekspresję onkogenów HPV [61]. Z powodu braku możliwości hodowli *in vitro* wirusa HPV, badania zostały przeprowadzone na liniach komórek raka zawierającego zróżnicowaną postać zintegrowanego i episomalnego DNA HPV. Hamowanie ekspresji onkogenów przez I3C (50 - 300 μM) i DIM (100 μM) uzyskano również na szeregu pochodnych guza, gdzie linie komórkowe badano mikromacierzą półilościową RT-PCR. Transkrypcja białka regulatorowego GADD153 była wywołana w linii komórkowej raka szyjki macicy C33A zarówno przez I3C, jak i DIM w ciągu 4 godzin [62]. W innym badaniu oceniono, że w połączeniu z BRCA1, związek I3C (10-125 μM) hamuje aktywność transkrypcji ER-α w liniach komórkowych raka szyjki macicy [63]. Może to prowadzić do zmniejszenia proliferacji komórek i efektów przeciwnowotworowych. Na ryc. 3 przedstawiono miejsca kluczowe procesu apoptozy, na które wpływają pochodne indolu i HR-HPV. Uszkodzone DNA aktywuje geny supresorowe p53 i białko Rb. Produkty tych genów zapobiegają wejściu komórki w fazę S. Jeżeli uszkodzenia DNA są na tyle poważne, że nie mogą być naprawione, to zostanie aktywowana czynność proapoptotyczna genów BAX/Bak. Powoduje to uwolnienie cytochromu c z mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego. Uwolniony cytochrom c aktywuje kaskady kaspaz, które ostatecznie prowadzą do śmierci komórki. HR-HPV hamuje białko Rb, w związku z tym zostaje uwolniony czynnik transkrypcyjny E2F, który ostatecznie umożliwia proliferację komórek rakowych. HPV zapobiega także apoptozie poprzez hamowanie czynników proapoptycznych (BAX/Bak). Dodatkowo, HPV aktywuje szlaki sygnalizacji komórkowej, które są przyczyną proliferacji komórek w późniejszym etapie apoptozy. Natomiast pochodne indolu sprzyjają apoptozie komórek nowotworowych poprzez stymulowanie genów supresorowych transformacji nowotworowej, takich jak BRCA oraz przez aktywację czynników proapoptycznych i hamowanie proliferacyjnych szlaków sygnałowych komórki.



Ryc. 3. Uproszczony schemat wpływu na apoptozę HR-HPV i chemoprewencyjnych pochodnych indolu I3C i DIM.

Ochronne właściwości indolo-3-karbinolu mogą również wynikać z jego działania antyestrogenowego, w wyniku którego zmniejsza się ryzyko nowotworów hormonozależnych, jak rak szyjki macicy. Badania sugerują, że I3C/DIM i estrogeny mają przeciwstawne działanie na komórki. Estrogen pobudza wzrost guza, natomiast I3C hamuje jego wzrost. U myszy transgenicznym K14 HPV16 podczas podawania estrogenów zaobserwowano rozwijanie się nowotworu szyjki macicy. Natomiast jeżeli podawano im równolegle I3C, rak szyjki macicy nie rozwijał się [64]. Otrzymane wyniki badań są zgodne z wieloma przeprowadzonymi badaniami *in vitro*, które wskazują, że estrogen sprzyja proliferacji komórek nowotworowych raka szyjki macicy, a I3C powoduje zatrzymanie ich wzrostu [65]. Wykonując badania immunohistochemiczne, podczas których stosowano przeciwciała monoklonalne PCNA, zarówno u myszy transgenicznym jak i normalnym, którym jednocześnie podawano w diecie I3C, zaobserwowano zahamowanie wzrostu nowotworu. Inne badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, że podanie I3C i DIM prowadzi do zmniejszenia populacji myszy z rozwiniętą postacią tego nowotworu. Oceniono, że skuteczność przeciwnowotworowa wzrasta wraz ze wzrostem dawki I3C i DIM [66].

W badaniach klinicznych kobietom, u których wykryto nieprawidłowe komórki szyjki macicy, podawano I3C w kapsułkach w dawkach 200 i 400 mg/dzień przez okres 12 tygodni. W trakcie tych badań zaobserwowano regresję dysplazji śródnabłonkowej szyjki macicy (CIN) u 50% pacjentek, którym podawano 200 mg/dzień i u 44% u pacjentek, którym podawano 400 mg/dzień. Wykazano również niewielki wzrost poziomu 2-hydroksyestronu w stosunku do 16- α -hydroksyestronu, który był zależny od dawki [67].

