

Unicampus
Kubelkova 1224/42
13000 Praha

Sp. zn./Ident.:
Č.j.: DRD/697/2014

Poskytnutí informace v souladu se žádostí podle zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím

Vážení,

Radě pro rozhlasové a televizní vysílání (dále jen „Rada“) byla dne 19. února 2014 pod č.j. 1442/2014 doručena žádost o poskytnutí informace ve smyslu zákona č. 106/1999 Sb. (dále jen „žádost“), ve které Unicampus, z.s. žádá o kopii správního spisu týkajícího se společnosti WALMARK, a.s. a televizní reklamy na doplněk stravy Decolen, respektive podnětu Unicampu, z.s. (dříve Unicampus, o.s.) ze dne 22. června 2012.

Žádost byla dostatečným způsobem označena jako žádost o poskytnutí informace ve smyslu zákona č. 106/1999 Sb. Ačkoliv byla žádost sepsána jako hromadná (pro více povinných subjektů), bylo z ní dostatečně zřejmé, v jakém rozsahu je určena Radě.

Součástí výše specifikované žádosti bylo její upřesnění, které znělo:

V případech, ve kterých nebyla zahájena správní řízení, uvítáme zaslání informací, na jejichž základě se tak stalo a především vaši prokazatelnou písemnou informaci o této skutečnosti.

V souladu se zněním ustanovení § 14 odst. 5 písm. d) zákona č. 106/1999 Sb. Vám tedy sdělujeme následující:

Radě pro rozhlasové a televizní vysílání byl dne 22. června 2012 doručen podnět občanského sdružení Unicampus o. s. ve věci reklamy DECOLEN, ve kterém bylo uvedeno, že *je spotřebitelům uváděno zejména tvrzení, že složení výrobku má hormonální vliv na tkáň lidského prsu ve smyslu účinku na tkáň prsní žlázy, a to do takové míry, že dochází ke tkáňovým změnám typu růstu a vývoje tkáň prsní žlázy, v jejich důsledku se mění tvar ženských prsou. Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky skutečně disponuje, jedná se zcela jednoznačně o léčivý přípravek „dle funkce“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. b) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech. V takovém případě se dopouští společnost Walmark protiprávní reklamy výrobku DECOLEN ve smyslu § 5 odst. 3 zákona č. 40/1995 Sb., o regulaci reklamy a nekalé (klamavé) obchodní praktiky vůči spotřebiteli ve smyslu zákona č. 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele tím, že klame spotřebitele o povaze výrobku uváděním textu „doplněk stravy“. Výrobek DECOLEN je totiž dle své funkce léčivým přípravkem, neregistrovaným na našem trhu. Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky objektivně nedisponuje, a výrobce není schopen unést důkazní břemeno spočívající v důkazu všeobecné vědecké akceptace poznatků o hormonálním a přírůstovém vlivu účinných látek výrobku DECOLEN na tkáň prsní žlázy (nebo tukovou tkáň prsu?), pak zůstává objektivní skutečností, že výrobek DECOLEN byl prezentován jako léčivý přípravek. Kdyby výrobek*

DECOLEN skutečně disponoval vlastnostmi uváděnými v jeho obchodní prezentaci, tak by se jednoznačně jako léčivý přípravek „dle funkce“ kvalifikoval, a proto se kvalifikuje jako léčivý přípravek „dle prezentace“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. a) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech.

Bylo zjištěno, že se jedná o reklamu DECOLEN, odvysílanou premiérově dne 1. 6. 2012 od 7:16:54 hodin na programu Óčko, v celkovém počtu 1041 repríz za období června 2012 na programech AXN, CS Film, Nova, Nova Cinema, prima Family, Prima Cool, Prima Love, Spektrum, Universal Channel, Film+ a TV Paprika.

Na základě předmětného podnětu přistoupila Rada k postupu před zahájením správního řízení (podle ustanovení § 137 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád) a požádala zadavatele předmětné reklamy, aby k obsahu stížnosti podal vysvětlení.

Zadavatel reklamy, společnost WALMARK, a.s., podal prostřednictvím svého právního zástupce vysvětlení, které bylo Radě doručeno dne 3. srpna 2012.

Na základě posouzení veškerých získaných skutečností, včetně analýzy audiovizuálního obsahu obchodního sdělení, dospěla Rada k závěru, že zde nejsou důvody pro zahájení správního řízení, neboť v reklamě nebyly shledány žádné prvky, které by navozovaly léčebný účinek daného přípravku.

Ve věci námítka uvedená ve výše specifikovaném podnětu, že se jedná o léčivo s ohledem na judikaturu Evropského soudního dvora, postoupila Rada podnět Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv coby kompetentnímu orgánu.

Ze strany Rady nedošlo tedy v předmětné věci k zahájení správního řízení, na základě čehož nebylo potřebné založit správní spis ve smyslu § 17 zákona č. 500/2004 Sb.

Z tohoto důvodu není možné poskytnout kopii správního spisu, neboť ten v předmětné věci neexistuje, a Rada tímto vyhovuje žádosti o informaci ve smyslu jejího výše citovaného upřesnění.

Pro úplnost zasílá Rada jako přílohu tohoto poskytnutí informace podle zákona č. 106/1999 Sb. korespondenci, kterou v předmětné věci vedla, a to:

- žádost o podání vysvětlení adresovanou společnosti WALMARK, a.s.
- podání vysvětlení ze strany společnosti WALMARK, a.s.
- postoupení podnětu Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv
- oznámení ze strany Státního ústavu pro kontrolu léčiv o ukončení šetření podnětu

S pozdravem

V Praze dne: 21.2.2014

JUDr. Kateřina Kalistová

*předsedkyně Rady
pro rozhlasové a televizní vysílání*

Přílohy: Dokument (ukázka, 21.2.2014, Žádost o podání vysvětlení), Dokument (ukázka, 21.2.2014, Podání vysvětlení), Dokument (ukázka, 21.2.2014, Postoupení SUKLu), Dokument (ukázka, 21.2.2014, Oznámení SUKLu)



**RADA
PRO ROZHLASOVÉ A TELEVIZNÍ
VYSÍLÁNÍ**

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání

Škrétova 44/6, 120 00 Praha 2

Tel.: + 420 274 813 830 / Fax: + 420 274 810 885 / e-mail: info@rrtv.cz
www.rrtv.cz

WALMARK a.s.

Oldřichovice 44

739 61 Třinec

Česká republika

Sp. zn./Ident.: 2012/518/had/WAL

Č.j.: had/2375/2012

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání (dále jen „Rada“) prostřednictvím předsedkyně Rady v rámci své kompetence dané § 5 písm. a) a f) zákona č. 231/2001 Sb., o provozování rozhlasového a televizního vysílání a o změně dalších zákonů, v platném znění (dále jen „zákon č. 231/2001 Sb.“), článkem 3 odst. 2 Jednacího řádu Rady a v souladu s ustanoveními § 46 a § 134 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád (dále jen „zákon č. 500/2004 Sb.“)

žádá

společnost *Walmart, a. s., Oldřichovice 44, 739 61 Třinec, IČ CZ00536016* o podání vysvětlení dle § 137 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, k objasnění skutečností ve věci reklamy na přípravek DECOLEN a to ve vztahu k obsahu stížnosti doručené Radě dne 22. 6. 2012, která je součástí této žádosti, a to ve lhůtě 20 dnů ode dne doručení této výzvy.

Současně Vás žádáme o případné poskytnutí

- předmětného přípravku, zejména pak jeho obalu a dalšího příslušenství (příbalový leták, návod...) dodávaného spotřebiteli.
- Případných studií potvrzujících účinnost přípravku.
- Sdělení zdali přípravek je dostupný jen v ČR, případně v jakých dalších zemích a pod jakým názvem je prodáván.

Poučení:

Tomu, kdo bezdůvodně odepre podat vysvětlení, může správní orgán uložit pořádkovou dle § 137 odst. 2 zákona č. 500/2004 Sb. pokutu až do výše 5 000,- Kč.

V Praze dne: 27.6.2012

JUDr. Kateřina Kalistová

*předsedkyně Rady
pro rozhlasové a televizní vysílání*

Přílohy: Pošta (příchozí, 27.6.2012, Jan Vavrečka, Unicampus, o. s., 6006/2012/P, podnět - společnost Walmart DECOLEN)

Odesílatel: unicampus@seznam.cz

Adresát: info@rrtv.cz

Odesláno: 22.6.2012 11:18:03

Zpracováno: 25.6.2012 7:51:50

Předmět: Podání podnětu k zahájení správního řízení DECOLEN

Vážené vedení RRTV,

zasíláme Vám podnět k zahájení správního řízení proti společnosti Walmark za protiprávní způsob propagace neregistrovaného léčivého přípravku DECOLEN v udiovizuálních obchodních sděleních.

S pozdravem,

Jan Vavrečka

Unicampus, o. s.

Centrum vzdělávání, výzkumu a aplikace práva Kubelíkova 1224/42 130 00

Praha 3 - Žižkov

Adresát:

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání
Škrétkova 44/6, 120 21 Praha 2

Podání podnětu o zahájení správního řízení z moci úřední dle § 46 zákona č. 500/2004, správního řádu (dále jen SpŘ)

a prohlášení o vedlejších účastenství Unicampus, o. s. ve smyslu § 27 odst. 2 SpŘ v zahájeném správním řízení

ve věci:

Nařízení zdržení se dalšího protiprávního jednání vůči spotřebiteli ze strany společnosti WALMARK, a. s., Oldřichovice č.p. 44, 739 61 Trinec, v audiovizuálních obchodních sděleních propagujících neregistrovaný léčivý přípravek DECOLEN.

