

Imię i nazwisko autora rozprawy: Tadeusz Pilipczuk  
Dyscyplina naukowa: Nauki techniczne - biotechnologia

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Opracowanie nowych metodyk oznaczeń ilościowych i jakościowych izotiocyanianów oraz związków indolowych w próbkach roślin z rodziny *Brassicaceae*.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: The development of new methodologies for quantitative and qualitative determination of isothiocyanates and indolic compounds in samples of plants belonging to the *Brassicaceae* family.

Promotor
<i>podpis</i>
Dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek-Pączkowska, prof. nadzw. PG
Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>
Dr inż. Barbara Kusznierewicz

Gdańsk, rok 2016

**Składam serdeczne podziękowania:**

**Prof. dr hab. inż. Agnieszce Bartoszek**

*za opiekę, zaangażowanie, ogromne wsparcie merytoryczne oraz przede wszystkim za cierpliwość i poświęcony mi czas*

**Dr inż. Barbarze Kusznierewicz**

*za przekazaną wiedzę oraz rzeczowe konsultacje w trakcie realizacji prac laboratoryjnych i dydaktycznych*

**Prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi**

*za możliwość wykonywania prac badawczych w Katedrze Chemii Analitycznej oraz motywowanie do nieprzerwanej pracy*

**Prof. dr hab. inż. Ilonie Kołodziejkiej**

*za poświęcony czas oraz wskazówki do sprawozdań*

**Dominikowi, Izbie, Ani oraz Tomkowi**

*za okazaną życzliwość, cenne rady i stworzenie miłej i niezapomnianej atmosfery*

**Rodzinie**

*za niezłomną wiarę w powodzenie obranej przeze mnie ścieżki i wsparcie jakie otrzymałem na każdym jej etapie*

**Żonie**

*za cierpliwość, wyrozumiałość i dobre słowo*

**Opracowanie nowych metodyk oznaczeń ilościowych i jakościowych  
izotiocyanianów oraz związków indolowych w próbkach roślin z rodziny  
*Brassicaceae***

Podstawę niniejszej dysertacji stanowią publikacje:

- Załącznik I**      **Biofumigacja jako przyjazna środowisku technologia ochrony roślin.**  
T. Pilipczuk, A. Piekarska, B. Kusznierevicz, A. Bartoszek, J. Namieśnik, *Analityka Nauka i Praktyka*, 2013, 1, str. 36-46
- Załącznik II**      **Simultaneous determination of indolic compounds in plant extracts by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection.**  
T. Pilipczuk, N. Dawidowska, B. Kusznierevicz, J. Namieśnik, A. Bartoszek, *Food Analytical Methods*, 2015, 8(9), str. 2168-2177
- Załącznik III**      **Composition of bioactive secondary metabolites and mutagenicity of *Sambucus nigra* L. fruit at different stages of ripeness.**  
I. Koss-Mikołajczyk, A. Lewandowska, T. Pilipczuk, B. Kusznierevicz, A. Bartoszek, *Acta Alimentaria*, 2016, 45(3), str. 442-451
- Załącznik IV**      **The influence of selenium addition during germination of Brassica seeds on health-promoting potential of sprouts.**  
A. Piekarska, D. Kołodziejcki, T. Pilipczuk, M. Bodnar, P. Konieczka, B. Kusznierevicz, F. Hanschen, M. Schreiner, J. Cyprys, M. Groszewska, J. Namieśnik, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2013, 65(6), str. 692-702
- Załącznik V**      **The innovative exploitation of brassica vegetables in the health quality food production chain.**  
A. Piekarska, B. Kusznierevicz, D. Kołodziejcki, T. Pilipczuk, M. Szczygłowska, M. Bodnar, R. Bączek-Kwinta, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek, *Acta horticulturae*, 2013, 1005, str. 71-85
- Załącznik VI**      **Simultaneous determination of individual isothiocyanates in plant samples by HPLC-DAD-MS following SPE and derivatization with N-acetyl-L-cysteine.**  
T. Pilipczuk, B. Kusznierevicz, T. Chmiel, W. Przychodzeń, A. Bartoszek, *Food Chemistry*, 2017, 214, str. 587-596



## Spis treści

Wykaz skrótów i akronimów .....	5
1. Streszczenie .....	7
2. Abstract .....	8
3. Wstęp .....	9
4. Mechanizmy obronne roślin kapustowatych .....	10
5. Rośliny kapustowate w ochronie upraw .....	11
6. Rośliny kapustowate w ochronie zdrowia .....	12
6.1. Związki bioaktywne roślin kapustowatych .....	13
6.1.1. Związki indolowe .....	13
6.1.2. Izotiocyjaniany .....	14
6.1.3. Badania epidemiologiczne .....	16
7. Cel i zakres pracy .....	18
8. Wyniki badań .....	19
9. Podsumowanie .....	22
10. Dorobek naukowy .....	24
11. Bibliografia .....	29



## Wykaz skrótów i akronimów

<b>3-MTPITC</b>	Izotiocyanian 3-metylotiopropylu
<b>4-MTBITC</b>	Izotiocyanian 4-metylotiobutylu
<b>AITC</b>	Izotiocyanian allilu
<b>BITC</b>	Izotiocyanian benzylu
<b>DAD</b>	Detektor z matrycą fotodiodową
<b>DMBA</b>	7,12-Dimetylobenz(α)antracen
<b>DIM</b>	3,3'-Diindolilometan
<b>DNA</b>	Kwas deoksyrybonukleinowy
<b>EITC</b>	Izotiocyanian etylu
<b>FLD</b>	Detektor fluorescencyjny
<b>GC</b>	Chromatografia gazowa
<b>GLS</b>	Glukozytolany
<b>GSH</b>	Glutation zredukowany
<b>GST</b>	S-Transferazy glutationowe
<b>HPLC</b>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>HDAC</b>	Deacetylaza histonowa
<b>I3AA</b>	Kwas indolilo-3-octowy
<b>I3ACN</b>	Indolo-3-acetonitryl
<b>I3C</b>	Indolo-3-karbinol
<b>ITC</b>	Izotiocyaniany
<b>MITC</b>	Izotiocyanian metylu
<b>MS</b>	Spektrometria mas
<b>NFκB</b>	Jądrowy czynnik transkrypcyjny κB
<b>NAC</b>	N-Acetylo-L-cysteina
<b>NCN</b>	Narodowe Centrum Nauki
<b>NMR</b>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
<b>PEITC</b>	Izotiocyanian fenyletylu





<b>PITC</b>	Izotiocyjanian fenylu
<b>SFN</b>	Sulforafan
<b>SPE</b>	Ekstrakcja do fazy stałej
<b>UV</b>	Ultrafiolet

## 1. Streszczenie

Izotiocyaniany (ITC) i indole powstające w wyniku hydrolizy glukozynolanów obecnych w roślinach z rodziny *Brassicaceae* wykazują wysoką aktywność biobójczą w stosunku do fitofagów stanowiąc alternatywę dla syntetycznych pestycydów. Zaliczane są także do najważniejszych żywieniowych substancji przeciwzapalnych i przeciwrakotwórczych. Pomimo wielu zastosowań dotychczas brakowało metod analitycznych umożliwiających ich rutynowe oznaczanie.

Zaproponowana w pracy doktorskiej metodyka oznaczania indoli wykorzystuje technikę SPE na etapie wzbogacania próbki oraz technikę HPLC-DAD-FLD na etapie wykonywania oznaczeń ilościowych i jakościowych. Przedstawione rozwiązanie daje możliwość oznaczania indoli występujących w roślinie w szerokim zakresie stężeń bez konieczności stosowania skomplikowanych metod wzbogacania próbki.

Znany z doniesień literaturowych fakt powstawania koniugatów ITC z N-acetylo-L-cysteiną (NAC) w wyniku metabolizmu w organizmie ludzkim stanowił podstawę do zaproponowania postępowania analitycznego polegającego na derywatywacji lotnych i niestabilnych ITC do stabilnych ditiokarbaminianów ITC-NAC na drodze reakcji ITC z NAC. Opracowanie metody analitycznej wymagało przeprowadzenia syntezy wzorców niezbędnych do ustalenia odpowiednich warunków analizy chromatograficznej oraz do wykonania oznaczeń ilościowych i jakościowych. Ustalono także warunki reakcji derywatywacji ITC i wzbogacania próbki za pomocą techniki SPE. Opracowane metodyki oznaczania ITC oraz indoli po etapie walidacji zostały wykorzystane do oznaczania zawartości tych cząsteczek w materiale roślinnym.

## 2. Abstract

Isothiocyanates (ITC) and indoles released during hydrolysis of glucosinolates present in the plants of the *Brassicaceae* family exhibit high antibiological activity against phytophages constituting the alternative to synthetic pesticides. They are also regarded as the most important nutritional, anti-inflammatory and anticarcinogenic substances. Despite broad applicability, till now no analytical methods have been available to enable their routine determination.

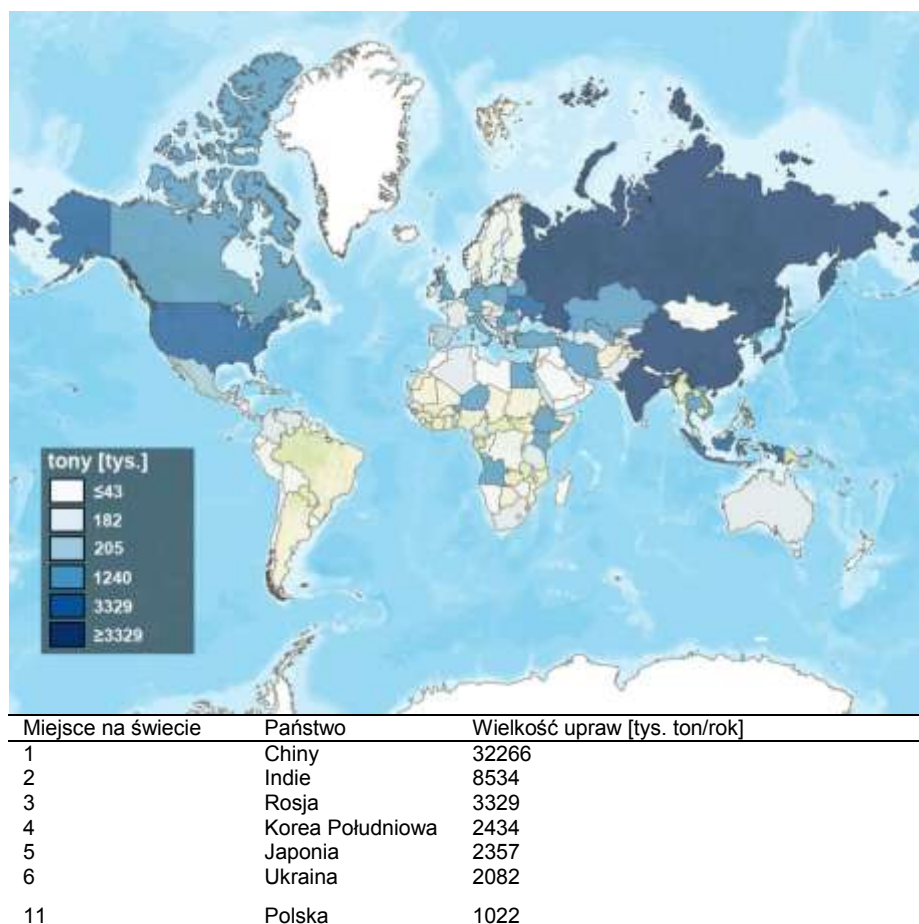
The methodology for determining indoles proposed in this dissertation uses SPE technique for purification of plant extract and HPLC-DAD-FLD technique at the stage of quantitative and qualitative analysis. This solution enables the determination of indoles present in plant material over a wide concentration range without the need for complicated enrichment of the sample.