Dalsze badania kliniczne z wykorzystaniem I3C przeprowadzono na próbkach moczu populacji kobiet pochodzących z grupy zwiększonego ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy, aby ustalić korelację między spożywaniem I3C a regresją dysplazji śródnabłonkowej szyjki macicy [27]. Przeprowadzone testy uwzględniały przemianę I3C w DIM w soku żołądkowym i pozwoliły określić, że DIM może

być użyty jako marker spożycia I3C podczas badania nad działaniem I3C.

4. Potencjalne działania niekorzystne I3C i DIM

Niektóre wyniki badań przeprowadzonych w kilku laboratoriach wykazały zagrożenia związane z dużymi dawkami I3C i DIM. I3C stymulował rozwój nowotworu, kiedy podano go w sposób ciągły po czynniku rakotwórczym. W badaniach na szczurach wykazano, że I3C powodował przeciwny do chemoprewencyjnego wpływ na nowotwór macicy. Związek ten podawany doustnie jest słabo toksyczny (dawka śmiertelna LD₅₀ dla szczurów wynosi 1400-1800 mg/kg masy ciała), natomiast po podaniu pozajelitowym jest bardziej szkodliwy (LD₅₀ wynosi ok. 400 mg/kg masy ciała). Wpływ długotrwałej suplementacji I3C na ryzyko wystąpienia raka u ludzi nie jest jeszcze do końca poznany, ale niejednoznaczne wyniki badań na zwierzętach stanowią ostrzeżenie przed nadmiernym wzbogaceniem diety w I3C i produkt jego kondensacji DIM [68].

5. Podsumowanie

Zainteresowanie chemoprewencją w ostatnich latach znacznie wzrosło. Wiele badań wykazało, że pochodne indolu I3C i DIM wywierają działanie przeciwnowotworowe poprzez: zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, indukcję apoptozy, transdukcję sygnału w komórce, hamowanie angiogenezy i tłumienie inwazji komórek nowotworowych. Aktywacja szlaku mitochondrialnego przez uwolnienie cytochromu c oraz pobudzenie kaskady kaspaz wraz z dezaktywacją hormonalną ścieżki PI3K/AKT, MAPK, Bcl-2 i NF- κ B składają się na skomplikowany mechanizm molekularny aktywności przeciwnowotworowej obu związków. Przeprowadzając badania na liniach ludzkich komórek rakowych, różnych modelach zwierzęcych oraz oceniając wyniki badań klinicznych [69], udowodniono potencjał przeciwnowotworowy I3C i DIM między innymi w odniesieniu do raka piersi i szyjki macicy.

Ponieważ I3C i DIM występują w warzywach kapustnych, warzywa te zalecane są w zdrowej diecie. Właściwa dieta i styl życia nie gwarantują pełnej ochrony przed ża-

ną chorobą. Potencjalne korzyści zdrowotne to zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia choroby, a nie gwarancja całkowitej ochrony przed nią.

Podziękowania

Autorki pragną wyrazić serdeczne podziękowania prof. dr hab. Dorocie Maciejewskiej za udzielone wsparcie merytoryczne i edytorskie, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy.

6. Wykaz skrótów

AKT	kinaza białkowa (ang. <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
Bak	białko pro-apoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. <i>Bcl-2 antagonist killer 1</i>)
BAX	białko pro-apoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. <i>Bcl-2-associated protein X</i>)
Bcl	rodzina białek pro- i anty-apoptotycznych oraz białko anty-apoptotyczne (ang. <i>B-cell leukemia-2</i>)
BclXL	inhibitorowe białko apoptozy (ang. <i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
BRCA	geny człowieka, których mutacje mogą stać się przyczyną dziedzicznych form raka piersi i jajnika (od ang. <i>breast cancer</i>)
BRCA1	gen zlokalizowany na chromosomie 17 (ang. <i>breast cancer 1</i>)
BRCA2	gen zlokalizowany na chromosomie 13 (ang. <i>breast cancer 2</i>)
CDK	kinaza cyklinozależna (ang. <i>cyclin-dependent kinase</i>)
PCNA	jądrowy antygen komórek proliferujących (ang. <i>proliferation cell nuclear antigen</i>)
CIN	wewnątrz nabłonkowa neoplazja szyjki macicy (ang. <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
CYP	cytochrom P450 (ang. <i>cytochrome P450</i>)
CXCR4	receptor dla chemokiny SDF-1 (ang. <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>)
DIM	diindolilometan (ang. <i>diindolylmethane</i>)
DMBA	inicjator nowotworowy (ang. <i>7,12-dimethylbenz[a]anthracene</i>)
E2F	rodzina czynników transkrypcyjnych w wyższych komórkach eukariotycznych (ang. <i>group of genes that codifies a family of transcription factors</i>)
EGFR	receptor czynnika wzrostu naskórka (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ER	receptor estrogenowy (ang. <i>estrogen receptor</i>)
ERK	kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
HIPK2	enzym u człowieka kodowany przez gen HIPK2 (ang. <i>homeodomain-interacting protein kinase 2</i>)
HPV	wirus brodawczaka ludzkiego (ang. <i>human papilloma virus</i>)
IKK	kinaza inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. <i>Inhibitor of nuclear factor-κB kinase</i>)
I3C	indolo-3-karbinol (ang. <i>indole-3-carbinol</i>)
JNK	kinaza NH ₂ -terminalna c-jun (ang. <i>c-jun N-terminal kinase</i>)