Unicampus, o. s. (dále jen „žadatel“) tímto žádá Radu pro rozhlasové a televizní vysílání (dále jen RRTV) jako věcně a místně příslušný dozorový orgán o vydání rozhodnutí nařizujícího společnosti WALMARK, a. s. (dále jen Walmark), zdržet se dalšího protiprávního jednání vůči spotřebiteli v audiovizuálních obchodních sděleních propagujících výrobek DECOLEN a v souvislosti s tímto správním rozhodnutím splnit mezinárodní oznamovací povinnost dle čl. 7. odst. 1 nařízení ES č. 2006/2004.

Unicampus, o. s. se dále na základě svých práv založených mu směrnicí 2009/22/ES prohlašuje za vedlejšího účastníka případně zahájeného správního řízení z moci úřední.

Odůvodnění žádosti uvádíme níže.

Jan Vavrečka
předseda sdružení
unicampus@seznam.cz
v Praze. dne 22. 6. 2012

Oprávnění Unicampus, o. s.

Směrnice 2009/22/ES založila našemu sdružení Unicampus, o. s. právo jehož výkon se přímo a výhradně váže k věci porušování zákonů na ochranu spotřebitele, jak jsou uvedeny v příloze I. této směrnice a provedeny do vnitrostátních právních předpisů jednotlivých členských států EU.

Výkon tohoto práva má směřovat zamýšleným účinkům směrnice 2009/22/ES - k dosažení ukončení protiprávního jednání vůči spotřebiteli. Naše sdružení může být dotčeno na svých právech a souvisejících povinnostech vyplývajících mu ze Stanov tím, pokud by nebylo dosaženo zdražení se protiprávního jednání společnosti Walmark, nebo bylo dosaženo zdržení se protiprávního jednání v nedostatečném rozsahu k objektivnímu rozsahu porušování zákonů na ochranu spotřebitele.

V smyslu § 27 odst. 2 SpŘ je proto naše sdružení Unicampus, o. s. vedlejším účastníkem tohoto správního řízení vedeného z moci úřední, pokud bude ze strany RRTV zahájeno.

Za vedlejšího účastníka řízení se tímto prohlašujeme.

Základní odůvodnění podání a související návrhy

Společnost Walmark protiprávně propaguje výrobek DECOLEN v tištěných i audiovizuálních reklamních materiálech.

Viz. například reklamní spoty TV vysílání na stanici PRIMA COOL 20. 6. 2012 (kolem 19:00 a 20:30). Je však vysoce pravděpodobné, že stejný spot byl vysílán v podobném období také na jiných stanicích.

V rámci propagace výrobku DECOLEN je spotřebitelům uváděno zejména tvrzení, že složení výrobku má hormonální vliv na tkáň lidského prsu (*mammy*) ve smyslu účinku na tkáň prsní žlázy, a to do takové míry, že dochází ke tkáňovým změnám typu růstu a vývoje tkáň prsní žlázy, v jejich důsledku se mění tvar ženských prsou.

Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky skutečně disponuje, a jeho reklama tedy není pouze další standardně klamavý paskvil společnosti Walmark, poté se jedná zcela jednoznačně o léčivý přípravek „dle funkce“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. b) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech. V takovém případě se dopouští společnost Walmark protiprávní reklamy výrobku DECOLEN ve smyslu § 5 odst. 3 zákona č. 40/1995 Sb., o regulaci reklamy a nekalé (klamavé) obchodní praktiky vůči spotřebiteli ve smyslu zákona 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele tím, že klame spotřebitele o povaze výrobku uváděním textu „doplňek stravy“. Výrobek DECOLEN je totiž dle své funkce léčivým přípravkem, neregistrovaným na našem trhu.

Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky objektivně nedisponuje, a výrobce není schopen unést důkazní břemeno spočívající v důkazu všeobecné vědecké akceptace poznatků o hormonálním a přírůstovém vlivu účinných látek výrobku DECOLEN na tkáň prsní žlázy (nebo tukovou tkáň prsu?), pak zůstává objektivní skutečností, že výrobek DECOLEN byl prezentován jako léčivý přípravek. Kdyby výrobek DECOLEN skutečně disponoval vlastnostmi uváděnými v jeho obchodní prezentaci, tak by se jednoznačně jako léčivý přípravek „dle funkce“ kvalifikoval, a proto se kvalifikuje jako léčivý přípravek „dle prezentace“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. a) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech.

Výrobek DECOLEN tedy nelze v žádném, případě kvalifikovat jako potravinu, potažmo ani jako doplňek stravy, pokud nebude odlišně postulováno a obhájeno tvrzení, že hormonální účinky na růst a vývoj tkání lidského těla jsou funkce, které léčivým přípravkům nepřísluší, a které proto obecně mohou vykazovat potravinářské, kosmetické a jiné výrobky – pokud se samozřejmě jedná o skutečnosti dostatečně vědecky prokázané.

Proto žádáme RRTV, aby nařídila společnosti Walmark zdržení se protiprávního jednání spočívajícího v jakékoliv další reklamě a propagaci neregistrovaného léčivého přípravku DECOLEN a s ohledem na všechny okolnosti a závažnost případu udělila společnosti Walmark sankci ve výši 3 000 000 Kč.

Dále žádáme RRTV, aby posléze informovala o této skutečnosti Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) a předala mu své rozhodnutí. Je již autonomní povinností SÚKL zajistit stažení výrobku z trhu v takovém případě.

S ohledem na objektivní skutečnost, že tento výrobek společnosti Walmark je nabízen a distribuován i v dalších členských státech EU, je naplněna definice protiprávního jednání uvnitř Společenství ve smyslu nařízení ES č. 2006/2004.

http://www.klubzdravia.sk/produkty/decolen_1243.aspx

http://www.walmark.eu/cz/Stranky/walmark_v_zahranici2.aspx

Proto žádáme RRTV, aby splnila svou oznamovací povinnost a postupovala v tomto případě dle čl. 7. odst. 1. nařízení ES 2006/2004, aby příslušné orgány ostatních členských států byla taktéž informovány a mohly zasáhnout na svých lokálních trzích ve prospěch ochrany spotřebitele.

Doplnění odůvodnění žádosti

- 1.) V souvislosti se stručnou a úspornou formou obsahu TV reklamních sdělení upozorňujeme RRTV na produktové stránky výrobku DECOLEN www.decolen.cz. (Zejména: Jak DECOLEN funguje?) Považujeme informace na těchto webových stránkách za důležité i pro posuzování TV reklamních spotů. Ve správním řízení by mělo být k jejich obsahu přihlíženo. Argumentace výrobce ve vztahu k vyznění sdělení z TV reklamy bude velmi pravděpodobně účelově manipulována směrem k takovému subjektivnímu záměru, který záměrem výrobce objektivně nebyl. Důkaz této skutečnosti, tedy důkaz jak výrobce skutečně vnímá účinky svého výrobku, pro které jej propaguje spotřebitelům, je obsažen právě na produktových stránkách výrobku. Spotřebitelé jsou dnes velmi často pouze inspirováni TV reklamou a hledají doplňující informace o výrobcích zejména na internetu. Sdělení z TV reklamy a internetové propagace výrobku DECOLEN vytváří informační komplex působení na spotřebitele, kdy obsah informací a claimů z TV reklamy je nutné vykládat právě v tom smyslu, jaký jim dává mnohem přesnější, rozsáhlejší a podrobnější oficiální internetová propagace téhož výrobku prováděná stejným subjektem.

Díličí informace o účincích výrobku DECOLEN uváděné na jeho produktových webových stránkách:

Decolen je čistě přírodním a nechirurgickým řešením ve formě směsi rostlinných látek, která je vědecky vyvinuta s cílem stimulovat růstovou aktivitu tkáně prsů a tak pomáhat přirozenému získání plného tvaru a zpevnění poprsí. Rostlinné výtažky obsažené v přípravku Decolen mají na prsa obdobný účinek jako přirozené ženské hormony estrogenu a způsobují reaktivaci růstové činnosti prsní tkáně.

V novém Decolenu pro ženy jsou posíleny právě složky bohaté na fytoestrogeny.

Účinné látky výrobku:

Andělíka čínská: (Angelica sinensis) Jeden z nejvýznamnějších prostředků klasické čínské medicíny. Podporuje zdravou produkci progesteronu.

Smetanka lékařská: (Taraxacum officinale) Tato rostlina významně ovlivňuje sekreční a vylučovací pochody v těle. Tím působí na „čištění“ receptorů a její sekreční účinky jsou klíčem k formování nových buněk a tkání prsou.

Smldinec: (Dioscorea villosa) Bohatý zdroj přírodních fytoestrogenů, fytonutrientů a diosgeninu, působí významně na normalizaci hormonálních funkcí organismu.