The proposed analytical procedure employed for the derivatization of volatile and unstable ITC to stable conjugates of these compounds (dithiocarbamates) with N-acetyl-L-cysteine (NAC) mimics the ITC metabolism occurring in human organism. The development of proposed analytical method required the synthesis of ITC-NAC standards necessary to establish the appropriate chromatographic parameters and to ensure both quantitative and qualitative analysis. The conditions for the ITC derivatization reaction following the enrichment of plant samples using SPE have been also optimised. The developed methods for determination of ITC and indoles after the validation stage have been used for the determination of these phytochemicals in plant material.



### 3. Wstęp

Rośliny kapustowate są uważane za jedne z najstarszych roślin uprawianych przez człowieka. Odkrycia archeologiczne wskazują na ich duże znaczenie w żywieniu już w 5000 roku p.n.e. [1], natomiast pierwsze wzmianki w zapisach pisemnych są datowane na rok 1500 p.n.e. [2]. Rodzina kapustowatych (*Brassicaceae*) należąca do rzędu kapustowców (*Brassicales*) liczy około 375 rodzajów z 3200 gatunkami roślin występujących głównie w umiarkowanej i zimnej strefie klimatycznej. W Polsce rośnie ponad 100 gatunków tych roślin [3]. Niektóre z nich są uprawiane w celu pozyskania olejów, jako warzywa [4] i pasze [5]. Stanowią znaczną wartość ekonomiczną ze względu na szczególne właściwości odżywcze, lecznicze [6] oraz możliwość wykorzystania podczas stosowania płodozmianu [7].



Rysunek 1. Światowa produkcja warzyw uprawnych z rodziny kapustowatych w roku 2013 (FAOSTAT, 2016).

W Polsce do powszechnie uznawanych za jadalne roślin z rodziny kapustowatych należą warzywa, takie jak kapusta, brokuł, kalafior, brukselka, rzodkiew, rzepa oraz chrzan. Na rysunku 1

przedstawiono światową produkcję roślin z rodziny kapustowatych w roku 2013 (FAOSTAT, 2016). Niektóre gatunki należące do tej rodziny są uprawiane jako rośliny ozdobne. Do znanych przedstawicieli tej grupy należą lewkonia [8] oraz smagliczka [9]. Na świecie spotykane są także gatunki kapustowatych niepożądane z punktu widzenia gospodarki rolnej zarówno w uprawach polowych, ogrodowych, jak również szklarniowych i łąkowych. Zaliczają się do nich chwasty, z których najczęściej spotykane są tobołek polny oraz tasznik pospolity. Duże znaczenie dla świata nauki ma rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) wykorzystywany w genetyce jako gatunek modelowy, podobnie jak myszy czy muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*) w badaniach biologicznych.

#### 4. Mechanizmy obronne roślin kapustowatych

Wszystkie rośliny wykształciły zespół mechanizmów wykorzystywanych do ochrony przed atakami szkodników. Te systemy obronne mają na celu przeciwdziałanie bądź zniwelowanie skutków ataku fitofagów. Ujawniają się w postaci przystosowań morfologicznych bądź fizjologicznych i mogą mieć charakter bezpośredni polegający na oddziaływaniu między rośliną a żywiącym się nią organizmem, bądź pośredni polegający na współpracy roślin z naturalnie występującymi organizmami drapieżnymi lub pasożytniczymi pełniącymi rolę naturalnych wrogów roślinożerców.

W przypadku roślin z rodziny kapustowatych szczególnie duże znaczenie odgrywają bezpośrednie, fizjologiczne (chemiczne) mechanizmy unieszkodliwiania szkodników polegające głównie na syntezie niskocząsteczkowych związków organicznych określonych mianem metabolitów wtórnych [10]. Pierwotnie uważano, że metabolity wtórne są to produkty uboczne przemiany materii i nie pełnią żadnej funkcji biologicznej, nie są też niezbędne do wzrostu i rozwoju organizmu [10]. Obecnie odchodzi się od tego twierdzenia, choćby z uwagi na fakt, że w syntezę tych związków zaangażowanych jest wiele tysięcy enzymów, które są kodowane przez około 15-25% genomu roślinnego [11]. Rola niektórych metabolitów wtórnych wciąż nie jest znana, jednak większość z nich pełni funkcje repelentów żywieniowych, allelopatinów bądź chemoatraktantów [12].

Do charakterystycznych dla roślin z rodziny kapustowatych metabolitów wtórnych należą glukozynolany (GLS). Do tej pory zidentyfikowano ponad 200 związków należących do tej grupy. W zależności od struktury łańcucha bocznego, GLS dzieli się na alifatyczne, aromatyczne lub indolowe. Związki te w formie pierwotnej nie wykazują aktywności biologicznej w stosunku do szkodników upraw, jednak rośliny kapustowate wytworzyły specyficzny system glukozynolany-mirozyna, który umożliwia przekształcenie GLS do szeregu cząsteczek wykazujących działanie antybiologiczne w stosunku do szerokiego spektrum fitofagów. Wytworzony mechanizm obronny wykorzystuje działanie enzymu mirozyny ( $\beta$ -tioglukozydaza, EC 3.2.3.1), który ma zdolność katalizowania reakcji hydrolizy GLS. Proces ten jest inicjowany dopiero w momencie uszkodzenia tkanki roślinnej, kiedy dochodzi do kontaktu enzymu obecnego w komórkach mirozynowych z GLS obecnymi w wakuolach komórek roślinnych. Dzięki temu

rozwiązaniu roślina posiada zdolność punktowego uaktywnienia mechanizmów obronnych w miejscu ataku szkodnika. Dokładny opis systemu glukozyolany-mirozynaza został zamieszczony w pracy „Biofumigacja jako przyjazna środowisku technologia ochrony roślin” (**załącznik I**). Został on także rozszerzony i uzupełniony o nowe doniesienia literaturowe w pracy “The innovative exploitation of Brassica vegetables in the health quality food production chain” (**załącznik V**).

## 5. Rośliny kapustowate w ochronie upraw

Fumigacja to sposób zwalczania szkodników i patogenów za pomocą trujących substancji chemicznych stosowanych w formie dymu, pary lub gazu (fumigantów). Powszechnie stosowane w ochronie upraw syntetyczne fumiganty mogą mieć negatywny wpływ na środowisko. Ponadto, liczne doniesienia literaturowe wskazują na pojawienie się u niektórych szkodników oporności w stosunku do wykorzystywanych środków ochrony roślin. W związku z tym coraz częściej stosowane są nowe, przyjazne środowisku rozwiązania pozwalające na skuteczne pozbycie się fitofagów przynoszących ogromne straty w uprawach. Mając na uwadze rosnącą świadomość społeczeństwa co do szkodliwości stosowania syntetycznych środków ochrony roślin oraz skuteczność działania związków pochodzenia naturalnego odchodzi się od używania syntetycznych fumigantów na rzecz ich naturalnych odpowiedników – biofumigantów.

Zdolność roślin kapustowatych do syntezy substancji, których produkty hydrolizy wykazują działania biobójcze w stosunku do fitofagów jest wykorzystywana w rolnictwie ekologicznym w procesie biofumigacji. Najprostszą metodą dostarczania do ziemi składników aktywnych jest bezpośrednie rozprowadzenie i zaoranie roślin kapustowatych. Do tego celu wykorzystuje się rozdrobnione rośliny, bądź części roślin stanowiące odpady poprodukcyjne. Przykłady zastosowania roślin kapustowatych na potrzeby biofumigacji zostały przedstawione w **załączniku I**. Możliwe jest także stosowanie biopreparatów uzyskanych z roślin kapustowatych i stanowiących zatężone roztwory naturalnych substancji aktywnych. Badania nad opracowaniem takiego produktu były prowadzone na Politechnice Gdańskiej w ramach projektu „Agrobiokap – wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (UDA-POIG.01.03.01-00-138/09-00)”. W wyniku przeprowadzonych prac uzyskano biopreparat wzbogacony w indolowe produkty degradacji GLS, który wykazywał działanie przeciwgrzybowe porównywalne z syntetycznymi fungicydami.

Indole oraz izotiocyjaniany (ITC) uwalniane w trakcie enzymatycznej hydrolizy GLS są odpowiedzialne za wysoką skuteczność stosowania roślin kapustowatych w ochronie upraw przed bakteriami, wirusami, grzybami, nicieniami i owadami. Dokładne informacje na ten temat zostały przedstawione w sekcji zatytułowanej „Protection of field and crops” w **załączniku V**. Wyniki uzyskane w ramach finansowanego przez NCN projektu badawczego „Ocena jakości zdrowotnej poszczególnych części warzyw kapustowatych oraz poszczególnych faz ich rozwoju jako źródła bioaktywnych

*fitozwiązków przy projektowaniu żywności funkcjonalnej w tym suplementów diety (DEC-2013/09/N/NZ9/0127)*” wskazały na duże zróżnicowanie w składzie i zawartości GLS oraz produktów rozpadu tych związków w różnych częściach roślin kapustowatych w różnych stadiach rozwoju (część z uzyskanych wyników została zamieszczona w **załączniku V**). Ma to szczególne znaczenie w świetle badań przeprowadzonych w trakcie ostatnich lat, które wykazały, że wielką wagę w zwalczaniu szkodników upraw ma nie tylko ilość uwolnionych produktów hydrolizy GLS, ale także odpowiedni skład jakościowy tych związków, od którego zależy zdolność do zwalczania określonych szkodników, głębokość penetracji gleby i czas utrzymywania się wysokiego stężenia substancji aktywnych w obrębie rośliny.

Z tego powodu nie bez znaczenia podczas projektowania technologii biofumigacyjnych jest dobranie takiego gatunku bądź części rośliny, które pozwalają uzyskać duże ilości ITC i indoli z małej masy rośliny przy jednoczesnym zachowaniu składu tych związków cechującego się wysoką skutecznością biobójczą w stosunku do fitofagów.