MAPK	kinaza białka aktywowanego przez mitogen (ang. <i>mitogen activated protein kinase</i>)
MCF-7	linia komórkowa estrogenozależnego gruczolakoraka piersi (ang. <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>)
MDM2	E3 ligaza ubikwityny (ang. <i>mouse double minute 2</i>)
MMP-9	metaloproteinaza błonowa (ang. <i>matrix metalloproteinases-9</i>)
NF- κ B	jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NIK	kinaza indukująca czynnik NF- κ B (ang. <i>NF-κB - inducing kinase</i>)
16- α -OHE1	16- α -hydroksyestron (ang. <i>16-α-hydroxyestrone</i>)
2-OHE1	2-hydroksyestron (ang. <i>2-hydroxyestrone</i>)
PI3K	3 kinaza fosfatydyloinozytolu (ang. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>)
p21 ^{WAF1}	inhibitor cyklinozależnych kinaz (ang. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>)
p27	inhibitor cyklinozależnych kinaz (ang. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>)
Rb	białko Rb/białko retinoblastoma (ang. <i>Rb protein, retinoblastoma protein</i>)
RelA	białko RelA/produkt genu RelA (ang. <i>nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
TPA	tkankowy aktywator plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGF-R	receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

7. Bibliografia

1. Stewart BW, Wild CP, International Agency for Research on Cancer, WHO. World Cancer Report 2014.
2. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin A.A, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane^o-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu KG, Yu J, Aspesi P, de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palascandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Stacey B, Gad G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris LJ, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA, The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012, 483, 603-607.
3. Landis-Piwowar KR, Iyer NR, Cancer Chemoprevention: Current State of the Art. *Cancer Growth Metastasis*. 2014, 7, 19-25.
4. Maru GB, Hudlikar RR, Kumar G, Gandhi K, Mahimkar MB, Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World J. Biol. Chem.* 2016, 7 (1), 88-89.
5. Kotecha R, Takami A, Espinoza JL, Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget* 2016, 7, No.32, 52517-52529.
6. Drvesh AS, Bishave A, Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutr Cancer* 2013, 65(3), 329-344.