- 2.) Hormonální účinky estrogenů, progesteronu i jejich prekurzorů, představují velmi významné a závažné ovlivnění fyziologických pochodů v lidském organismu. Tyto hormony úzce souvisejí s regulací menstruačního cyklu, plodností ženy a mnoha

dalšími významnými fyziologickými i patofyziologickými procesy. Podávání těchto látek má prokázanou prokancerogenní aktivitu, která sice není vyjádřena ve velké míře, ale je jednou z příčin toho, že ženské hormony estrogenu a progesteronu i jejich funkční prekurzory jsou vyhrazeny v použití jedině v registrovaných léčivých přípravcích pro možné významné důsledky svých fyziologických účinků a svá potencionální a známá zdravotní rizika. Tyto hormonálně účinné látky se nesmí přidávat, a to ani v malých množstvích, například do kosmetických přípravků, ve kterých přitom mají pouze lokální účinky v místě své aplikace. Doplňky stravy jako potraviny jsou výrobky s celotělovou distribucí účinných látek, jejichž účinky se proto projeví vůči všem tkáním lidského organismu, které jsou hormonálně citlivé k těmto účinným látkám. Je naprosto absurdní vůbec uvažovat o přípustnosti výrobku DECOLEN na trhu v EU jako legální potraviny, pokud by deklarovanou hormonální účinnost skutečně měl.

Skutečnost, že tento typ farmakologických účinků by zakládal výrobku statut léčivého přípravku dle funkce per analogiam vyplývá například z případu Hoodia Spray a Hoodia patches řešeného SÚKLEM:

<http://www.sukl.cz/leciva/informace-o-vyskytu-nelegalniho-pripravku-3?highlightWords=Hoodia>

- 3.) Žádáme RRTV, aby v souvislosti s tímto případem vycházela a zohlednila judikaturu Soudního dvora EU k věci výkladu definice léčivého přípravku. Implementační praxe Státního ústavu pro kontrolu léčiv je praxe nekonformní a pochybně zákonná. Bude předmětem soudní žaloby i stížnosti Komise EU v blízké době. RRTV je orgánem s vlastní odpovědností za vlastní rozhodnutí a není její povinností vycházet z právně nezávazných stanovisek SÚKL tam, kde existují důvodné pochybnosti a významné odlišnosti od již podaného výkladu práva EU. (UST-30 SÚKL apod.)

V této souvislosti je nejvýznamnější dezinterpretací práva EU, že výrobek se pro účely právní kvalifikace jako léčivého přípravku musí posuzovat vždy komplexně. To je účelová dezinterpretace a nepravda, protože pro účel právní kvalifikace výrobku jako léčivého přípravku se vždy zcela zvlášť a naprosto samostatně hodnotí způsob jeho obchodní prezentace a jeho vědecky prokázaná fyziologická funkce.

Žádáme RRTV, aby zohlednila a postupovala sama konformně ve smyslu zejména této judikatura SDEU

„Uvedená směrnice tak poskytuje dvě definice léčivého přípravku, a sice definici „podle prezentace“ a definici „podle funkce“. Výrobek je léčivým přípravkem, pokud se na něj vztahuje jedna nebo druhá z těchto definic“.¹

„Podle ustálené judikatury musí být pojem „prezentace výrobku“ vykládán extenzivně. V tomto ohledu je namístě připomenout, že směrnice 2001/83 tím, že se opírá o kritérium

¹ Rozsudek SDEU ze dne 9. června 2005, HLH Warenvertrieb a Orthica, C-211/03, C-299/03 a C-316/03 až C-318/03, Recueil, s. I-5141, bod 49.

prezentace výrobku, má za cíl zahrnout nejen léčivé přípravky, které mají skutečný léčebný nebo lékařský účinek, ale rovněž výrobky, které nejsou dostatečně účinné nebo které nemají účinek, který jsou spotřebitelé oprávněni očekávat s ohledem na jejich prezentaci. Uvedená směrnice tak směřuje k ochraně spotřebitelů nejen před škodlivými nebo toxickými léčivými přípravky jako takovými, ale rovněž před různými výrobky používanými namísto vhodných léků.“²

² Rozsudek SDEU, ze dne 30. listopadu 1983, *van Bennekom*, C-227/82, Recueil, s. 3883, bod 17.

Stanovy občanského sdružení



PREAMBULE

Občanské sdružení Unicampus bylo založeno s cílem vzdělávání, výzkumu a aplikace práva v oblasti ochrany práv a oprávněných zájmů spotřebitele a ochrany veřejného zdraví a je zaměřeno na provádění systematické odborné činnosti zaměřené na výzkum, analýzu a řešení podstatných problémů z této oblasti. Záměrem sdružení je angažovat do provádění svých aktivit renomované i mladé nastupující odborníky, zejména studenty oborů s ekonomickou, právní či marketingovou orientací.

Cílem činnosti sdružení je analyzovat, zpracovávat i aktivně vytvářet a veřejně šířit důležité informace z oblasti ochrany spotřebitele a veřejného zdraví a propojit akademickou půdu a angažované teoretické odborníky se subjekty z komerční, správní a soudní praxe včetně mezinárodní spolupráce. Tímto způsobem bude odborně posílena a podpořena efektivita jiných organizací, které dnes vytvářejí protiváhu aktivitám poškozujícím práva a zájmy spotřebitelů a nekalým obchodním praktikám činěných vůči spotřebiteli i nekalému jednání vůči jiným subjektům s veřejným vlivem.

Občanské sdružení Unicampus se k tomuto zdrží jakékoliv odborné činnosti prováděné v soukromém zájmu fyzických či právnických osob vůči jiným osobám, pokud se současně nebude jednat o dostatečně silný veřejný zájem a především jeho ochranu.

I. Název, sídlo a právní postavení sdružení

1. **Název sdružení:** Unicampus
2. **Sídlo sdružení:** Kubelíkova 1224/42, 130 00 Praha 3 – Žižkov
3. **Právní postavení sdružení:** Sdružení je nezávislé, neziskové a nepolitické občanské sdružení s vlastní právní subjektivitou založené dle zákona o sdružování občanů, a to na dobu neurčitou. Sdružení je právní osobou registrovanou Ministerstvem vnitra České republiky.

II. Cíl a předmět činnosti

1. Cílem sdružení je odborně, účelně a prospěšně působit v oblasti:
 - a. ochrany práv a oprávněných zájmů spotřebitelů;
 - b. ochrany legální hospodářské soutěže s ohledem na veřejný zájem;
 - c. právotvorby a prosazování práva a kodexů chování v této oblasti.
2. Cílem sdružení je také rozvoj vzdělávání v této oblasti, efektivní šíření informací a podpora odborné způsobilosti uživatelů těchto informací, zejména:
 - a. studentů ekonomických, právních a marketingových specializací;
 - b. odborné veřejnosti;
 - c. dotčené širší a laické veřejnosti.
3. Cílem sdružení je vydat a průběžně aktualizovat „Kodex obchodních praktik“ (dále jen Kodex) za účelem:
 - a. podpory aplikace teoretických poznatků v oblasti mimoprávní regulace a ochrany veřejného zájmu;
 - b. podpory řádné, korektní a efektivní praxe držitelů kodexů chování.
4. Cílem sdružení je využívat k dosažení cíle 1a mj. také podání soudních žalob a žádostí o zahájení správních řízení ve věcech zdržení se protiprávního jednání vůči spotřebiteli ve smyslu směrnice 2009/22/ES.
5. Cílem sdružení je hospodářská činnost prováděná za účelem dalšího financování aktivit a činností sdružení naplňující cíle 1-3.

III. Členství, práva a povinnosti členů

1. **Členem sdružení** se mohou na základě písemné přihlášky – žádosti o členství - stát fyzické i právní osoby, pokud prokáží dostatečnou odbornou způsobilost a dostatečnou nezávislost k řádnému a efektivnímu naplňování cílů sdružení.
2. Odchylně od odst. 1 může být členství fyzickým i právníkům osobám nabídnuto.
3. Členství ve sdružení nelze nárokovat. Žádost o členství může být odmítnuta i bez udání důvodů.
4. **Vznik členství:** Členství vzniká dnem, kdy Výbor schválí žádost o členství, nebo dnem doručení souhlasného stanoviska fyzické či právní osoby, které bylo členství Výborem nabídnuto.
5. **Zánik členství:** Členství zaniká na písemnou žádost člena dnem jejího doručení Výboru; vyloučením člena rozhodnutím členské schůze; dnem zániku sdružení; dnem úmrtí člena případně jiným zákonem ustanoveným způsobem.
6. **Práva a povinnosti členů sdružení:**
 - a. právo podílet se na činnosti sdružení, být informován o jeho činnosti,
 - b. právo podávat návrhy, připomínky a náměty k činnosti sdružení,
 - c. právo volit a být volen do orgánů sdružení,
 - d. právo obracet se na orgány sdružení se žádostmi, podněty a stížnostmi,
 - e. povinnost dodržovat stanovy sdružení,
 - f. povinnost dbát dobrého jména sdružení.