Dla pozyskania takich danych ważne jest zatem dysponowanie metodami instrumentalnymi umożliwiającymi wykonywanie oznaczeń zawartości związków bioaktywnych w roślinach w celu selekcji gatunków i części charakteryzujących się zdolnością uwalniania dużych ilości najważniejszych z punktu widzenia ochrony roślin związków, takich jak ITC i indole.

## 6. Rośliny kapustowate w ochronie zdrowia

Do roku 1970 większość badań nad roślinami kapustowatymi skupiała się nad uzyskaniem nowych odmian tych roślin użytecznych dla przemysłu rolno-spożywczego oraz sposobami ich ochrony przed atakami szkodników. Pierwsze kliniczne i przedkliniczne badania wpływu diety zawierającej rośliny kapustowate sugerujące hamowanie rozwoju nowotworów przeprowadzono we wczesnych latach 70-tych ubiegłego wieku [13, 14]. Kolejne badania przeprowadzane w latach 80-tych i 90-tych potwierdziły odwrotną zależność pomiędzy spożyciem roślin kapustowatych a przypadkami rozwoju nowotworów jelita grubego i odbytu, trzustki, piersi, płuc i jajnika [15-20]. W latach 1990-2000 zintensyfikowano badania nad możliwością wykorzystania roślin kapustowatych w chemoprewencji. Spośród wielu powstałych w tym okresie prac bez wątpienia przełomowe były wyniki badań uzyskane przez grupę badaczy z John Hopkins University pracujących pod kierownictwem prof. Talalay'a [21], które wykazały, że spożycie kiełków brokuła lub kalafiora powoduje silną indukcję enzymów chroniących przed rozwojem nowotworów. Zaobserwowano, że kiełki zawierają od 10 do 100 razy większe ilości glukozynolanu glukorafaniny (z której powstaje izotiocyjanian sulforafan) niż ma to miejsce w przypadku dojrzałych roślin i wykazują wysoką skuteczność w zmniejszaniu liczby przypadków rozwoju nowotworu sutka u szczurów poddanych ekspozycji na 7,12-dimetylobenz(α)antracen (DMBA). W podsumowaniu autorzy stwierdzili, że spożycie małych ilości kiełków roślin kapustowatych może skutkować silniejszą ochroną przed rozwojem nowotworów niż spożywanie dużych ilości dojrzałych roślin. Badania przeprowadzone przez grupę prof.

Talalay'a miały ogromny wpływ na wykorzystanie roślin kapustowatych, a w szczególności kielków, na świecie.

Od roku 2000 prace badawcze ukierunkowane są na poznanie mechanizmów przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych stymulowanych przez cząsteczki bioaktywne uwalniane z roślin kapustowatych. Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że to nie GLS, a jedynie wybrane produkty rozpadu tych związków posiadają duży potencjał prozdrowotny. Spośród szerokiej gamy cząsteczek powstających w wyniku reakcji katalizowanej przez enzym mirozynazę, wysoką aktywność biologiczną wykazują ITC oraz indole. Szczególną uwagę zwrócono na zdolność tych związków do hamowania rozwoju stanu zapalnego kontrolowanego przez czynnik transkrypcyjny NFκB [22, 23], indukowania enzymów detoksykacyjnych regulowanych przez czynnik transkrypcyjny Nrf-2 [24], indukowania apoptozy komórek nowotworowych [25, 26], na ich udział w metabolizmie estrogenów [27] oraz inhibicji deacetylaz histonów [28]. Aktywności biologiczne wybranych związków indolowych oraz ITC przedstawiono w kolejnych rozdziałach niniejszego opracowania.

## **6.1. Związki bioaktywne roślin kapustowatych**

### **6.1.1. Związki indolowe**

Warzywa kapustowate są bogatym źródłem związków indolowych, takich jak fitoaleksyny oraz GLS zawierające w łańcuchu bocznym grupę indolową. Związki te są wtórnymi metabolitami i pełnią funkcje odpowiednio fitohormonów warunkujących wzrost rośliny lub endogennych prekursorów pestycydów o aktywności antybiologicznej. W przypadku GLS indolowych, np. glukobrassicyny, wskutek uszkodzenia komórki roślinnej enzym mirozynaza powoduje rozpad indolilo-3-ylmetylo glukozynolanu głównie do indolo-3-karbinolu (I3C), który ulega dalszym samorzutnym reakcjom do m.in. 3,3'-diindolilometanu (DIM). Wszystkie te produkty rozpadu są elementem systemu autoochrony rośliny przed fitofagami. Badania ostatnich kilkunastu lat pokazały jednak, że wspomniane pochodne indolowe mają także ważne znaczenie zdrowotne, przez co zaliczone zostały do tzw. nutraceutyków. Związki te ograniczają wzrost i namnażanie się komórek nowotworowych, stymulują ich apoptozę, przyspieszają detoksykację substancji kancerogennych oraz wspomagają naprawę DNA [27, 29-31].

#### *Kwas indolilo-3-octowy*

Kwas indolilo-3-octowy (I3AA) jest jednym z najważniejszych fitohormonów roślinnych należących do grupy auksyn. Za charakterystyczną cechą tych związków można uznać ich wielokierunkowy wpływ na biologiczny rozwój rośliny. Pod wpływem auksyn następuje wzrost wakuoli oraz wydłużenie komórek spowodowane głównie zwiększoną absorpcją wody z otoczenia. Ponadto związki te powodują pobudzenie podziałów komórkowych, szczególnie w miejscach uszkodzenia tkanki roślinnej przyczyniając się do powstawania pełniącego funkcję ochronną kalusa. Od szybkości syntezy auksyn zależy także szybkość wzrostu rośliny i owoców oraz zdolność rośliny do przystosowywania się do zmian środowiskowych,



a także odpowiedź na biotyczne [32] i abiotyczne czynniki środowiskowe [33]. I3AA służy jako cząsteczka sygnałowa niezbędna do rozwoju narządów roślin oraz koordynująca wzrost [34]. Natomiast z punktu widzenia ludzkiego zdrowia szczególnie cenna jest zdolność tego związku do neutralizacji reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych za degradację DNA oraz starzenie się organizmu [35].

#### *Indolo-3-acetonitryl*

Indolo-3-acetonitryl (I3ACN) jest prekursorem do syntezy I3AA, przez co także odgrywa ważną rolę w rozwoju rośliny. Związek ten powstaje w wyniku hydrolizy glukozynolanu glukobrassyliny albo z tryptaminy, która jest syntetyzowana z tryptofanu [36]. Z punktu widzenia chemoprewencji, szczególnie istotną rolę odgrywa zdolność I3ACN do indukowania aktywności S-transferaz glutationowych [37], które katalizują reakcje połączenia glutationu (GSH) ze związkami elektrofilowymi, w tym ksenobiotykami i umożliwiają ich wydalenie z komórki. S-Transferazy glutationowe inaktywują endogenne nienasycone aldehydy, epoksydy lub nadtlenki, czyli reaktywne produkty stresu oksydacyjnego mogące spowodować w komórce rozległe uszkodzenia.

#### *Indolo-3-karbinol i 3,3'-diindolilometan*

W wyniku hydrolizy glukozynolanu glukobrassyliny katalizowanej przez enzym mirozynazę oprócz indolo-3-acetonitrylu powstaje indolo-3-karbinol (I3C). Związek ten częściowo dimeryzuje do 3,3'-diindolilometanu (DIM) [38]. Oba związki wykazują szeroki zakres aktywności biologicznej udokumentowanej *in vitro* na liniach komórkowych i w modelach zwierzęcych, w dużej mierze podobny do działania ITC. I3C i DIM wpływają na aktywność enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków, powodują zatrzymanie cyklu komórkowego, apoptozę komórek nowotworowych, hamowanie angiogenezy i przerzutowania [39, 40]. Szczególnie interesująca jest zdolność I3C i DIM do zakłócania szlaków sygnalizacyjnych receptorów estrogenowych, które mają istotne znaczenie w pobudzaniu proliferacji hormonozależnych komórek nowotworów piersi i szyjki macicy [41].

Aktywność 3,3'-diindolilometanu badano w modelach zwierzęcych i związek ten wykazywał skuteczność przeciw nowotworom piersi, macicy, prostaty i okrężnicy [42]. Przeciwrakotwórcza aktywność I3C wynika ze zdolności tego związku do obniżania poziomu stresu oksydacyjnego [35], stymulacji procesów naprawy DNA i zmniejszania produkcji czynników uszkadzających genom [43]. W komórkach poddanych działaniu kolejno I3C, a następnie czynników rakotwórczych, obserwowano zmniejszenie ilości adduktów DNA [31].

#### 6.1.2. Izotiocyjaniany

Izotiocyjaniany (ITC) to związki siarkoorganiczne posiadające w swojej strukturze grupę izotiocyjanianową o wzorze  $-N=C=S$ . Związki te, powstające podczas enzymatycznej reakcji hydrolizy alifatycznych i aromatycznych GLS, wykazują wysoką aktywność biobójczą w stosunku do patogenów

i szkodników upraw roślinnych, dlatego uważa się, że mogą stanowić alternatywę dla syntetycznych środków ochrony roślin. Należą one także do uznawanych za najważniejsze substancji przeciwzapalnych, przeciwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych i przeciwrakotwórczych pochodzenia żywieniowego. Chemoprewencyjne działanie ITC zostało opisane w wielu pracach badawczych i artykułach przeglądowych, które powstały na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat [44, 45]. Aktywność biologiczną ITC można łatwo wytłumaczyć, ponieważ wynika ona z dwóch głównych właściwości tych związków: łatwości przenikania przez błony biologiczne oraz ich elektrofilowego charakteru. Pierwsza właściwość zapewnia wysoką biodostępność ITC [46], natomiast elektrofilowy charakter grupy izotiocyanianowej leży u podłoża biologicznego działania tych związków, bowiem dzięki niemu wykazują one reaktywność w stosunku do takich grup nukleofilowych jak sulfidowa, aminowa lub hydroksylowa. Aktywność przeciwrakotwórcza ITC wynika ze zdolności tych związków do aktywacji bądź dezaktywacji wielu szlaków sygnałowych, co w konsekwencji prowadzi do stymulowania aktywności enzymów detoksykacyjnych, indukcji apoptozy, nekrozy i autofagii, inhibicji proliferacji komórek nowotworowych oraz angiogenezy [47, 48]. Funkcje ochronne indukowanych przez ITC białek zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Ochronne funkcje indukowanych przez izotiocyaniany białek II fazy detoksykacji [49].