7. Higdon JV, Delage B, Williams DV, Dashwood RH, Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis. *Pharmacol Res.* 2007, 55(3), 224-236.
8. Lynn A, Collins A, Fuller Z, Hillman K, Ratcliffe B, Cruciferous vegetables and colo-rectal cancer. *Proc Nutr Soc* 2006, 65(1), 135-144.
9. Wu Q J, Yang Y, Wang J, Li HH, Xiang YB, Cruciferous vegetable consumption and gastric cancer risk: A meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Sci* 2013, 104, 1067-1073.
10. Lopezotín C, Diamandis EP, Breast and Prostate Cancer: An Analysis of Common Epidemiological, Genetic, and Biochemical Features. *Endocrine Reviews* 1998, 19(4), 365-396.
11. Jung S, Spiegelman D, Baglietto L, Bernstein L, Boggs DA, Van den Brandt PA, Buring JE, Cerhan JR, Gaudet MM, Giles GG, Goodman G, Hakansson N, Hankinson SE, Helzlsouer K, Horn-Ross PL, Inoue M, Krogh V, Lof M, McCullough ML, Miller AB, Neuhauser ML, Palmer JR, Park Y, Robien K, Rohan TE, Scarmo S, Schairer C, Schouteneo LJ, Shikany JM, Sieri S, Tsugane S, Visvanathan K, Weiderpass E, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zhang SM, Zhang X, Ziegler RG, Smith-Warner SA, Fruit and Vegetable Intake and Risk of Breast Cancer by Hormone Receptor Status. *JNCI* 2013, 105, 219-236.
12. Kolonel N, Hankin JH, Wilkens LR, Fukunaga FH, Hinds MW, An epidemiologic study of thyroid cancer in Hawaii. *Cancer Causes Control* 1990, 1, 223-234.
13. Schiffman MH, Pickle LW, Fontham E, Zahm SH, Falk R, Mele J, Correa P, Fraumeni JFJ, Case-control study of diet and mesothelioma in Louisiana. *Cancer Res.* 1988, 48(10), 2911-2915.
14. Auburn KJ, Can Indole-3-Carbinol-Induced Changes in Cervical Intraepithelial Neoplasia Be Extrapolated to Other Food Components? *J Nutr* 2006, 136, 26765-26785.
15. Dashwood RH, Indole-3-carbinol: Anticarcinogen or tumor promoter in brassica vegetables? *Chemico-Biological Interactions* 1998, 110, 1-5.
16. Rahman WKM, Sarkar FH, Banerjee S, Wang Z, Liao DJ, Hong X, Sarkar N. H., Therapeutic intervention of experimental breast cancer bone metastasis by indole-3-carbinol in SCID-human mouse model. *Mol Cancer Ther* 2006, 5(11), 2747-2756.
17. Le Marchand L, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Vegetables and fruit consumption in relation to prostate cancer risk in Hawaii: a reevaluation of the effect of dietary beta-carotene. *Am J Epidemiol.* 1991, 133, 215-219.
18. Keck A, Finley JW, Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Int Cancer Ther* 2004, 3(1), 5-12.
19. Angelino D, Jeffery E, Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *J Fun Foods* 2014, 7, 67-76.
20. Grose KR., Bjeldanes LF, Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chem Res Toxicol* 1992, 5, 188-193.
21. Anderton MJ, Jukes R, Lamb J, Manson MM, Gescher A, Steward WP, Williams ML, Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of indole-3-carbinol and its acid condensation products in plasma. *J Chrom. B.* 2003, 787, 281-291.
22. Aggarwal BB., Ichikawa H, Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 2005, 4(9), 1201-1215.
23. Grose KR, Bjeldanes LF, Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chem Res Toxicol* 1992, 5, 188-193.
24. Stresser DM, Williams DE, Griffin DA, Bailey GS, Mechanisms of tumor modulation by indole-3-carbinol. Disposition and excretion in male Fischer 344 rats. *Drug Metabol Disposit* 1995, 23 (9), 965-975.
25. Hrnčirik K, Valusek J, Valisek J, Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in *Brassica* vegetables. *Eur Food Res Technol* 2001, 212, 576 - 581.
26. Buskov S, Hansen LB, Olsen CE, Sorensen JC, Sorensen H, Determination of ascorbigen in autolysates of various brassica species using supercritical fluid chromatography. *J Agr Food Chem* 2000, 48 (7), 2693-2701.
27. Sepkovic DW, Bradlow HL, Ball M, Quantitative determination of 3,3'-diindolylmethane in urine of individuals receiving indole-3-carbinol. *Nutr Cancer* 2001, 41, 57-63.
28. Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen CS, Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett* 2008, 262, 153-163.
29. Aubom KJ, Fan S, Rosen EM, Goodwin L, Chandrasekaran A, Williams DE, Chen D, Carter TH, Indole-3-Carbinol Is a Negative Regulator of Estrogen. *J Nutr* 2003, 133, 24705-24755.
30. Maliszewska M, Kurkumina, indolo-3-karbinol i resweratrol w chemoprewencji raka sutka. *Postępy Fitoterapii* 2013, 1, 28-35.
31. Szwejdka-Grzybowska J, Antykancerogenne składniki warzyw kapustnych i ich znaczenie w profilaktyce chorób nowotworowych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2011, XLIV, 4 1039-1046.
32. Dżugan M, Znaczenie warzyw kapustnych w profilaktyce nowotworów. *Zdrowie Publiczne* 2007, 117 (3), 397-401.
33. www.globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
34. Suto A, Bradlow HL, Wong GY, Osborne MP, Telang NT, Persistent estrogen responsiveness of ras oncogene-transformed mouse mammary epithelial cells. *Steroids* 1992, 57, 262-268.
35. Bradlow HL, Hershcopf RJ, Martucci CP, Fishman J, Estradiol 16 alpha-hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: a possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82(18), 6295-6299.
36. Bradlow HL, Hershcopf R, Martucci C, Fiszman J, 16 α -Hydroxylation of Estradiol: A Possible Risk Marker for Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1986, 464, 138-151.
37. Emaus MJ, Peeters PH, Bakker MF, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Romieu I, Ferrari P, Dossus L, Boutron-Ruault MC, Baglietto L, Fortner RT, Kaaks R, Boeing H, Trichopoulos A, Laggiou P, Trichopoulos D, Masala G, Pala V, Panico S, Tumino R, Polidoro S, Skeie G, Lund E, Weiderpass E, Quirós JR, Travier N, Sánchez MJ, Chirlaque MD, Ardanaz E, Dorronsoro M, Winkvist A, Wennberg M, Bueno de Mesquita HB, Khaw KT, Travis RC, Key TJ, Aune D, Gunter M, Riboli E, Van Gils CH, Vegetable and fruit consumption and the risk of hormone receptor-defined breast cancer in the EPIC cohort. *Am J Clin Nutr* 2016, 103, 168-177.
38. Parkin DR, Malejka-Giganti D, Differences in the hepatic P-450-dependent metabolism of estrogen and tamoxifen in response to treatment of rats with 3,3'-diindolylmethane and its parent compound indole-3-carbinol. *Cancer Detect. Prev.* 2004, 28, 72-79.
39. Jin L, Qi M, Chen DZ, Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999, 59, 3991-3997.
40. Wang TT, Milner MJ, Milner JA, Kim YS, Estrogen receptor alpha as a target for indole-3-carbinol. *Journal of Nutr. Biochem.* 2006, 17, 659-664.
41. Brandi G, Paiardini M, Cervasi B, Fiorucci C, Filippone P, Marco C, Zaffaroni N, Magnani M, A New Indole-3-Carbinol Tetrameric Derivative Inhibits Cyclin-dependent Kinase 6 Expression, and Induces G1 Cell Cycle Arrest in Both Estrogen-dependent and Estrogen-independent Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 2003, 63, 4028-4036.
42. Das SK, Hashimoto T, Shimizu K, Yoshida T, Sakai T, Sowa Y, Komoto A, Kanazawa K, Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G₀/G₁ phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Bioch Biophys Acta* 2005, 1726, 328-335.
43. Cram EJ, Liu BD, Bjeldanes LF, Firestone GL, Indole-3-carbinol inhibits CDK6 expression in human NCF-7 breast cancer cell by disrupting Sp1 transcription factor interactions with a composite element in the CDK6 gene promoter. *J Biol Chem* 2001, 276, 22332-22340.
44. Vousden KH, Lu X, Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 594-604.
45. Marconett CN, Singhal AK, Sundar SN, Firestone GL, Indole-3-carbinol disrupts estrogen receptor-alpha dependent expression of insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 and proliferation of human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012, 363, 74-84.
46. Brew CT, Aronchik I, Hsu JC, Sheen JH, Dickson RB, Bjeldanes LF, Firestone GL, Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *Int J Cancer* 2006, 118, 857-868.