IV. Orgány sdružení

1. Řídící, výkonné a kontrolní orgány sdružení jsou: Členská schůze a Výbor
2. Jménem sdružení jedná Výbor
3. Výbor má právo delegovat jednotlivé členy sdružení i jiné nezávislé odborníky či subjekty k samostatné realizaci odborných, organizačních či podpůrných aktivit naplňující cíle sdružení, včetně vystupování jménem sdružení v rámci jejich provádění.
4. **Členská schůze (ČS)** je nejvyšším řídicím orgánem sdružení.
 - a. ČS je svolávána:
 - i. Výborem nejméně jednou za 1 rok,
 - ii. dříve je svolávána ČS Výborem, požádá-li o to nadpoloviční většina členů.
 - b. ČS se účastní členové sdružení, členové Výboru
 - c. Usnášeníschopnost ČS a hlasování:
 - i. ČS je usnášeníschopná při přítomnosti nadpoloviční většiny členů;
 - ii. každý člen má jeden hlas;
 - iii. členové mohou být zastoupeni jinou osobou na základě plné moci ověřené notářem, nebo plné moci udělené v přítomnosti člena Výboru a tímto způsobem jím ověřené.
 - d. Do působnosti ČS patří:
 - i. přijímat, měnit a rušit stanovy,
 - ii. přijímat základní zásady strategie činnosti sdružení,
 - iii. volit členy Výboru
 - iv. projednat zprávu o činnosti Výboru.
5. **Výbor (V)** je statutárním orgánem sdružení, řídí sdružení v období mezi jednotlivými ČS a má nejméně 3 členy.
 - a. Zasedání V svolává a řídí předseda nebo místopředseda, příp. osoba jimi pověřená.
 - b. Do působnosti V patří zejména:
 - i. volit ze svého středu předsedu a místopředsedu,
 - ii. svolávat a připravovat podklady pro ČS,
 - iii. schvalovat vnitřní předpisy,
 - iv. schvalovat rozpočet a účetní závěrku,
 - v. přijímat členy sdružení na základě písemné přihlášky,
 - vi. rozhodovat o dalších otázkách týkajících se sdružení s výjimkou věcí spadajících pod výhradní působnost ČS.
 - vii. realizovat cíle sdružení
 - viii. vydat a aktualizovat Kodex. Toto oprávnění může V delegovat na zvolené členy sdružení. Vydání a aktualizace Kodexu může být rozhodnutím ČS podmíněno schválením Kodexu a jeho změn ČS.
 - c. Usnášeníschopnost V a hlasování:
 - i. V je usnášeníschopný při přítomnosti nadpoloviční většiny členů V,
 - ii. každý člen V má jeden hlas.
 - d. V případě bodu b) jedná V hlasováním dle bodu c).
 - e. V případě aktivit a činností, které nespádají pod bod b) jedná za V jeho předseda nebo společně alespoň dva členové V.

V. Zásady hospodaření

1. Sdružení:
 - a. při vyhledávání a využívání zdrojů a prostředků dbá o účelné hospodaření, naplňování cílů činnosti a dobrého jména sdružení,
 - b. dlouhodobě hospodaří s vyrovnaným rozpočtem,
 - c. používá prostředky pouze pro účely, které odpovídají cílům sdružení,
2. Prostředky na činnost čerpá sdružení zejména z:
 - a. grantů, dotací a prostředků veřejné podpory,
 - b. z darů fyzických či právnických osob.
3. Hospodářskou činnost provádí a odpovědnost za hospodářskou činnost sdružení nese V.

VI. Zánik sdružení

1. Sdružení může zaniknout:
 - a. dobrovolným rozpuštěním, a to na základě usnesení ČS přijatého většinou 2/3 členů účastnících se ČS,
 - b. pravomocným rozhodnutím Ministerstva vnitra ČR.
2. Nestanoví-li ČS jinak, pak při zániku sdružení bez právního nástupce se majetkový zůstatek převede na subjekt s obdobným předmětem činnosti.

ČALFA, BARTOŠÍK a partneři

ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ

ATTORNEYS-AT-LAW

BRAUNŮV DŮM, KARLOVO NÁMĚSTÍ 24, 110 00 PRAHA 1

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání
Škrétova 44/6
120 00 P r a h a 2

ÚŘAD RADY ³	
pro rozhlasové a televizní vysílání	
DOŠLO DNE	- 3 -08- 2012
Počet listů:	29
Číslo jednací:	4042 + ulky

V Praze dne 2. srpna 2012

Sp.zn./Ident.: 2012/518/had/WAL
Č.j.: had/2375/2012

Věc: Vyjádření společnosti WALMARK, a.s., k podané stížnosti ve věci TV reklamy na výrobek DECOLEN

Přípisem ze dne 27.6.2012, č.j. had/2375/2012, vyzvala Rada pro rozhlasové a televizní vysílání (dále jen „RRTV“) společnost WALMARK, a.s., k objasnění skutečností ve věci reklamy na přípravek DECOLEN, a to ve vztahu k obsahu stížnosti občanského sdružení Unicampus jednajícího panem Janem Vavrečkou, předsedou sdružení, ze dne 22.6.2012.

Na základě výzvy RRTV předkládám v zastoupení společnosti WALMARK a.s. podle ust. § 137 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správního řádu, vysvětlení k obsahu TV reklamy na přípravek DECOLEN.

WALMARK a.s. se sídlem Třinec, Oldřichovice č. 44, PSČ 739 61, IČ 005 36 016 (dále jen „WALMARK“), je obchodní společností, která se v rámci svého předmětu podnikání zabývá mimo jiné i výrobou a distribucí potravin, potravinových doplňků, léčiv a léčivých přípravků. V rámci tohoto předmětu podnikání společnost WALMARK vyrábí a

distribuuje na trh v České republice i přípravek DECOLEN, který spadá do kategorie doplňků stravy.

Důkaz: Výpis z webových stránek koordinačního střediska pro resortní zdravotnické informační systémy <https://snzr.ksrzis.cz/snzr/rrh/>, z registru hlavního hygienika

Přípravek DECOLEN je doplněk stravy určený pro ženy, který je založen na přírodní bázi a vyvinutý s cílem podporovat prsní tkáň a udržovat plnost a pevnost poprsí.

Výše uvedený přípravek představuje tzv. doplněk stravy ve smyslu § 2 písm. i) zákona č. 110/1997 Sb., ve znění pozdějších předpisů, tj. potravinu, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravině samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.

Z prezentace výrobku vyplývá, že tento je určen výhradně pro podporu lidského organismu ve stavu zdraví a nikoliv pro řešení problémů ve stavu nemoci, tj. není prezentován léčebný účinek výrobku.

Složení přípravku DECOLEN neobsahuje žádnou z látek zakázaných při výrobě potravin dle přílohy č. 4 vyhlášky č. 225/2008 ve znění pozdějších předpisů.

Přípravek DECOLEN proto v žádném případě nelze kvalifikovat jako léčivý přípravek ve smyslu ustanovení § 2 odst. 1 písm. a) nebo b) zákona č. 378/2007 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

Společnost WALMARK předkládá RRTV spolu s tímto vyjádřením:

- 1x balení přípravku DECOLEN včetně jeho obalu a příbalového letáku
- studie o působení jednotlivých složek (látek) obsažených v přípravku DECOLEN zpracované

1. University of Urbino, Ústav hygieny, z května 2005;
2. University of Michigan, katedra farmacie, z května 2010;
3. Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg, ze srpna 2011;
4. Sejong University, Seoul, Institute of Biotechnology, z roku 2009;
5. University of Toronto, Department of Nutritional Sciences, z 15.5.2005 (vše v anglickém znění)

Současně se studii předkládá WALMARK i překlady studií uvedených pod body 1., 2., 5.:

1. Mechanismy působení a antiproliferativní vlastnosti šťávy zeleniny druhu Brassica oleracea v buněčných liniích lidské rakoviny prsu - Università di Urbino, Institut hygieny, Centrum biotechnologie, Institut biochemie

5. Klinický výzkum rakoviny – Potravinové lněné semeno vyvolává při postmenopauzální rakovině prsu změny nádorových biologických markerů - University of Toronto, Department of Nutritional Sciences, Princess Margaret Hospital

2. Klinický výzkum rakoviny – Sulforafan, potravinová složka brokolice a jejích výhonků inhibuje kmenové buňky rakoviny prsu - University of Michigan, Department of Pharmaceutical Sciences

Společnost WALMARK dále RRTV oznamuje, že přípravek DECOLEN je v současné době distribuován na území České republiky, Slovenské republiky, Polska, Bulharska a Litvy.

Předmětem posouzení ze strany RRTV je televizní reklama (reklamní spot) společnosti WALMARK na výše uvedený přípravek DECOLEN. Stěžovatel mj. namítá, že „v rámci propagace výrobku DECOLEN je spotřebitelům uváděno zejména tvrzení, že složení výrobku má hormonální vliv na tkáň lidského prsu (mammy) ve smyslu účinku na tkáň prsní žlázy, a to do takové míry, že dochází ke tkáňovým změnám typu růstu a vývoje tkáň prsní žlázy, v jejich důsledku se mění tvar ženských prsou.“ Stěžovatel dále poukazuje na produktové stránky výrobku DECOLEN.

Dle výslovného ustanovení § 7 odst. 1 písm. a) zákona č. 40/1995 Sb., ve znění pozdějších předpisů, je RRTV orgánem příslušným k výkonu dozoru nad dodržováním tohoto zákona pro reklamu šířenou v rozhlasovém a televizním vysílání a v audiovizuálních mediálních službách na vyžádání a pro sponzorování v rozhlasovém a televizním vysílání a audiovizuálních mediálních službách na vyžádání.