<b>Enzymy i białka II fazy detoksyfikacji</b>	<b>Mechanizmy ochronne</b>
S-transferazy glutationowe ( $\alpha$ , $\mu$ , $\pi$ )	Koniugacja ksenobiotyków z glutationem
UDP–Glukuroniltransferaza	Koniugacja ksenobiotyków z kwasem glukuronowym
NAD(P)H: Oksydoreduktaza chinonowa (QR, NQO1)	Redukcja chinonów do hydrochinonów Regeneracja koenzymu Q oraz witaminy E
Hydroksylazy epoksydowe	Hydroliza epoksydów
Dehydrogenaza dihydrodiolowa	Przekształcanie dihydrodioli do katecholi
Syntetaza glutamylcysteinowa	Synteza glutationu
Białka błonowe typu MRP	Wypływ z komórek koniugatów ksenobiotyków z glutationem
Oksygenaza hemowa	Synteza przeciwutleniacza bilirubiny
Ferrytyna	Wiążąc wolne jony żelaza nie dopuszcza do reakcji wolnorodnikowych
Katalaza	Redukuje poziom nadtlenu wodoru
Reduktaza aldehydowa aflatoksyny B1	Przekształca genotoksyczne metabolity aflatoksyn w nieszkodliwe pochodne
Mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa	Redukuje poziom anionorodnika ponadtlenkowego
Dehydrogenaza leukotrienowa B4	Obniża poziom leukotrienów i łagodzi stany zapalne

Najnowsze badania wskazują, że ITC odgrywają także kluczową rolę w epigenetycznej regulacji ekspresji genów poprzez stymulację deacetylazy histonowej (HDAC) [50].

### 6.1.3. Badania epidemiologiczne

Przeprowadzone badania epidemiologiczne wskazują, że spożycie roślin bogatych w ITC skutecznie chroni przed rozwojem szeregu najczęściej diagnozowanych nowotworów płuc. W 2001 roku w badaniach przeprowadzonych na grupie 420 kobiet wykazano, że tygodniowa dawka co najmniej 53  $\mu\text{M}$  ITC przyczynia się do znacznego obniżenia ryzyka rozwoju nowotworu płuc [51]. Praca opublikowana przez Lam i in. [52] będąca metaanalizą trzydziestu prac badawczych powstałych na przestrzeni 2 lat umocniła tezę o odwrotnej zależności pomiędzy spożyciem warzyw kapustowatych stanowiących źródło związków bioaktywnych a ryzykiem rozwoju nowotworów płuc. Uzyskane wyniki wskazały na co najmniej 17% niższe ryzyko rozwoju nowotworów tego organu u osób spożywających duże ilości warzyw kapustowatych. W badaniach przeprowadzonych na grupie 63257 osób w średnim wieku i narażonych na rozwój nowotworu jelita grubego zaobserwowano, że spożycie dużych ilości roślin będących źródłem ITC obniża o 57 % ryzyko rozwoju tego nowotworu [53]. Kolejne potwierdzenie pozytywnego wpływu ITC na zdrowie człowieka stanowiły wyniki uzyskane na grupie 29361 osób, wśród których 1338 osób miało nowotwór prostaty. Pod uwagę wzięto szeroką grupę warzyw i owoców, jednak tylko rośliny kapustowate, w szczególności brokuły i kalafior w znacznym stopniu przyczyniały się do znacznego obniżenia ryzyka rozwoju tego nowotworu [54].

Związki bioaktywne występujące w roślinach kapustowatych a w szczególności sulforafan pozytywnie wpływają na funkcjonowanie układu krwionośnego, głównie poprzez zdolność do obniżania poziomu cholesterolu zawartego we frakcji LDL, neutralizowanie wolnych rodników oraz wpływ na aktywność GST, co zostało udowodnione w badaniach *in vitro* [55, 56] oraz *in vivo* [57, 58]. W badaniach klinicznych przeprowadzonych na 12 osobach dowiedziono, że spożycie kiełków brokułów przez 1 tydzień zmniejsza ilość markerów stresu oksydacyjnego i równoległe zwiększa metabolizm cholesterolu [59]. Wyniki badań przeprowadzonych na ponad 39 tysiącach kobiet wskazują na duży udział roślin kapustowatych będących źródłem ITC w zapobieganiu rozwojowi chorób układu krwionośnego [60]. Z uwagi na potwierdzone właściwości prozdrowotne, sok z kalafiora jest wykorzystywany jako element diety stosowanej w celu ochrony układu krwionośnego [61]. Badania przeprowadzone na początku roku 2009 wskazują, że spożywanie kiełków brokułów bogatych w sulforafan przez 2 miesiące w ilości 70 g/dzień ogranicza stres oksydacyjny wywołany przez bakterie *Helicobacter pylori* i pomaga w ochronie przed rozwojem nieżyty żołądka u zwierząt i ludzi [62].

Liczne badania przeprowadzone na przestrzeni ostatnich lat wskazują, że ITC i indole, których źródłem w diecie człowieka są rośliny kapustowate przyczyniają się do zmniejszenia zachorowalności na takie choroby nowotworowe jak rak okrężnicy, piersi, jelita grubego, pęcherza, prostaty, płuc oraz przełyku [63-66]. Zmniejszenie zagrożenia chorobami nowotworowymi przez warzywa kapustowate wykazane w badaniach epidemiologicznych może być także związane ze zdolnością związków aktywnych do chemicznej modyfikacji grup nukleofilowych składników żywności. Na przykład ITC mogą reagować



z heterocyklicznymi aminami aromatycznymi (obecnymi np. w smażonym mięsie) do stabilnych tiomoczników, co obniża potencjał mutagenny tych kancerogenów [67].

Reaktywność ITC jak również różnorodność aktywności biologicznych tych związków zostały opisane w publikacji "The innovative exploration of Brassica vegetables in the health quality food production chain" zamieszczonej w **załączniku V**.

Mimo szerokiego wachlarza zastosowań ITC i indoli, ich wykorzystania w rolnictwie i dużego potencjału prozdrowotnego, dostępność metod analitycznych pozwalających na wykonywanie oznaczenia zawartości tych związków z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej jest nader ograniczona. Główne problemy polegają na (I) konieczności posiadania dużych ilości materiału do badań wynoszących nawet 500 g [68, 69], (II) skomplikowanych procedurach oczyszczania i wzbogacania próbki [70, 71], (III) ograniczeniu możliwości wykorzystania metody tylko do jednego bądź kilku wybranych analitów [72-74], (IV) konieczności otrzymywania niedostępnych w sprzedaży, znakowanych izotopowo wzorców lub przeciwciat [71, 75] albo (V) możliwości uzyskania jedynie informacji ilościowej [76].

## 7. Cel i zakres pracy

W dobie rosnącego zainteresowania konsumentów żywnością funkcjonalną, a w szczególności składnikami o działaniu prozdrowotnym poszukiwane są takie produkty spożywcze, które mogą spełnić oczekiwania klientów co do ceny i właściwości sensorycznych, a przy tym przyczynić się do osiągnięcia określonego efektu zdrowotnego. Aby sprostać rosnącym potrzebom konieczne jest opracowanie odpowiednich narzędzi analitycznych, które pozwolą na opracowanie składu produktów charakteryzującego się wysoką zawartością substancji bioaktywnych. Obecnie dostępne metodyki oznaczania fitozwiązków bioaktywnych, takich jak ITC i indole albo nie dają możliwości oznaczenia jakościowego albo są skomplikowane i czasochłonne. Dlatego moim zasadniczym celem w trakcie realizacji projektu doktorskiego prowadzonego w ramach Studium Doktoranckiego było zaproponowanie nowych rozwiązań analitycznych, które w prosty i szybki sposób pozwalałyby wykonać oznaczenia składu i zawartości ITC i indoli. Metody te powinny pozwalać na oznaczenie zawartości cząsteczek o znanym i potwierdzonym działaniu prozdrowotnym, jak również nowych, mniej poznanych, jednak będących obecnie przedmiotem badań naukowych lub czekających na odkrycie ich aktywności biologicznej.

Program badawczy będący przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej związany był z realizacją następujących zadań:

- opracowanie procedur izolacji i oczyszczania składników bioaktywnych obecnych w ekstraktach uzyskanych z liofilizatów roślinnych za pomocą techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE);
- opracowanie zmodyfikowanych metodyk oznaczania zawartości związków indolowych i izotiocyanianów obecnych w próbkach wzbogaconych za pomocą techniki SPE;
- opracowanie i walidacja nowej metody oznaczania jakościowego i ilościowego izotiocyanianów po ich derywatacji do stabilnych ditiokarbaminianów obejmujące:
  - przeprowadzenie syntezy wzorców ditiokarbaminianów, oczyszczenie uzyskanych produktów syntezy oraz potwierdzenie struktury z wykorzystaniem techniki NMR oraz MS;
  - ustalenie warunków analizy chromatograficznej (HPLC-DAD-MS) dla wzorcowych, zsyntetyzowanych koniugatów ITC-NAC;
  - ustalenie warunków reakcji derywatacji izotiocyanianów do koniugatów ITC-NAC;
- walidacja opracowanych metod oznaczania składu i zawartości izotiocyanianów i indoli;
- weryfikacja stosowalności opracowanych procedur analitycznych dla prób rzeczywistych.

## 8. Wyniki badań

Bogata matryca próbek roślin kapustowatych utrudnia bezpośrednią analizę związków indolowych oraz ITC. Z tego powodu dostępne metodyki wykorzystywane do oznaczania tych cennych związków uwzględniają etap oczyszczania ekstraktów, selektywnej izolacji analitów i wzbogacania. W początkowej fazie mojej pracy doktorskiej na etapie przygotowania próbki do analizy korzystałem z procedur zaproponowanych przez inne grupy badawcze i wykorzystujących technikę ekstrakcji rozpuszczalnikiem typu ciecz-ciecz. Pierwszym problemem, który napotkałem była konieczność posiadania dużej ilości materiału do badań (ok. 100 g materiału roślinnego). W przypadku wykonywania analizy dla kilku próbek nie stanowiło to problemu, jednak projekty, w które byłem zaangażowany zakładały wykonanie oznaczeń zawartości związków bioaktywnych w wielu próbach różnych odmian bądź gatunków roślin (I) pozyskanych na przestrzeni kilku lat, (II) pochodzących z różnych rejonów Polski charakteryzujących się odmiennym poziomem zanieczyszczenia lub skażenia środowiska, (III) hodowanych w fitotronie, (IV) podzielonych na części (korzeń, łodyga, liście, głęb itp.). Zapotrzebowanie na duże ilości materiału do analizy oraz konieczność jego magazynowania stanowiło ogromne wyzwanie logistyczne. Ponadto problemem mogło być hodowanie dużych ilości roślin w kontrolowanych warunkach klimatycznych i fizycznych w fitotronie z uwagi na ograniczony dostęp miejsca. Zaproponowanym rozwiązaniem było wykorzystanie zyskującej na popularności techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE) charakteryzującej się selektywnością wzbogacania oraz łatwością automatyzacji. W technice tej w przeciwieństwie do stosowanej wcześniej ekstrakcji typu ciecz-ciecz unika się problemu tworzenia emulsji oraz znacznie obniża się ilość zużywanych rozpuszczalników, a tym samym ogranicza się problem toksycznych odpadów. Zastosowanie SPE pozwoliło mi uprościć i skrócić proces przygotowania próbki do analizy i w konsekwencji umożliwiło wykonywanie większej liczby analiz chromatograficznych w ciągu dnia. Uzyskane wyniki badań dotyczące warunków wzbogacania próbki w związki indolowe opisano w pracy „Simultaneous determination of indolic compounds in plant extracts by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection” zamieszczonej w **załączniku II**, natomiast warunki wzbogacania próbki zawierającej ITC opisano w pracy “Simultaneous determination of individual isothiocyanates in plant samples by HPLC-DAD-MS following SPE and derivatization with *N*-acetyl-L-cysteine” zamieszczonej w **załączniku VI**.