47. Brew CT, Aronchik I, Kosco K, McCammon J, Bjeldanes LF, Firestone GL, Indole-3-carbinol inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell motility and induces stress fibers and focal adhesion formation by activation of Rho kinase activity. *Int J Cancer* 2009, 124, 2294-2302.
48. Rahman KM, Aranha O, Sarkar FM, Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. *Nutr Cancer* 2003, 45, 101-112.
49. Rahman KM, Sarkar FM, Inhibition of nuclear translocation of nuclear factor-(kappa)B contributes to 3,3'-diindolylmethane-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005, 65, 364-371.
50. Rajoria S, Suriano R, Wilson YL, Schantz SP, Moscatello A, Geliebter J, Tiwari R K, 3,3'-diindolylmethane inhibits migration and invasion of human cancer cells through combined suppression of ERK and AKT pathways. *Oncol Reports* 2011, 25(2), 491- 497.
51. Ahmad A, Biersack B, Li Y, Kong D, Bao B, Schobert RB, Padhye SH, Sarkar F, Targeted Regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF-κB Signaling by Indole Compounds and their Derivatives: Mechanistic Details and Biological Implications for Cancer Therapy. *Curr. Med. Chem.* 2013, 13, 1002-1013.
52. Ławicki S, Zajkowska M, Głażewska EK, Będowska GE, Szmitkowski M, Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-9, and TIMP-1 in the diagnosis of patients with breast cancer. *Oncology Targets Therapy* 2016, 9, 911-919.
53. Moiseeva EP, Heukers R, Manson MM, EGFR and Src are involved in indole-3-carbinol-induced death and cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2006, 28, 435-445.
54. Bresnick E, Birt DF, Wolterman K, Wheeler M, Markin RS, Reduction in mammary tumorigenesis in the rat by cabbage and cabbage residue. *Carcinogenesis* 1990, 11 (7), 1159-1163.
55. Lubet RA, Heckman BM, De Flora SL, Steele VE, Crowell JA, Juliana MM, Grubbs CJ, Effects of 5,6-benzoflavone, indole-3-carbinol (I3C) and diindolylmethane (DIM) on chemically-induced mammary carcinogenesis: is DIM a substitute for I3C? *Oncology Reports* 2011, 26 (3), 731-736.
56. Nguyen HH, Lavrenov SN, Sundar SN, Nguyen DH, Tseng M, Marconett CN, Kung J, Staub RE, Preobrazhenskaya MN, Bjeldanes LF, Firestone GL, 1-Benzyl-indole-3-carbinol is a novel indole-3-carbinol derivative with significantly enhanced potency of anti-proliferative and anti-estrogenic properties in human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2010, 186 (3), 255-266.
57. Wang ML, Lin SH, Hou YY, Chen YH, Suppression of Lipid Accumulation by Indole-3-Carbinol Is Associated with Increased Expression of the Aryl Hydrocarbon Receptor and CYP1B1 Proteins in Adipocytes and with Decreased Adipocyte-Stimulated Endothelial Tube Formation. *Int J Mol Sci* 2016, 17 (8), 1256-1267.
58. Rose P, Huang Q, Ong CN, Whiteman M, Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol Applied Pharmacol* 2005, 209, 105-113.
59. Bosch FX, de Sanjosé S, Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003, 31, 3-13.
60. Byers T, Nishikawa A, Manson M, Seow A, Hecht S, Dragsted L, Stoner G, Agudo A, Bradlow L, Zhang Y, Chung FL, Taioli E, Thornalley J, Johnson I, Vang O, Kassie F, Schut H, Bailey G, Hayes J, Loft S, Mithen R, Miller A, Cruciferous vegetables, Isothiocyanates and Indoles. *Handbook of Cancer Prevention*, IARC Press, Lyon 2004, 9.
61. Carter TH, Liu K, Ralph WJ, Chen D, Qi M, Fan S, Yuan F, Rosen EM, Auburn KJ, Diindolylmethane Alters Gene Expression in Human Keratinocytes In Vitro. *J. Nutr.* 2002, 132, 3314-3324.
62. Carter TH, Liu K, Ralph WJ, Chen D, Qi M, Fan S, Yuan F, Rosen EM, Auburn KJ, Diindolylmethane alters gene expression in human keratinocytes in vitro. *J Nutr* 2002, 132(11), 3314-3324.
63. Meng Q, Yuan F, Goldberg ID, Rosen EM, Auburn K, Fan S, Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells. *J. Nutr.* 2000, 130, 2927-2931.
64. Sepkovic DW, Pagan DV, Stein J, Carlisle AD, Ksieski HB, Auburn K, Nyirenda T, Bradlow HL, Evaluation of 3,3'-Diindolylmethane with Gardasil Quadrivalent HPV Vaccine in K14-HPV16 -Transgenic Mice Cervical Histology. *In Vivo* 2013, 27, 299- 304.
65. Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D, Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93, 2930-2935.
66. Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM, Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res.* 1999, 59, 3991-3997.
67. Bell MC, Crowlay-Nowick P, Bradlow HL, Sepkovic DW, Schmidt-Grimmingen D, Howell P, Mayeaux EJ, Tucker A, Turbat-Herrera EA, Mathis JM, Placebo-Controlled Trial of Indole-3-Carbinol in the Treatment of CIN. *Gynecologic Oncology* 2000, 78, 123-129.
68. Dashwood RH, Indole-3-carbinol: anticarcinogen or tumor promoter in Brassica vegetables? *Chem Biol Interact* 1998, 110, 1-5.
69. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01391689>, 2016.