Z výše uvedeného vyplývá, že RRTV není orgánem příslušným k výkonu dozoru pro reklamu šířenou jiným způsobem, než jak stanoví citované zákonné ustanovení. Z tohoto důvodu považuje WALMARK za zcela irelevantní jakékoliv námítky či jiná tvrzení stěžovatele, jež odkazují na produktové stránky výrobku DECOLEN, neboť RRTV nemá pravomoc obsah uvedených produktových stránek, případně jiné webové prezentace posuzovat.

Bez ohledu na výše uvedené je třeba konstatovat, že ani TV reklama ani tzv. produktové stránky www.decolen.cz neobsahují informaci o hormonálních účincích dotčeného produktu.

V daném případě se proto nejedná o léčivý přípravek dle „prezentace“, jak uvádí stěžovatel, neboť přípravek DECOLEN není jako léčivý přípravek prezentován a reklama na předmětný přípravek naopak obsahuje dostatečně zřetelné označení „doplňek stravy“. Rovněž tak celkové vyznění reklamy nevzbuzuje u spotřebitele dojem, že by DECOLEN měl vlastnosti léčivého přípravku.

Příbalový leták výslovně uvádí, že „*Decolen pro ženy je **přípravek na přírodní bázi** vyvinutý s **cílem podporovat zdraví prsní tkáň a udržovat plnost a pevnost poprsí**. Rostlinné fytoestrogeny, obsažené v přípravku Decolen, **mají na prsní tkáň obdobný účinek jako přirozené ženské hormony estrogenu**. Spolu s dalšími aktivními látkami pomáhají udržovat a podporovat zdraví, plnost a pevnost prsou“.*

Nejedná se ani o léčivý přípravek „dle funkce“. Reklama na přípravek v žádné své části neuvádí tvrzení, že „*složení výrobku má **hormonální vliv** na tkáň lidského prsu (mammy)...*“

Předmětná reklama naopak poukazuje na **přírodní povahu** přípravku DECOLEN a dále na tzv. fytoestrogeny, jakožto rostlinné látky obsažené ve složkách přípravku. WALMARK poukazuje na to, že přípravek DECOLEN obsahuje zdroje rostlinných estrogenů, lignanů a sterolů, tedy látky, obsažené v přirozeném potravním řetězci (například v zelenině typu brokolice, brukev, chmel apod.). Již z tohoto důvodu nelze přípravek označit jako léčivý přípravek ve smyslu zákona o léčivech, jak tvrdí stěžovatel. Jedná se o doplňek stravy nahrazující nedostatek výše uvedených látek v běžném potravinovém řetězci, jejichž účinky dokládají předložené studie, a jenž je jako takový prezentován i v posuzovaném reklamním spotu. Z žádného právního předpisu přitom nevyplývá, že by použití těchto látek bylo vyhrazeno výhradně léčivým přípravkům. Samotná skutečnost, že účinky tzv. fytoestrogenů jsou v mnohém obdobné jako účinky hormonu estrogen, neznamená, že by použití těchto látek bylo vyhrazeno pouze v registrovaných léčivých přípravcích.

Estrogenní účinky látek obsažených v přípravku DECOLEN, na něž předmětná reklama poukazuje, jsou v daném případě zcela nesporné a potvrzují je rovněž předložené studie.

Již ze samotného vyznění reklamního sloganu „*Dovolte přírodě vytvarovat Vaše **ňadra**. Decolen, **ňadra plnější a krásnější**“*, jenž **poukazuje s patřičnou nadsázkou výhradně na estetickou stránku a nikoliv hormonální či jinak léčebnou povahu přípravku**, je pro průměrného spotřebitele zcela zřejmý limitovaný účinek propagovaného přípravku.

Předmětná reklama na přípravek DECOLEN a zejména v ní použitá reklamní tvrzení proto nenaplňují znaky reklamy na humánní léčivé přípravky dle § 5 odst. 3 zákona o regulaci reklamy ani neklamou spotřebitele o povaze výrobku.

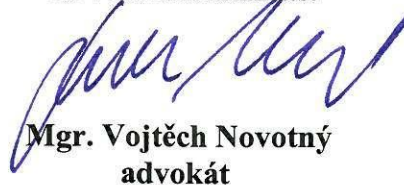
Z výše uvedených skutečností má proto WALMARK za to, že předmětná TV reklama na doplněk stravy DECOLEN, a to zejména s ohledem na formu a způsob sdělované informace, nepřisuzuje doplňku stravy, jako potravině, vlastnosti léčivého přípravku a ani takové vlastnosti nenaznačuje a z tohoto důvodu proto ani nemůže klamat spotřebitele.

Naproti tomu tvrzení stěžovatele nejsou opřena o žádné relevantní důkazy, studie či analýzy, jež by stěžovatelem uváděné skutečnosti potvrzovaly. V této souvislosti WALMARK poukazuje na skutečnost, že ze strany stěžovatele se jedná ve vztahu ke společnosti WALMARK o opakovaný a zcela účelový atak s cílem poškodit její zájmy, což mj. vyplývá i ze způsobu vyjadřování stěžovatele v předmětné stížnosti, v níž používá zcela neadekvátní výrazy jako „paskvil“ apod. Z tohoto důvodu považuje WALMARK podání stěžovatele za zjevně šikanózní a nedůvodné, neboť odvysíláním předmětné reklamy prokazatelně nedošlo k porušení zákona o regulaci reklamy ani jiného obecně závazného právního předpisu.

Veškeré další skutečnosti uváděné stěžovatelem (např. úvahy stěžovatele o možných hormonálních účincích estrogenů a dalších látek) jsou v daném případě pro účely posouzení reklamy ze strany RRTV irelevantní, resp. jdou nad rámec působnosti RRTV vymezené výše citovaným zákonným ustanovením.

WALMARK je proto přesvědčen, že odvysíláním předmětné reklamy nemohlo dojít k porušení zákona o regulaci reklamy.

za WALMARK a.s.



Mgr. Vojtěch Novotný
advokát

Přílohy: plná moc advokáta
dále dle textu

Složky a výrobky

Omezující podmínky pro vyhledání výrobku ve stanovisku a v rozhodnutí.

Výrobek název decolen

Výrobce jméno Walmark

HLEDAT

Výběr podle výrobků a výrobců

Výrobek	Výrobce	Žadatel	Vydáno	Platné do	Číslo jednací
Decolen pro ženy	WALMARK, a.s.	WALMARK, a.s.	26.07.2011	Neomezeno	OVZ-35.1-13.05.2011-52382
Decolen	WALMARK, a.s.	WALMARK, a.s.	13.01.2011	Neomezeno	OVZ-35.1-26.10.2010-834



Záznam 1 až konec



Složky a výrobky

Výrobek - detail

Název	Decolen pro ženy
Výrobce	WALMARK, a.s.
Žadatel	WALMARK, a.s.
Vydáno	26.07.2011
Platné do	
Typ	oznámení
Č.j.	OVZ-35.1-13.05.2011-52382
Dávkování	2 tablety denně
Upozornění	Výrobek není určen pro děti, těhotné a kojící ženy. Nepřekračujte doporučenou denní dávku. Přípravek není určen jako náhrada pestré stravy. Ukládat mimo dosah dětí! Skladujte v suchu a temnu, při teplotě do 25 stupňů Celsia. Minimální trvanlivost do: data uvedeného na boční straně obalu (EXP). Doplňěk stravy
Aktivní látky	andělíka čínská extrakt, fosforečnan vápenatý, brukev zelná extrakt, bedrník anýz extrakt, rostlinné steroly, mikrokrytalická celulóza, chmel otáčivý extrakt, rajče jedlé extrakt, smetanka lékařská extrakt z kořene, karboxymethylcelulóza, semínka z vinných hroznů extrakt, hydroxypropylmethylcelulóza, kyselina stearová, len setý extrakt, stearát hořečnatý, smldinec extrakt z kořene, titanová běloba (barvivo), cholekalciferol, glycerol
Detailní složení	Andělíka čínská-Angelica sinensis-extrakt: 112,5 mg Bedrník anýz-Pimpinella anisum-extrakt: 60 mg Beta-sitosterol: 25 mg Brukev zelná-Brassica oleracea-extrakt: 62,5 mg Chmel otáčivý-Humulus lupulus-extrakt: 37,5 mg Cholekalciferol: Fosforečnan vápenatý: Glycerol: Hydroxypropylmethylcelulóza: Karboxymethylcelulóza: Kyselina stearová: Len setý-Linum usitatissimum-extrakt: 7,5 mg Lycopen: 2,5 mg Mikrokrytalická celulóza: Rajče jedlé extrakt: Rostlinné steroly: Smetanka lékařská-Taraxacum officinale-extrakt: 22,5 mg Smldinec-Dioscorea villosa-extrakt: 5 mg Stearát hořečnatý: Titanová běloba (barvivo): Vinné hrozny-semínka-extrakt: 12,5 mg Vitamin D: 2,5 mikrogram 1 tableta obsahuje:

[ZPĚT](#)