Wprawdzie w literaturze opisane były metody oznaczania związków indolowych, jednakże nie dawały one możliwości oznaczenia najważniejszych z punktu widzenia roślin kapustowatych związków indolowych, jakimi są indolo-3-karbinol, 3,3'-diindolilometan, kwas indolilo-3-octowy oraz indolo-3-acetonitryl w trakcie jednej analizy chromatograficznej. Związki te występują w próbce na różnych poziomach stężeń, np. zawartość DIM w liofilizatach z roślin kapustowatych mieści się w zakresie od 0,05 nmol g<sup>-1</sup> do 0,41 nmol g<sup>-1</sup> s.m. podczas gdy zawartość I3ACN mieści się w zakresie od 0,32 nmol g<sup>-1</sup> do 155,93 nmol g<sup>-1</sup> s.m. (**załącznik II**). Tak duże zróżnicowanie w poziomie stężeń analitów niesie za sobą

wiele utrudnień i może przyczyniać się do konieczności wykonywania ponownych analiz chromatograficznych po rozcieńczeniu próbki (w sytuacji zbyt dużej ilości analitu w próbce) lub zupełnie uniemożliwia określenie zawartości analitów (z uwagi na zbyt wysoką granicę oznaczalności metody). Zaproponowanym przeze mnie rozwiązaniem tego problemu było zastosowanie dwóch detektorów połączonych szeregowo, detektora z matrycą diodową oraz detektora fluorescencyjnego. Pierwszy system detekcji charakteryzuje się szerokim zakresem liniowej odpowiedzi jednak niską czułością, co w przypadku analitów występujących na niskim poziomie stężeń go dyskwalifikuje lub wymusza stosowanie dużych ilości próbki w połączeniu ze skomplikowanymi i kosztownymi metodami izolacji i wzbogacania próbki. Związki indolowe są substancjami mającymi zdolność fluorescencji, z tego powodu postanowiłem zastosować detektor fluorescencyjny charakteryzujący się wysoką selektywnością oraz dużą czułością w stosunku do tej grupy związków. Takie podejście pozwoliło 40-krotnie obniżyć granicę oznaczalności. Z uwagi na wąski zakres liniowej odpowiedzi detektora fluorescencyjnego, szeregowo połączone detektory DAD i FLD wzajemnie się uzupełniały i pozwalały na oznaczenie analitów występujących w szerokim zakresie stężeń. Zastosowanie czułego detektora fluorescencyjnego w połączeniu z wydajną techniką wzbogacania i oczyszczania próbki pozwoliło także zmniejszyć ilość wymaganej minimalnej ilości materiału do badań do 0,2 g.

W początkowym etapie badań do oznaczania całkowitej zawartości ITC uwalnianych z roślin kapustowatych w wyniku katalizowanej przez enzym mirozynazę hydrolizy GLS wykorzystywałem metodykę zaproponowaną przez Zhanga i in. [76]. Zasada tej metody opiera się na zdolności ITC do ilościowego reagowania z 1,2-benzenoditiolem dając w rezultacie barwny i stabilny 1,3-benzenoditiolo-2-tion oraz wolne aminy. Powstający cykliczny tiokarbonyl ze względu na wysoki współczynnik ekstynkcji w zakresie fal typowych dla ultrafioletu umożliwia ilościowy pomiar za pomocą technik spektrofotometrycznych. Wykorzystanie do oznaczeń zawartości tego związku techniki HPLC sprzężonej z detektorem UV-Vis umożliwia wykonywanie oznaczeń na poziomie kilku pikomoli [76]. Zaletą metody jest dostępność 1,2-benzenoditiolu, duża stabilność i brak lotności powstałego produktu kondensacji oraz krótki czas reakcji derywatywacji prowadzącej do ilościowego przereagowania prawie wszystkich ITC obecnych w próbce. Zaproponowaną metodykę rozbudowałem o etap izolacji analitów z próbki za pomocą techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Dla uzyskanych wzbogaconych ekstraktów rozpuszczalnikowych ustaliłem optymalne warunki reakcji derywatywacji. Pod uwagę wziąłem różne rodzaje buforów wchodzące w skład mieszaniny reakcyjnej i charakteryzujące się odmienną pojemnością buforową. Ustaliłem także optymalny czas reakcji derywatywacji, stężenie 1,2-benzenoditiolu oraz temperaturę inkubacji mieszaniny reakcyjnej. Ostatecznie przyjęte warunki derywatywacji były następujące: do 0,1 ml ekstraktu rozpuszczalnikowego uzyskanego w wyniku wzbogacania próbki za pomocą techniki SPE dodawałem 0,5 ml izopropanolu, 0,5 ml 0,1 M potasowego buforu fosforanowego o pH 8,5 oraz 0,1 ml 60 mM 1,2-benzenoditiolu. Mieszaninę reakcyjną inkubowałem przez 1 h w temperaturze 65°C w celu

przyspieszenia przebiegu reakcji kondensacji. Po skończonej inkubacji uzyskany roztwór poddawałem analizie chromatograficznej (HPLC-DAD).

Wykorzystywana w trakcie badań nad projektem doktorskim metodyka wykorzystująca reakcję derywatywacji ITC do jednej wspólnej pochodnej umożliwiała oznaczenie całkowitej zawartości tych związków w próbce. Uzyskanie takiej informacji w wielu przypadkach było wystarczające, jednak mając na uwadze liczne doniesienia literaturowe opisujące zróżnicowaną aktywność poszczególnych ITC ważne wydawało się dysponowanie metodyką pozwalającą na poznanie składu ilościowego i jakościowego tych związków w próbkach. Duża lotność ITC sugerowała, że zastosowanie techniki chromatografii gazowej (GC) powinno umożliwić wykonywanie oznaczeń zawartości tych związków w próbkach różnego pochodzenia. W dostępnej literaturze naukowej opisywane są metodyki wykorzystujące do tego celu chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas [77, 78] lub detektorem płomieniowo-jonizacyjnym [79]. Niestety, niektóre ze źródeł literaturowych wskazują na duży problem związany ze stabilnością ITC w wysokich temperaturach osiąganych w trakcie analiz z wykorzystaniem chromatografu gazowego. W momencie nastrzyku próbki, jak również w trakcie separacji analitów w kolumnie chromatograficznej dochodzi do zmiany struktury tych związków lub ich degradacji osiągającej nawet 80% zawartości początkowej [80, 81]. Zastosowanie techniki chromatografii cieczowej mogłoby rozwiązać ten problem, ponieważ postępowanie analityczne nie wymaga stosowania wysokich temperatur. Z tego powodu niektóre grupy badawcze podejmowały próby opracowania metodyk, w których zastosowano tę technikę. Zaproponowana przez Haudera i in. technika HPLC-MS/MS stosowana do oznaczania zawartości sulforafanu w próbkach krwi lub moczu jako wzorzec wewnętrzny wykorzystuje znakowany izotopowo, niedostępny handlowo wzorzec wewnętrzny [82]. W innym podejściu znanym z doniesień literaturowych, do oznaczania zawartości PEITC w moczu wykorzystuje się reakcję derywatywacji ITC za pomocą amoniaku do pochodnych tiomocznikowych [83]. Z uwagi na dużą pracochłonność, trudności w uzyskaniu znakowanych izotopowo wzorców, wysoki koszt sprzętu wykorzystywanego do analizy, bądź też możliwość oznaczania zawartości tylko jednego analitu powyższe metodyki nie zdobyły popularności.

Znany z doniesień literaturowych fakt powstawania koniugatów izotiocyjanianów z N-acetylo-L-cysteiną (NAC) w wyniku metabolizmu w organizmie ludzkim stanowił podstawę do zaproponowania przeze mnie postępowania analitycznego polegającego na przeprowadzeniu lotnych i niestabilnych ITC obecnych w ekstraktach uzyskanych z próbek roślinnych w stabilne pochodne ITC-NAC na drodze reakcji NAC z ITC do ditiokarbaminianów. Opracowanie nowej metody analitycznej wymagało przeprowadzenia syntezy wzorców niezbędnych do ustalenia odpowiednich warunków analizy chromatograficznej oraz do wykonania oznaczeń ilościowych i jakościowych. Konieczne było także dobranie odpowiednich warunków izolacji analitów z próbki z wykorzystaniem techniki SPE. Ponadto w trakcie badań ustalono skład mieszaniny reakcyjnej, optymalną temperaturę reakcji oraz minimalny czas niezbędny do zakończenia procesu derywatywacji. Dla

każdego z dostępnych wzorców ITC-NAC ustalono optymalne parametry pracy spektrometru mas, które uwzględniały: tryb jonizacji, rodzaj monitorowanych jonów oraz napięcie fragmentora.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań zostały opisane w pracy „Simultaneous determination of individual isothiocyanates in plant samples by HPLC-DAD-MS following SPE and derivatization with *N*-acetyl-L-cysteine” znajdującej się w **załączniku VI**.

Opracowane metodyki oznaczania ITC oraz indoli po etapie walidacji zostały wykorzystane do określenia zawartości tych związków w materiale roślinnym różnego pochodzenia. Uzyskane wyniki oznaczeń zostały przedstawione w pracach znajdujących się w **załącznikach II-VI**.

## 9. Podsumowanie

Głównymi osiągnięciami mojej pracy doktorskiej jest opracowanie dwóch metod analitycznych umożliwiających rutynowe oznaczanie dwóch grup bardzo ważnych bioaktywnych fitozwiązków – indoli i izotiocyjanianów, charakterystycznych dla przede wszystkim roślin kapustowatych. Opracowana metodyka oznaczania związków indolowych może zostać wykorzystana podczas badań poświęconych fizjologii roślin, jak również stanowić ważny element w badaniach nad oceną potencjału prozdrowotnego żywności. W **załączniku III** opisany został wpływ stadium rozwoju owoców czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.) na skład związków bioaktywnych oraz mutagenność otrzymanych ekstraktów. Uzyskane wyniki badań pozwoliły określić zależność pomiędzy zawartością indolowych hormonów roślinnych a wiekiem rośliny, zawartością kwasów fenolowych i flawonoidów oraz aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów z owoców czarnego bzu. Opracowana metodyka została także wykorzystana do ilościowej oceny zawartości związków indolowych w próbkach kiełków i poszczególnych częściach roślin kapustowatych w badaniach przeprowadzanych w ramach projektów grantowych finansowanych przez NCN (DEC-2011/01/N/NZ9/07086 oraz N N312 244 366), których wyniki zostały opisane w pracach „The influence of selenium addition during germination of *Brassica* seeds on health-promoting potential of sprouts” (**załącznik IV**) oraz “The innovative exploitation of Brassica vegetables in the health quality food production chain” (**załącznik V**).

Zmodyfikowaną metodykę Zhanga [76] poprzez wprowadzenie m.in. techniki SPE na etapie przygotowania prób wykorzystano do określenia wpływu dodatku związku selenu do podłoża wzrostowego na ilość ITC uwalnianych z roślin kapustowatych. Uzyskane wyniki badań zostały zestawione z wynikami oznaczeń zawartości GLS oraz produktów hydrolizy tych związków do m.in. indoli, nitryli, epitionitryli. Obliczony został także stopień konwersji GLS do związków o potencjale biologicznym. Uzyskane wyniki oznaczeń pozwoliły stwierdzić, że spośród produktów hydrolizy GLS w zastosowanym modelu badawczym – ludzkich komórkach nowotworowych jelita grubego HT-29, tylko ITC mają wpływ na cytotoksyczność i indukcję enzymów detoksykacyjnych, tj. S-transferaz glutationowych oraz



oksydoreduktazy NAD(P)H chinonowej-1. Dokładny opis przeprowadzonych badań został przedstawiony w załączniku IV.

Doświadczenia prowadzone na zwierzętach oraz wyniki licznych badań epidemiologicznych wskazują, że spożywanie roślin z rodziny *Brassicaceae* może zmniejszać ryzyko rozwoju nowotworów u ludzi. Jednak, aby uzyskać efekt chemoprewencyjny konieczna jest selekcja warzyw będących źródłem dużych ilości ITC o właściwym składzie, ponieważ różne pochodne może cechować odmienna aktywność biologiczna. Dotychczas sądzono, że oznaczenie zawartości GLS, z których powstają ITC jest wystarczające do oceny potencjału prozdrowotnego rośliny. Wyniki badań uzyskane podczas określania stopnia konwersji GLS do ITC w różnych częściach kapusty białej i przedstawione na rys. 8 w załączniku V potwierdzają, że proces katalizowanej przez mirozynazę hydrolizy GLS może prowadzić do powstania innych niż ITC związków. Uzyskane dane pokazały także, że ilość uwolnionych ITC może być nawet kilkanaście razy mniejsza, niż wynikałoby to z zawartości GLS. Należy przy tym zauważyć, że zaadaptowana metodyka oznaczania zawartości ITC zaproponowana przez Zhanga [76] daje tylko informację dotyczącą całkowitej zawartości tych związków w materiale roślinnym i nie pozwala określić, które ITC powstają w największych ilościach w roślinie, te o największym udokumentowanym potencjale prozdrowotnym takie jak AITC, BITC, PEITC bądź SFN, czy może mniej poznane EITC, MITC, PITC, 3-MTPITC bądź 4-MTBITC. Możliwość oznaczenia składu ilościowego i jakościowego powstałych ITC otwiera drogę do kolejnych badań, m.in. powiązania składu ITC z aktywnością biologiczną, np. aktywnością cytotoksyczną próbek roślinnych w stosunku do komórek nowotworowych okrężnicy (HT29) jako modelu układu pokarmowego bądź wyjaśnieniu wpływu poszczególnych ITC na aktywność enzymów detoksykacyjnych. Takie powiązanie analizy chemicznej z działaniem biologicznym w przyszłości może dać nowy wgląd w chemoprewencyjne właściwości tej ważnej grupy bioaktywnych związków fitochemicznych.

## 10. Dorobek naukowy

### Publikacje:

1. **Pilipczuk T.**, Piekarska A., Kuszniereicz B., Bartoszek-Pączkowska A., Namieśnik J.: Biofumigacja jako przyjazna środowisku technologia ochrony roślin, *Analityka nauka i praktyka*, 2013, 1: 36-46
2. Piekarska A., Kuszniereicz B., Kołodziejcki D., **Pilipczuk T.**, Szczygłowska M., Bodnar M., Bączek-Kwinta R., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A.: The Innovative Exploitation of Brassica Vegetables in the Health Quality Food Production Chain, *ACTA Horticulturae*, 2013, 1005: 71-85
3. Piekarska A., Kołodziejcki D., **Pilipczuk T.**, Bodnar M., Konieczka P., Kuszniereicz B., Hanschen F.S., Schreiner M., Cyprys J., Groszewska J., Namieśnik J., Bartoszek A.: The influence of selenium addition during germination of Brassica seeds on health-promoting potential of sprouts, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2014, 15: 1-11
4. **Pilipczuk T.**, Kuszniereicz B., Zielińska D., Bartoszek A.: The influence of roasting and additional processing on the content of bioactive components in special purpose coffees, *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52: 5736-5744
5. **Pilipczuk T.**, Kuszniereicz B., Namieśnik J., Bartoszek A.: Simultaneous determination of indolic compounds in plant extracts by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection, *Food Analytical Methods*, 2015, 8(9), p. 2168-2177
6. Koss-Mikołajczyk I., Lewandowska A., **Pilipczuk T.**, Kuszniereicz B., Bartoszek A.: Composition of bioactive secondary metabolites and mutagenicity of *Sambucus nigra* L. fruit at different stages of ripeness. *Acta Alimentaria*, 2016, 45(3), p. 442-451
7. **Pilipczuk T.**, Kuszniereicz B., Chmiel T., Przychodzeń W., Bartoszek A.: Simultaneous determination of individual isothiocyanates in plant samples by HPLC-DAD-MS following SPE and derivatization with *N*-acetyl-L-cysteine. *Food Chemistry*, 2017, 214, p. 587-596

### Referaty komunikaty i postery:

1. Kołodziejcki D., **Pilipczuk T.**, Fedejko - Kap B., Dopierała A., Bartoszek-Pączkowska A., DNA restriction analysis as a supportive tool in mechanistic studies carried out by <sup>32</sup>P-postlabelling, Munster, Niemcy, 28-28 marca 2011, *Mutagenesis*. 26 (5), 2011, p. 708-709
2. Piekarska A., **Pilipczuk T.**, Kuszniereicz B., Bartoszek A., Namieśnik J., The influence of cultivation conditions on the myrosinase activity and glucosinolate content in white cabbage, The



- 11th Conference of the Polish Cell Biology Society, 5-9 września 2011, Kraków, Poland, Acta Biochimica Polonica. 58, 2011, p 225
3. **Pilipczuk T.**, Kusznierevicz B., Zielińska D., Bartoszek A., Comparison of antioxidant properties and polyphenol composition of special purpose coffees roasted in Poland, EuroFoodChem XVI, Translating food chemistry into health benefits, 6-8 lipca 2011, Gdańsk, Polska, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 61, 2011, p. 62. (Young Research Award)
  4. **Pilipczuk T.**, Kusznierevicz B., Piekarska A., Namieśnik J., Bartoszek A., Influence of cultivation conditions on the content of isothiocyanates in white cabbage, The 5th International Conference on the Quality and Safety in Food Production Chain, 19-20 września 2011, Wrocław, Polska
  5. **Pilipczuk T.**, Bartoszek A., Namieśnik J., Kusznierevicz B., Improved determination of indolic compounds in Brassica plants using high performance liquid chromatography with fluorescence detection, 29th International Symposium on Chromatography, 9-13 wrzesień 2012, Toruń, Polska
  6. Piekarska A., Kołodziejcki D., **Pilipczuk T.**, Kusznierevicz B., Namieśnik J., Bartoszek A., The influence of selenium addition during germination of Brassica seeds on the content of bioactive compounds in sprouts, 47th Congress of the Polish Biochemical Society Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 11-14 września 2012, Poznań, Polska, Acta Biochimica Polonica, 59, 2012, p. 205
  7. Poleska-Muchlado Z., Kusznierevicz B., Jarmolińska M., Bączek-Kwinta R., Piekarska A., **Pilipczuk T.**, Kołodziejcki D., Bartoszek A., The cultivation of cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*) on heavy metal polluted soils increases glucosinolate biosynthesis and biological potential, 42nd European Environmental Mutagen Society, 16-20 września 2012, Warszawa, Polska
  8. Poleska-Muchlado Z., Piekarska A., Kusznierevicz B., **Pilipczuk T.**, Szczygłowska M., Malinowska-Pańczyk E., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A.: The comparison of biological potential of white cabbage varieties using the accumulated survival index (asi) concept, EuroFoodChem XVII, 07-10 maja 2013, Stambuł, Turcja
  9. Kołodziejcki D., Piekarska A., **Pilipczuk T.**, Kusznierevicz B., Namieśnik J., Bartoszek A., Meyer R., Emanuel M.: Brassica sprouts as a functional food enriched in organic forms of selenium: influence on activity of cytoprotective enzymes, EuroFoodChem XVII, 07-10 maja 2013, Stambuł, Turcja
  10. Piekarska A., Kołodziejcki D., **Pilipczuk T.**, Kusznierevicz B., Namieśnik J., Bartoszek A.: Brassica sprouts as a functional food enriched in organic forms of selenium, EuroFoodChem XVII, 07-10 maja 2013, Stambuł, Turcja