Složky a výrobky

Výrobek - detail

Název	Decolen
Výrobce	WALMARK, a.s.
Žadatel	WALMARK, a.s.
Vydáno	13.01.2011
Platné do	
Typ	oznámení
Č.j.	OVZ-35.1-26.10.2010-834
Dávkování	2 tablety denně. Výrobek není určen pro děti, těhotné a kojící ženy. Nepřekračujte doporučenou denní dávku. Přípravek není určen jako náhrada pestré stravy. Ukládat mimo dosah dětí!
Upozornění	Skladujte v suchu a temnu při teplotě do 25 stupňů Celsia. Minimální trvanlivost do konce: data uvedeného na boční straně obalu (EXP). Symboly: po upotřebení odhodte obal do koše - vlož piktogram, rec. značka, logo LEDFERMA s.r.o.
Aktivní látky	fosforečnan vápenatý, Saw palmetto extrakt, mikrokrytalická celulóza, damiana list, andělíka čínská kořen, fenykl obecný semínka, benedikt lékařský list a květ, smetanka lékařská kořen, potočnice lékařská list, karboxymethylcelulóza, kyselina stearová, chmel otáčivý extrakt, stearát hořečnatý, oxid křemičitý, jetel luční, hydroxypropylcelulóza, titanová běloba (barvivo) Andělíka čínská-Angelica sinensis-kořen: 100 mg Benedikt lékařský-Cnicus benedictus-list,květ: 70 mg Chmel otáčivý-Humulus lupulus-extrakt: 20 mg Damiana-Turnera diffusa-list: 100 mg Fenykl obecný-Foeniculum vulgare-semínka: 100 mg Fosfor: 186 mg Fosforečnan vápenatý: Hydroxypropylcelulóza: Jetel luční-Trifolium pratense: 10 mg Karboxymethylcelulóza: Kyselina stearová: Lopuch větší-Arctium lappa: 10 mg Mikrokrytalická celulóza: Oxid křemičitý: Potočnice lékařská-Nasturtium officinale-list: 50 mg Saw Palmetto-Serenoa repens-extrakt: 450 mg Smetanka lékařská-Taraxacum officinale-kořen: 50 mg Smlidinec větší-Dioscorea villosa-extrakt: 8 mg Stearát hořečnatý: Titanová běloba (barvivo): Vápník: 240 mg 2 tablety obsahují:
Detailní složení	

[ZPĚT](#)

1. J Nutr. 2005 Jun;135(6):1503-9.

Mechanisms of action and antiproliferative properties of Brassica oleracea juice in human breast cancer cell lines.

Brandi G, Schiavano GF, Zaffaroni N, De Marco C, Paiardini M, Cervasi B, Magnani M.

Institute of Hygiene, University of Urbino, Italy. brandi@uniurb.it

Cruciferous vegetables are an important source of compounds that may be useful for chemoprevention. In this study, we evaluated the antiproliferative activity of juice obtained from leaves of several varieties of Brassica oleracea on both estrogen receptor (ER)-positive (ER+; MCF-7 and BT474) and ER-negative (ER-; MDA-MB-231 and BT20) human breast cancer cell lines. The effect of juice on cell proliferation was evaluated on DNA synthesis and on cell cycle-related proteins. Juice markedly reduced DNA synthesis, evaluated by [3H]thymidine incorporation, starting from low concentrations (final concentration 5-15 mL/L), and this activity was independent of ER. All cauliflower varieties tested suppressed cell proliferation in a dose-dependent manner. Cell growth inhibition was accompanied by significant cell death at the higher juice concentrations, although no evidence of apoptosis was found. Interestingly, the juice displayed a preferential activity against breast cancer cells compared with other mammalian cell lines investigated (ECV304, VERO, Hep2, 3T3, and MCF-10A) ($P < 0.01$). At the molecular level, the inhibition of proliferation was associated with significantly reduced CDK6 expression and an increased level of p27 in ER+ cells but not in ER- cells, whereas a common feature in all cell lines was significantly decreased retinoblastoma protein phosphorylation. These results suggest that the edible part of Brassica oleracea contains substances that can markedly inhibit the growth of both ER+ and ER- human breast cancer cells, although through different mechanisms. These results suggest that the widely available cruciferous vegetables are potential chemopreventive agents.

PMID: 15930460 [PubMed - indexed for MEDLINE]

2. Clin Cancer Res. 2010 May 1;16(9):2580-90. Epub 2010 Apr 13.

Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells.

Li Y, Zhang T, Korkaya H, Liu S, Lee HF, Newman B, Yu Y, Clouthier SG, Schwartz SJ, Wicha MS, Sun D.

Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA.

PURPOSE: The existence of cancer stem cells (CSCs) in breast cancer has profound implications for cancer prevention. In this study, we evaluated sulforaphane, a natural compound derived from broccoli/broccoli sprouts, for its efficacy to inhibit breast CSCs and its potential mechanism.

EXPERIMENTAL DESIGN: Aldefluor assay and mammosphere formation assay were used to evaluate the effect of sulforaphane on breast CSCs in vitro. A nonobese diabetic/severe combined immunodeficient xenograft model was used to determine whether sulforaphane could target breast CSCs in vivo, as assessed by Aldefluor assay, and tumor growth upon cell reimplantation in secondary mice. The potential mechanism was investigated using Western blotting analysis and beta-catenin reporter assay.

RESULTS: Sulforaphane (1-5 micromol/L) decreased aldehyde dehydrogenase-positive cell population by 65% to 80% in human breast cancer cells ($P < 0.01$) and reduced the size and number of primary mammospheres by 8- to 125-fold and 45% to 75% ($P < 0.01$), respectively. Daily injection with 50 mg/kg sulforaphane for 2 weeks reduced aldehyde dehydrogenase-positive cells by >50% in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient xenograft tumors ($P = 0.003$). Sulforaphane eliminated breast CSCs in vivo, thereby abrogating tumor growth after the reimplantation of primary tumor cells into the secondary mice ($P < 0.01$). Western blotting analysis and beta-catenin reporter assay showed that sulforaphane downregulated the Wnt/beta-catenin self-renewal pathway.

CONCLUSIONS: Sulforaphane inhibits breast CSCs and downregulates the Wnt/beta-catenin self-renewal pathway. These findings support the use of sulforaphane for the chemoprevention of breast cancer stem cells and warrant further clinical evaluation.

Copyright 2010 AACR.

PMCID: PMC2862133

PMID: 20388854 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[3. Free Radic Res. 2011 Aug;45\(8\):925-40. Epub 2011 May 26.](#)

Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene.

Kelkel M, Schumacher M, Dicato M, Diederich M.

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital
Kirchberg ,
L-2540 Luxembourg , Luxembourg.

The recent search for new anti-cancer drugs focuses more on natural compounds from the regular human diet because these compounds rarely exhibit severe side-effects yet efficiently act on a wide range of molecular targets involved in carcinogenesis. One promising compound, which is now being tested in clinical studies, is the tomato-derived carotenoid lycopene. This review summarizes the current knowledge about the cellular action of lycopene and presents the molecular targets responsible for its remarkable chemopreventive and anti-proliferative activity. Its antioxidant effects include a considerable reactive oxygen species (ROS) scavenging activity, which allows lycopene to prevent lipid peroxidation and DNA damage. Simultaneously, lycopene induces enzymes of the cellular antioxidant defense systems by activating the antioxidant response element transcription system. As another chemopreventive strategy, lycopene increases gap junctional communication, which is suppressed during carcinogenesis. This review focuses also on the synergistic effects of lycopene with other natural antioxidants that might be important for its future application in anti-cancer treatment. Lastly, this review provides evidence for the biological activity of some oxidized lycopene metabolites, which seem to be partially responsible for the strong and manifold anti-cancer potential of lycopene.

PMID: 21615277 [PubMed - indexed for MEDLINE]

4. Am J Chin Med. 2009;37(1):159-67.

Estrogen activities and the cellular effects of natural progesterone from wild yam extract in mcf-7 human breast cancer cells.

Park MK, Kwon HY, Ahn WS, Bae S, Rhyu MR, Lee Y.

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering,
Institute of
Biotechnology, Sejong University, Seoul, Korea.

We studied the estrogenic activity and cellular effect of wild yam extract in MCF-7 human breast cancer cells. The extract increased the activity of the progesterone receptor and pS2 genes at the mRNA levels in human breast cancer MCF-7 cells, although the effects were not as prominent as those of 17beta-estradiol (E(2)). Western blot analysis showed that the level of estrogen receptor alpha protein was down-regulated after treatment with E(2) or wild yam

extract. Wild yam extract also inhibited proliferation of MCF-7 cells. These data indicate that wild yam extract acts as a weak phytoestrogen and protects against proliferation in human breast carcinoma MCF-7 cells.

PMID: 19222119 [PubMed - indexed for MEDLINE]

5. Clin Cancer Res. 2005 May 15;11(10):3828-35.

Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer.

Thompson LU, Chen JM, Li T, Strasser-Weippl K, Goss PE.

Department of Nutritional Sciences, Princess Margaret Hospital, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

PURPOSE: Flaxseed, the richest source of mammalian lignan precursors, has previously been shown to reduce the growth of tumors in rats. This study examined, in a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial, the effects of dietary flaxseed on tumor biological markers and urinary lignan excretion in postmenopausal patients with newly diagnosed breast cancer. **EXPERIMENTAL DESIGN:** Patients were randomized to daily intake of either a 25 g flaxseed-containing muffin (n = 19) or a control (placebo) muffin (n = 13). At the time of diagnosis and again at definitive surgery, tumor tissue was analyzed for the rate of tumor cell proliferation (Ki-67 labeling index, primary end point), apoptosis, c-erbB2 expression, and estrogen and progesterone receptor levels. Twenty-four-hour urine samples were analyzed for lignans, and 3-day diet records were evaluated for macronutrient and caloric intake. Mean treatment times were 39 and 32 days in the placebo and flaxseed groups, respectively. **RESULTS:** Reductions in Ki-67 labeling index (34.2%; P = 0.001) and in c-erbB2 expression (71.0%; P = 0.003) and an increase in apoptosis (30.7%; P = 0.007) were observed in the flaxseed, but not in the placebo group. No significant differences in caloric and macronutrient intake were seen between groups and between pre- and posttreatment periods. A significant increase in mean urinary lignan excretion was observed in the flaxseed group (1,300%; P < 0.01) compared with placebo controls. The total intake of flaxseed was correlated with changes in c-erbB2 score (r = -0.373; P = 0.036) and apoptotic index (r = 0.495; P < 0.004). **CONCLUSION:** Dietary flaxseed has the potential to reduce tumor growth in patients with breast cancer.

PMID: 15897583 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Klinický výzkum rakoviny

Sulforafan, potravinová složka brokolice a jejích výhonků, inhibuje kmenové buňky rakoviny prsu

Yanyan Li, Tao Zhang, Hasan Korkaya, et al.

Clin Cancer Res 2010;16:2580-2590. Publikováno online poprvé 13. 4. 2010.

Aktualizované znění Nejnovější znění článku naleznete na adrese
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-09-2937](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2937)

Citované články V tomto článku jsou odkazy na 50 článků, z nichž 22 je volně přístupných na adrese
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/16/9/2580.full.html#ref-list-1>

Citace v člancích Tento článek je citován v 7 člancích, jejichž hostitelem je HighWire a jež jsou přístupné na adrese
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/16/9/2580.full.html#related-urls>

E-mailová upozornění Přihlaste se, pokud máte zájem o bezplatná e-mailová upozornění týkající se tohoto článku nebo časopisu.

**Reprinty a
subskripce** K objednání reprintů tohoto článku nebo k předplacení časopisu kontaktujte AACR Publications Department na adrese pubs@aacr.org.

Povolení Chcete-li si zažádat o povolení použít znovu tento článek nebo jeho část, kontaktujte AACR Publications Department na adrese
Department na adrese permissions@aacr.org.

Sulforafan, potravinová složka brokolice a jejích výhonků, inhibuje kmenové buňky rakoviny prsu

Yanyan Li^{1,3}, Tao Zhang¹, Hasan Korkaya², Suling Liu², Hsiu-Fang Lee¹, Bryan Newman¹, Yanke Yu¹, Shawn G. Clouthier², Steven J. Schwartz³, Max S. Wicha² a Duxin Sun¹

Abstrakt

Účel: Existence rakovinových kmenových buněk (RKB) při rakovině prsu má zásadní význam pro prevenci rakoviny. V této studii jsme hodnotili sulforafan, přírodní složku získanou z brokolice a jejích výhonků, z hlediska jeho schopnosti inhibovat RKB a jejího potenciálního mechanismu.

Experimentální uspořádání: K hodnocení účinku sulforafanu na prsní RKB in vitro bylo použito Aldefluor test a test na tvorbu mammosfér. Ke stanovení, zda se sulforafan může zaměřovat na prsní RKB in vivo, s hodnocením Aldefluor testem a podle růstu nádoru po reimplantaci buněk sekundárním myším, byl použit xenotěpový model s využitím NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) myši. Potenciální mechanismus byl zkoumán za použitím analýzy Western blot a β -kateninového reporter testu.

Výsledky: Sulforafan (1-5 μ mol/l) snižoval v lidských buňkách rakoviny prsu populaci aldehyd dehydrogenáza–pozitivních buněk o 65 až 80 % ($P < 0,01$) a snižoval velikost primárních mammosfér 8- až 125násobně a jejich počet o 45 – 75 % ($P < 0,01$). Každodenní injekce 50 mg/kg sulforafanu po dobu 2 týdnů snižovaly u xenotěpových nádorů NOD/SCID myši aldehyd dehydrogenáza–pozitivní buňky o více než 50 % ($P = 0,003$). Sulforafan eliminoval prsní RKB in vivo, čímž po reimplantaci primárních nádorových buněk do sekundárních myši zabránil růstu nádoru ($P < 0,01$). Analýza Western blot a β -kateninový test prokázaly, že sulforafan snižuje (down-reguluje) samoobnovovací mechanismus Wnt/ β -katenin.

Závěry: Sulforafan inhibuje prsní RKB a snižuje (down-reguluje) samoobnovovací mechanismus Wnt/ β -katenin. Tato zjištění podporují používání sulforafanu při chemoprevenci kmenových buněk rakoviny prsu, jež si proto zaslouží další klinické hodnocení. *Clin Cancer Res*; 16(9); 2580–90. ©2010 AACR.

Brokolice a její výhonky obsahují velká množství glukosinolatů (1). Četné studie přinesly doklady chemopreventivního účinku zvýšeného příjmu brukvovité zeleniny proti rakovině, jež se připisuje aktivitě různých isothiokyanátů, které jsou z glukosinolatů enzymaticky hydrolyzovány (2). Bylo zjištěno, že sulforafan vzniká z glukorafaninu, jednoho z hlavních glukosinolatů přítomných v brokolicevých výhoncích (3). Chemopreventivní vlastnosti sulforafanu vůči rakovině tkví v "blokovacích" i "potlačovacích" účincích (2). Blokovací funkce sulforafanu se dosahuje přes enzymy metabolismu 1. inhibiční fáze, které přeměňují prokarcinogeny na karcinogeny, a indukci enzymů metabolismu 2. fáze, které napomáhají exkreci karcinogenů (2). Pozdějšími studiemi byl zjištěn potlačující účinek sulforafanu při modulaci různých buněčných aktivit k inhibici růstu transformovaných buněk (2, 4). Schopnost sulforafanu vyvolávat apoptózu a zástavu buněčného cyklu je spojena s regulací mnohých molekul, jako jsou proteiny skupiny Bcl-2, caspasy, p21, cykliny a cyklindependentní kinázy (4). Bylo také zjištěno, že sulforafan potlačuje angiogenezi a metastázu snižováním (downregulating) vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, HIF-1 α , matrix metaloproteinázy-2 a matrix metaloproteinázy-9 (4).

Stále více dokladů potvrzuje, že mnoho druhů rakoviny, včetně rakoviny prsu, je iniciovaných a udržovaných malou populací rakovinových kmenových buněk (RKB) (5, 6). Tato malá populace produkuje nádorovou hmotu soustavným samoobnovováním a diferenciací, které mohou být regulovány podobnými signálními dráhami, jaké se uplatňují u normálních kmenových buněk (5–8). Jako kritické pro samoobnovovací chování RKB byla zjištěna řada cest, jako jsou Wnt/ β -katenin, Hedgehog a Notch (7, 9, 10).

Pracoviště autorů: ¹Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Michigan, a ²Comprehensive Cancer Center, Department of Internal Medicine, University of Michigan; a ³Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, Columbus, Ohio

Autoři pro korespondenci: Duxin Sun, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Michigan, 428 Church Street, Room 2020, Ann Arbor, MI 48109, USA, tel. 734-615-8740, fax 734-615-6162; E-mail: duxins@umich.edu, Max S. Wicha, Department of Internal Medicine, University of Michigan Comprehensive Cancer Center, 1500 East Medical Center Drive, Room 6302, Ann Arbor, MI 48109, USA, tel. 734-936- 1831, fax 734-615-3947, e-mail: mwicha@umich.edu, a Steven J. Schwartz, Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, 2015 Fyffe Ct., 235 Parker Food Science & Technology Building, Columbus, OH 43210, USA, tel. 614-292-2934, fax 614-292-4233, e-mail: schwartz.177@osu.edu.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2937

©2010 American Association for Cancer Research.

Anotace

Bylo prokázáno, že sulforafan, přírodní sloučenina přítomná v brokolici a jejích výhoncích, se vyznačuje protirakovinovou aktivitou. V této studii je ukázáno, že sulforafan inhibuje jak *in vitro*, tak *in vivo* kmenové buňky rakoviny prsu, takže si sulforafan nebo výtažek z brokolice nebo jejích výhonků zaslouhuje další klinické hodnocení jako látka k chemoprevenci rakoviny prsu. Rakovinu prsu vyvolává a udržuje malá populace kmenových buněk rakoviny prsu. Současná chemoterapie ani radiační terapie nedokáže populaci rakovinových kmenových buněk potlačit. Aldefluor test a test tvorby mammosfér prokázaly, že sulforafan inhibuje kmenové buňky rakoviny prsu *in vitro*. Model s NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) myši ukázal, že sulforafan eliminuje kmenové buňky rakoviny prsu *in vivo*.

Dále se soudí, že RKB přispívají k rezistenci a relapsu nádoru, protože je chemoterapie ani radiační terapie nedokáže vymýtit (6, 11, 12). Zacílení na tyto samoobnovovací mechanismy tak může vést k účinné strategii proti RKB a tak překonat rezistenci nádoru a omezovat relaps (5). Jako potenciálně účinná proti samoobnovování RKB byla nalezena řada látek přítomných v potravinách, jako je kurkumin (13, 14), kvercetin nebo epigalokatechin-gallát (15).