11. Kuznierewicz B., Kowalska A., Szczygłowska M., **Pilipczuk T.**, Piekarska A., Dzedziul K., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A.: The impact of soil contamination by heavy metals on bioactive compounds in white cabbage, EuroFoodChem XVII, 07-10 maja 2013, Stambuł, Turcja
12. Łyczko L., Starzycki M., **Pilipczuk T.**, Bartoszek A.: Comparative analysis of the content of isothiocyanates in mustards available on the polish market and in mustards prepared according to innovative recipes, EuroFoodChem XVII, 07-10 maja 2013, Stambuł, Turcja
13. Poleska-Muchlado Z., Piekarska A., Szczygłowska M., **Pilipczuk T.**, Kowalska A., Hinca I., Tylingo R., Kuznierewicz B., Dzedziul K., Namieśnik J., Konieczka P., Bartoszek A., Bączek-Kwinta R.: Aktywność cytotoksyczna wyrażona jako "Skumulowany Indeks Przeżywalności" - wykorzystanie do przewidywania potencjału fitoremediacyjnego i biofumigacyjnego roślin kapustowatych, Fitoremediacja - skuteczny zabieg sozotechniczny, 5-7 czerwca 2013, Gdańsk, Polska
14. Piekarska A., Kołodziejki D., **Pilipczuk T.**, Bodnar M., Konieczka P., Kuznierewicz B., Bartoszek A.: Zdolność roślin z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) do akumulacji selenu. Badania modelowe z użyciem nasion kiełkowanych na pożywkach z selenem, Fitoremediacja - skuteczny zabieg sozotechniczny, 5-7 czerwca 2013, Gdańsk, Polska
15. Piekarska A., Szczygłowska M., **Pilipczuk T.**, Kowalska A., Kuznierewicz B., Namieśnik J., Konieczka P., Bartoszek A., Bączek-Kwinta R.: Wpływ metali ciężkich na aktywność enzymatyczną mirozynazy w kapuście białej pochodzącej z upraw kontrolowanych, Fitoremediacja - skuteczny zabieg sozotechniczny, 5-7 czerwca 2013, Gdańsk, Polska
16. Kuznierewicz B., Kowalska A., Szczygłowska M., **Pilipczuk T.**, Piekarska A., Dzedziul K., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A.: Wpływ zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi na zawartość substancji bioaktywnych w uprawach kapusty białej, Fitoremediacja - skuteczny zabieg sozotechniczny, 5-7 czerwca 2013, Gdańsk, Polska
17. Bartoszek A., Piekarska A., Kuznierewicz B., Kołodziejki D., Pilipczuk T., Szczygłowska M., Bodnar M., Konieczka P., Namieśnik J.: The innovative exploitation of Brassica vegetables in the production of quality food for health. From lab bench to field and fork. Pharmaceutical and food technologies and the system of education: legal aspects: cbornik haycznych stateli, Białoruś, 2013, str. 3-7
18. Bartoszek A., Kuznierewicz B., Lewandowska A., Piekarska A., Pilipczuk T., Kołodziejki D., Koss I., Konieczka P., Namieśnik T., Discoveries of experimental chemoprevention - how to exploit them in rational design of health quality and therapeutic foods, XVII Gliwickie Spotkania Naukowe 2013, 15-16 listopada 2013, Gliwice, Polska

19. Kusznierevicz B., Kowalska A., Piekarska A., **Pilipczuk T.**, Poleska-Muchlado Z., Bartoszek A.: Wpływ wybranych środków ochrony roślin na zawartość substancji bioaktywnych w uprawach kapusty białej, Fitoremediacja - skuteczny zabieg sozotechniczny, 5-7 czerwca 2013, Gdańsk, Polska
20. **Pilipczuk T.**, Koss I., Dawidowska N., Osowicka M., Bartoszek A., Zależność między składem produktów hydrolizy glukozynolanów a potencjałem biologicznym ekstraktów z wybranych roślin Brassica, III Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne: Symbioza, 16-18 maja 2014, Warszawa, Polska
21. **Pilipczuk T.**, Kołodziejcki D., Piekarska A., Kusznierevicz B., Bartoszek A., The conversion rate of glucosinolates to bioactive isothiocyanates and indoles in different parts of Brassica species, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26-29 maja 2014, Lublin, Polska
22. **Pilipczuk T.**, Koss I., Dawidowska N., Osowicka M., Bartoszek A., Determination of the content of glucosinolates, isothiocyanates and indoles in white, green and violet cauliflower in relation to biological activity, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26-29 maja 2014, Lublin, Polska
23. Kołodziejcki D., **Pilipczuk T.**, Piekarska A., Zieliński D., Bartoszek A., Relationship between conversion rate of glucosinolates to isothiocyanates / indoles and genotoxicity of different Brassica parts. Proceedings 3rd International Glucosinolate Conference 2014. 12-15 października 2014, Wageningen, Holandia.
24. Bartoszek A., Parchem K., Rękawiecka A., **Pilipczuk T.**, Ahuja I., Bones A.M.: The composition of glucosinolates, their degradation products and the oil content in the myrosinase-deficient mineless oilseed rape seeds. 58 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego. 21-25 września 2015, Gdańsk, Polska.
25. Bartoszek A., Kusznierevicz B., Piekarska A., Szczygłowska M., Łuczak J., Bączek-Kwinta R., Antonkiewicz J., Poleska-Muchlado Z., **Pilipczuk T.**, Malinowska-Pańczyk E., Grzywa-Niksińska I., Namieśnik J., Klimaszewska K., Konieczka P. The exploitation of white cabbage for the soil phytoremediation and biofumigation - overview of the results of the project AGROBIOKAP. Glucosinolates & beyond : Proceedings - 3rd International glucosinolates conference 2014. 12-15 października 2014. Wageningen, Holandia.
26. **Pilipczuk T.**, Koss-Mikołajczyk I., Dawidowska N., Osowicka M., Bartoszek A. Determination of glucosinolates, isothiocyanates and indoles content and their biological activity in Brassica plants. 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products. 26-29 maja 2014, Lublin, Polska.

27. Bartoszek A., Kuszniereicz B., Piekarska A., Szczygłowska M., Łuczak J., Bączek-Kwinta R., Poleska-Muchlado Z., **Pilipczuk T.**, Malinowska-Pańczyk E., Namieśnik J., Klimaszewska K., Konieczka P., Utilizing white cabbage for the phytoremediation and biofumigation of soils - overview of the results of the project AGROBIOKAP, 1st International Conference of Food Properties, 24-26 stycznia 2014, Kuala Lumpur, Malezja
28. Bartoszek A., Kuszniereicz B., Piekarska A., Kołodziejcki D., **Pilipczuk T.**, Koss-Mikołajczyk I., Namieśnik J., Determination of individual isothiocyanates/indoles occurring as a result of glucosinolate degradation and their relation to biological potential of different Brassica plants, AACR 106<sup>th</sup> Annual Meeting 2015, 18-22 kwietnia 2015, Filadelfia, USA, Cancer Research. 08/2015; 75(15 Supplement):913-913
29. Koss-Mikołajczyk I., **Pilipczuk T.**, Kuszniereicz B., Hanschen F., Dawidowska N., Osowicka M., Zieliński D., Bartoszek A., Correlation of the phytochemical composition of Tyree cauliflower varieties with their biological activity. EuroFoodChem XVIII. 13-16 października 2015, Madryt, Hiszpania.
30. Kuszniereicz B., Koss-Mikołajczyk I., **Pilipczuk T.**, Lewandowska A., Bartoszek-Pączkowska A., Composition of bioactive secondary metabolites and mutagenicity of elderberry (*Sambucus nigra* L.) fruits at different stages of ripeness. 58 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego. 21-25 września 2015, Gdańsk, Polska.

#### **Wystąpienia ustne:**

1. Pilipczuk T., Oznaczanie zawartości izotiocyjanianów w ekstraktach z roślin kapustowatych, Materiały Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 15-16 września 2012, Gdańsk, Polska
2. Pilipczuk T., Opracowanie metody oznaczania zawartości izotiocyjanianów w próbkach roślin z rodziny *Brassicaceae* po ich derywatywacji do ditiokarbaminianów, Materiały Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 15-16 września 2013, Gdańsk, Polska

#### **Nagrody i wyróżnienia:**

1. Pilipczuk T., Kuszniereicz B., Zielińska D., Bartoszek A., Comparison of antioxidant properties and polyphenol composition of special purpose coffees roasted in Poland, EuroFoodChem XVI, Translating food chemistry into health benefits, 6-8 lipca 2011, Gdańsk, Polska, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 61, 2011, p. 62. (Young Research Award)

### Staż zagraniczny:

1. Trzymiesięczny pobyt w ramach programu FSS w Department of Nutrition, University of Oslo, Norwegia
2. Trzymiesięczny pobyt w ramach projektu InterPhD w Laboratory of Proteinscience, Proteomics and Epigenetic Signaling, University of Antwerp, Belgia – realizacja projektu “Epigenetic technology for food science”

## 11. Bibliografia

1. Khurshid, H., Rabbani, M. A., *Comparison of electrophoretic protein profiles from seed of different oilseed Brassica cultivars*. Journal of Public Health and Biological Sciences, 2012. **1**(2): p. 36-42.
2. Kumar A., *Challenge of edible oils: Can Brassica deliver?*. Journal of Oilseed Brassica, 2014. **5**(2): p. 83-86.
3. Ahuja, I., J. Rohloff, and A.M. Bones, *Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review*. Agronomy for Sustainable Development, 2010. **30**(2): p. 311-348.
4. Pasko, P., et al., *Rutabaga (Brassica napus L. var. napobrassica) seeds, roots, and sprouts: a novel kind of food with antioxidant properties and proapoptotic potential in Hep G2 hepatoma cell line*. Journal of Medicinal Food, 2013. **16**(8): p. 749-59.
5. Cassida, K.A., et al., *Feed intake and apparent digestibility of hay-supplemented brassica diets for lambs*. Journal of Animal Science, 1994. **72**(6): p. 1623-9.
6. Bjorkman, M., et al., *Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health--influences of climate, environment and agronomic practice*. Phytochemistry, 2011. **72**(7): p. 538-56.
7. Manachini, B., S. Landi, and V. Tomasini, *Biodiversity of nematofauna of oilseed rape (Brassica napus L.)*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 2005. **70**(4): p. 927-35.
8. Jaen-Molina, R., et al., *The molecular phylogeny of Matthiola R. Br. (Brassicaceae) inferred from ITS sequences, with special emphasis on the Macaronesian endemics*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009. **53**(3): p. 972-81.
9. Li, Y., et al., *Phylogeny and biogeography of Alyssum (Brassicaceae) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences*. Journal of Genetics, 2014. **93**(2): p. 313-23.
10. Sadowska, A., et al., *Substancje bioaktywne w surowcach pochodzenia roślinnego i roślinach zielarskich*. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, Warszawa. 2014.
11. Pichersky, E. and D.R. Gang, *Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective*. Trends in Plant Science, 2000. **5**(10): p. 439-45.
12. Kobylińska, A. and K. Janas, *Kwercetyna, ważny flawonoid w życiu roślin*. Kosmos, 2015. **64**(1): p. 113-127.



13. Loub, W.D., L.W. Wattenberg, and D.W. Davis, *Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occurring indoles of cruciferous plants*. Journal of the National Cancer Institute, 1975. **54**(4): p. 985-8.
14. Wattenberg, L.W. and W.D. Loub, *Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles*. Cancer Research, 1978. **38**(5): p. 1410-3.
15. Benito, E., et al., *A population-based case-control study of colorectal cancer in Majorca. I. Dietary factors*. International Journal of Cancer, 1990. **45**(1): p. 69-76.
16. Chyou, P.H., et al., *A case-cohort study of diet and stomach cancer*. Cancer Research, 1990. **50**(23): p. 7501-4.
17. Le Marchand, L., et al., *Vegetable consumption and lung cancer risk: a population-based case-control study in Hawaii*. Journal of the National Cancer Institute, 1989. **81**(15): p. 1158-64.
18. Olsen, G.W., et al., *A case-control study of pancreatic cancer and cigarettes, alcohol, coffee and diet*. American Journal of Public Health, 1989. **79**(8): p. 1016-9.
19. Shu, X.O., et al., *Dietary factors and epithelial ovarian cancer*. British Journal of Cancer, 1989. **59**(1): p. 92-6.
20. Wargovich, M.J., *New dietary anticarcinogens and prevention of gastrointestinal cancer*. Diseases of the Colon and Rectum, 1988. **31**(1): p. 72-5.
21. Fahey, J.W., Y. Zhang, and P. Talalay, *Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(19): p. 10367-72.
22. Cheung, K.L., T.O. Khor, and A.N. Kong, *Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation*. Pharmaceutical Research, 2009. **26**(1): p. 224-31.
23. Keck, A.S. and J.W. Finley, *Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium*. Integrative Cancer Therapies, 2004. **3**(1): p. 5-12.
24. Nestle, M., *Broccoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme systems: clinical, dietary, and policy implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(21): p. 11149-51.
25. Murillo, G. and R.G. Mehta, *Cruciferous vegetables and cancer prevention*. Nutrition and Cancer, 2001. **41**(1-2): p. 17-28.
26. Gamet-Payraastre, L., et al., *Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells*. Cancer Research, 2000. **60**(5): p. 1426-33.
27. Jellinck, P.H., et al., *Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation*. Biochemical Pharmacology, 1993. **45**(5): p. 1129-36.
28. Dashwood, R.H. and E. Ho, *Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man*. Seminars in Cancer Biology, 2007. **17**(5): p. 363-9.



29. Rosen, C.A. and P.C. Bryson, *Indole-3-carbinol for recurrent respiratory papillomatosis: long-term results*. Journal of Voice, 2004. **18**(2): p. 248-53.
30. Sung, W.S. and D.G. Lee, *The candidacidal activity of indole-3-carbinol that binds with DNA*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2007. **59**(6): p. 408-12.
31. Kim, J.K., et al., *Phenethyl isothiocyanate and indole-3-carbinol from cruciferous vegetables, but not furanocoumarins from apiaceous vegetables, reduced PhIP-induced DNA adducts in Wistar rats*. Molecular Nutrition and Food Research, 2016. **60**(9): p. 1956-66.
32. Wang, D., et al., *Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway*. Current Biology, 2007. **17**(20): p. 1784-1790.
33. Halliday, K.J., J.F. Martinez-Garcia, and E.M. Josse, *Integration of light and auxin signaling*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009. **1**(6): p. a001586.
34. Simon, S. and J. Petrasek, *Why plants need more than one type of auxin*. Plant Science, 2011. **180**(3): p. 454-60.
35. Arnao, M.B., J. SanchezBravo, and M. Acosta, *Indole-3-carbinol as a scavenger of free radicals*. Biochemistry and Molecular Biology International, 1996. **39**(6): p. 1125-1134.
36. Park, W.J., et al., *The Nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid*. Plant Physiology, 2003. **133**(2): p. 794-802.
37. Sparnins, V.L., P.L. Venegas, and L.W. Wattenberg, *Glutathione S-Transferase Activity - Enhancement by Compounds Inhibiting Chemical Carcinogenesis and by Dietary Constituents*. Journal of the National Cancer Institute, 1982. **68**(3): p. 493-496.
38. Grose, K.R. and L.F. Bjeldanes, *Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid*. Chemical Research in Toxicology, 1992. **5**(2): p. 188-93.
39. Chen, L., et al., *Indole-3-carbinol (I3C) increases apoptosis, represses growth of cancer cells, and enhances adenovirus-mediated oncolysis*. Cancer Biology and Therapy, 2014. **15**(9): p. 1256-67.
40. Kim, E.K., et al., *Indole-3-carbinol and 3',3'-diindolylmethane modulate androgen's effect on C-C chemokine ligand 2 and monocyte attraction to prostate cancer cells*. Cancer Prevention Research, 2013. **6**(6): p. 519-29.
41. Enriquez, J., et al., *The anti-estrogenic activity of indole-3-carbinol in neonatal rat osteoblasts is associated with the estrogen receptor antagonist 2-hydroxyestradiol*. Journal Of Endocrinological Investigation, 2016. **39**(10): p. 1149-58.
42. Wattenberg, L.W. and W.D. Loub, *Inhibition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Neoplasia by Naturally Occurring Indoles*. Cancer Research, 1978. **38**(5): p. 1410-1413.
43. He, Y.H., et al., *Indole-3-carbinol as a chemopreventive agent in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) carcinogenesis: inhibition of PhIP-DNA adduct formation, acceleration of PhIP metabolism, and induction of cytochrome P450 in female F344 rats*. Food and Chemical Toxicology, 2000. **38**(1): p. 15-23.
44. Gerhauser, C., *Epigenetic impact of dietary isothiocyanates in cancer chemoprevention*. Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care, 2013. **16**(4): p. 405-10.

45. Fimognari, C., et al., *Natural isothiocyanates: genotoxic potential versus chemoprevention*. Mutation Research, 2012. **750**(2): p. 107-31.
46. Holst, B. and G. Williamson, *A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds*. Natural Products Reports, 2004. **21**(3): p. 425-47.
47. Dinkova-Kostova, A.T., *Chemoprotection Against Cancer by Isothiocyanates: A Focus on the Animal Models and the Protective Mechanisms*. Natural Products in Cancer Prevention and Therapy, 2013. **329**: p. 179-201.
48. Surh, Y.J. and H.K. Na, *NF-kappaB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals*. Genes and Nutrition, 2008. **2**(4): p. 313-7.
49. Talalay, P. and J.W. Fahey, *Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism*. Journal of Nutrition, 2001. **131**(11): p. 3027S-3033S.
50. Myzak, M.C., et al., *A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase*. Cancer Research, 2004. **64**(16): p. 5767-74.
51. Zhao, B., et al., *Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase -M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 2001. **10**(10): p. 1063-7.
52. Lam, T.K., et al., *Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: a systematic review*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 2009. **18**(1): p. 184-95.
53. Seow, A., et al., *Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study*. Carcinogenesis, 2002. **23**(12): p. 2055-61.
54. Kirsh, V.A., et al., *Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 2007. **99**(15): p. 1200-9.
55. Wu, L. and B.H. Juurlink, *The impaired glutathione system and its up-regulation by sulforaphane in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. Journal of Hypertension, 2001. **19**(10): p. 1819-25.
56. Angeloni, C., et al., *Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(12): p. 5615-22.
57. Adams, M.R., et al., *A diet rich in green and yellow vegetables inhibits atherosclerosis in mice*. Journal of Nutrition, 2006. **136**(7): p. 1886-9.
58. Mukherjee, S., H. Gangopadhyay, and D.K. Das, *Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(2): p. 609-17.
59. Murashima, M., et al., *Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts*. Biofactors, 2004. **22**(1-4): p. 271-5.
60. Liu, S., et al., *Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study*. American Journal of Clinical Nutrition, 2000. **72**(4): p. 922-8.



61. Hsia, H. and D. Fan, *Nutritive composition for cardiovascular health*. Google patents, 2003.
62. Yanaka, A., et al., *Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in Helicobacter pylori-infected mice and humans*. *Cancer Prevention Research*, 2009. **2**(4): p. 353-60.
63. Slaby, O., et al., *Identification of microRNAs regulated by isothiocyanates and association of polymorphisms inside their target sites with risk of sporadic colorectal cancer*. *Nutrition and Cancer*, 2013. **65**(2): p. 247-54.
64. Pappa, G., et al., *Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae*. *Mutation Research*, 2006. **599**(1-2): p. 76-87.
65. Novio, S., et al., *Effects of Brassicaceae Isothiocyanates on Prostate Cancer*. *Molecules*, 2016. **21**(5).
66. Brandi, G., et al., *Mechanisms of action and antiproliferative properties of Brassica oleracea juice in human breast cancer cell lines*. *Journal of Nutrition*, 2005. **135**(6): p. 1503-9.
67. Lewandowska, A., et al., *Isothiocyanates may chemically detoxify mutagenic amines formed in heat processed meat*. *Food Chemistry*, 2014. **157**: p. 105-110.
68. Bradfield, C.A. and L.F. Bjeldanes, *High-performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987. **35**(1): p. 46-49.
69. Suh, S.-J., S.-K. Moon, and C.-H. Kim, *Raphanus sativus and its isothiocyanates inhibit vascular smooth muscle cells proliferation and induce G1 cell cycle arrest*. *International Immunopharmacology*, 2006. **6**(5): p. 854-861.
70. Hrnčirik, K., J. Valusek, and J. Velisek, *Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in Brassica vegetables*. *European Food Research and Technology*, 2001. **212**(5): p. 576-581.
71. Hayashi, T., et al., *Sensitive determination of deuterated and non-deuterated indole-3-acetic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid by combined capillary gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry*. *Journal of Chromatography*, 1988. **428**(2): p. 209-19.
72. Sepkovic, D.W., H.L. Bradlow, and M. Bell, *Quantitative determination of 3,3'-diindolylmethane in urine of individuals receiving indole-3-carbinol*. *Nutrition and Cancer*, 2001. **41**(1-2): p. 57-63.
73. Ong, C. and F. Elbarbry, *A new validated HPLC method for the determination of sulforaphane: application to study pharmacokinetics of sulforaphane in rats*. *Biomedical Chromatography*, 2016. **30**(7): p. 1016-21.
74. Manning, K., *Heterologous enzyme immunoassay for the determination of free indole-3-acetic acid (IAA) using antibodies against ring-linked IAA*. *Journal of Immunological Methods*, 1991. **136**(1): p. 61-8.
75. Terry, P.H., F.W. Snyder, and R.A. Saftner, *Quantitative determination of indole-3-acetic Acid in sugarbeet leaves using a double standard isotope dilution gas chromatographic assay*. *Plant Physiology*, 1986. **80**(1): p. 287-90.



76. Zhang, Y.S., et al., *Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol*. Analytical Biochemistry, 1996. **239**(2): p. 160-167.
77. Aissani, N., et al., *Nematicidal Activity of Allylisothiocyanate from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots against *Meloidogyne incognita**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(20): p. 4723-4727.
78. Matich, A.J., et al., *Selenoglucosinolates and their metabolites produced in Brassica spp. fertilised with sodium selenate*. Phytochemistry, 2012. **75**: p. 140-152.
79. Hanschen, F.S., et al., *Thermally Induced Degradation of Sulfur-Containing Aliphatic Glucosinolates in Broccoli Sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Model Systems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(9): p. 2231-2241.
80. Chiang, W.C.K., D.J. Pusateri, and R.E.A. Leitz, *Gas chromatography mass spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in broccoli*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(3): p. 1018-1021.
81. Chen, C.W. and C.T. Ho, *Thermal Degradation of Allyl Isothiocyanate in Aqueous Solution*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(1): p. 220-223.
82. Hauder, J., et al., *LC-MS/MS Quantification of Sulforaphane and Indole-3-carbinol Metabolites in Human Plasma and Urine after Dietary Intake of Selenium-Fortified Broccoli*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(15): p. 8047-8057.
83. Ji, Y. and M.E. Morris, *Determination of phenethyl isothiocyanate in human plasma and urine by ammonia derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2003. **323**(1): p. 39-47.