Jedním ze základních mechanismů podporujících samoobnovování prsních RKB je signalizace Wnt/ β -katenin (5). Aktivace cílových genů Wnt je zprostředkována β -kateninem, který se translokuje do jádra a váže na transkripční faktory TCF/LEF (5, 16). Hladina nitro-buněčného β -kateninu je modulována multiproteinovým komplexem sestávajícím z glykogen syntáza kinázy 3 β (GSK3 β), adenomatózní polyposis coli, kasein kinázy 1 α a axinu (17). GSK3 β napomáhá ubikvitin-proteazomové degradaci β -kateninu fosforylací tří specifických aminokyselin, Ser33/Ser37/ Thr41, na β -kateninu (17).

V jedné zprávě z poslední doby bylo prokázáno, že se sulforafan zaměřuje na buňky vyvolávající rakovinu slinivky břišní (18). V předkládané studii jsme zkoumali účinnost sulforafanu proti RKB jak v buněčných liniích rakoviny prsu, tak v xenoštěpech rakoviny prsu. Prokázali jsme, že sulforafan eliminuje RKB *in vivo*, což se odráží na inhibici růstu nádoru v recipientních myších očkovaných nádorovými buňkami získanými z primárních xenoštěpů vystavených působení sulforafanu. Dále, jelikož bylo publikováno, že sulforafan vyvolává downregulaci β -kateninu v lidských HeLa buňkách rakoviny děložního hrdla a HepG2 buňkách karcinomu jater (19), zkoumali jsme potlačující účinek sulforafanu na dráhu Wnt/ β -katenin.

Materiály a metody

Buněčné linie a reagenty. Lidská buněčná linie rakoviny prsu MCF7 pocházela z American Type Culture Collection a linii SUM159 poskytl Dr. Stephen Ethier (Karmanos Cancer Center, Detroit, Michigan). Zdrojem buněčné linie SUM159 je primární prsní anaplastický karcinom. Tato buněčná linie je estrogen-receptor (ER) negativní, progesteron-receptor (PR) negativní a nemá overexpresi Her2. Obě buněčné linie byly otestovány a osvědčeny ve svých původních zdrojích. Osvědčení spočívalo v morfologické analýze, analýze růstové křivky, isoenzymové analýze, short tandem repeat analýze a detekci mykoplazmy. Obě buněčné linie byly v naší laboratoři po méně než 6 měsících po obdržení pasážovány. K zachování celistvosti kolekce byly buňky z nejdřívější pasáže uchovány a buněčné linie byly opatrně udržovány v kultivaci, jak je popsáno níže. Linie MCF-7 byla udržována v RPMI 1640 (Invitrogen) suplementovaném 10% fetálním hovězím sérem (Fisher Scientific), 1% antibiotikem-antimykotikem (Invitrogen) a inzulinem 5 μ g/ml (Sigma-Aldrich). Linie SUM159 byla udržována v Ham's F12 médiu (Invitrogen) suplementovaném 5% fetálním hovězím sérem, 1% antibiotikem-antimykotikem, inzulinem 5 μ g/ml, hydrokortizonem 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich) a gentamycinem 4 μ g/ml (Invitrogen).

Sulforafan byl získán od LKT Laboratories. Propidiumjodid pocházel od Invitrogen. LiCl pocházel od Fisher Scientific; BIO (GSK3 inhibitor IX) od Calbiochem (EMD Biosciences) a MG132 od Assay Designs (Stressgen).

Protilátky proti β -kateninu, fosfo- β -kateninu Ser33/ Ser37/Thr41, fosfo-GSK3 β Ser9 a GSK3 β byly zakoupeny od Cell Signaling Technology.

Protilátky proti cyklinu D1 a β -aktin byly získány od Santa Cruz Biotechnology.

MTS test proliferace buněk. MCF7 a SUM159 byly naočkovány na 96jamkové mikrodestičky v hustotě 3 000 až 5 000 buněk na jamku. Buňky byly vystaveny rostoucím koncentracím sulforafanu, jak je uvedeno. Po 48 hodinách inkubace byla životaschopnost buněk hodnocena MTS testem (Promega) podle návodu výrobce. Počet živých buněk je přímo úměrný absorbanci u 490 nm formazanového produktu redukováného z MTS živými buňkami.

Test aktivity caspase-3. Buňky byly vystaveny různým koncentracím sulforafanu a po 24 hodinách byly shromážděny. Test aktivity caspase-3 se prováděl za použití soupravy Caspase-3/ CPP32 Fluorometric Assay kit (Biovision Research Products) podle návodu výrobce. Buněčný protein byl extrahován dodaným lyzačním pufrům a jeho koncentrace byla stanovena za použití BCA Protein Assay Reagents (Pierce). Štěpení DEVD-AFC, substrátu caspase-3, bylo kvantifikováno pomocí čtečky mikrodestiček s 400nm excitačním filtrem a 505nm emisním filtrem.

Test tvorby mammosfér. Kmenové/progenitorové buňky jsou obohaceny v mammosférách buněk rakoviny prsu (20) na základě jejich jedinečné schopnosti se rozmnožovat a vytvářet sféry v prostředí bez séra (21).

Kultivace mammosfér probíhala, jak bylo uvedeno dříve (22, 23), v mammary epithelium basal médiu bez séra (Lonza, Inc.) suplementovaném B27 (Invitrogen), 1% antibiotikem-antimykotikem, inzulinem 5 μ g/ml, hydrokortizonem 1 μ g/ml, gentamycinem 4 μ g/ml, EGF 20 ng/ml (Sigma-Aldrich), bazickým fibroblastovým růstovým faktorem 20 ng/ml (Sigma-Aldrich), a β -merkapt ethanol 1:25 000 000 (Sigma-Aldrich). Jednotlivé buňky připravené mechanickou a enzymatickou disociací byly naočkovány na šestijamkové ultralow attachment destičky (Corning) v hustotě 500 až 1000 buněk/ml při primární kultivaci a 100 až 500 buněk/ml při dalších pasážích. K primární kultuře byly přidány různé koncentrace sulforafanu, kdežto druhá a třetí pasáž byla pěstována za nepřítomnosti přípravku. Po 7 dnech kultivace

byl počet mammosfér spočítán pod mikroskopem Nikon Eclipse TE2000-S a pomocí zařízení MetaMorph 7.6.0.0 byly pořízeny fotografie.

Aldefluor test. Bylo publikováno, že buněčná populace s vysokou aktivitou enzymu aldehyd dehydrogenázy (ALDH) obohacuje kmenové/progenitorové buňky mléčných žláz (23). Aldefluor test byl proveden podle pokynů výrobce (StemCell Technologies). Jednotlivé buňky získané z buněčných kultur xenoštěpových nádorů byly po dobu 40 až 50 minut inkubovány při teplotě 37 °C v pufru pro Aldefluor test obsahujícím ALDH substrát, bodipy-aminoacetaldehyd (1 μmol/l na 1 000 000 buněk). Jako negativní kontrola byl z každého vzorku odebrán podíl a inkubován za stejných podmínek za přítomnosti ALDH inhibitoru diethylaminobenzaldehydu. Ke stanovení populace ALDH-pozitivních buněk byla použita průtoková cytometrie.

Primární model s neobézními diabetickými myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí. Pokusy na myších byly prováděny v souladu se standardním protokolem schváleným University Committee on the Use and Care of Animals při University of Michigan. Buňky SUM159 (2 000 000) smíšené s Matrigelem (BD Biosciences) byly injikovány do prsních tukových polštářků 5týdeních neobézních diabetických myší s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient, NOD/SCID) (The Jackson Laboratory), jak bylo uvedeno dříve (24). Nádory byly měřeny posuvným měřidlem a objem byl vypočítáván podle vzorce $V = \frac{1}{2} (\text{šířka}^2 \times \text{délka})$. Po dvou týdnech od injekce byly myši náhodně rozděleny do dvou skupin. Denně po dobu dvou týdnů byla jedné skupině aplikována i.p. kontrola (0,9% roztok NaCl), druhé skupině byl nastříkovan sulforafan v množství 50 mg/kg (rozpuštěný v 0,9% roztoku NaCl).

Disociace nádorů. Po skončení aplikace léku byly myši humaně utraceny a byl jim odebrán nádor. Nádorová tkáň byla mechanicky a enzymaticky oddělena, čímž byla získána suspenze jednotlivých buněk, jak bylo popsáno dříve (25). Stručně řečeno, nádor byl rozmělněn skalpelem a po dobu 15 až 20 minut inkubován při teplotě 37 °C v médiu 199 (Invitrogen) smíšeným s kolagenázou/hyaluronidázou (StemCell Technologies). Tkáň byla dále disociována triturací pipetou a zfiltrována přes 40μm nylonový filtr, čímž byla získána suspenze jednotlivých buněk, dále použitých pro Aldefluor test a průtokovou cytometrii.

Model sekundárních NOD/SCID myší. Živé buňky z disociovaných nádorů byly rozříděny metodou fluorescenčně aktivovaného třídění buněk. Dvěma skupinám myší – čtyřem ze skupiny 1 a třem ze skupiny 2 – byly samostatně implantovány nádorové buňky. Každé sekundární NOD/SCID myši bylo do jedné strany inguinálního prsního tukového polštářku nastříkáno 50 000 buněk z nádorů kontrolních myší a do kontralaterálního prsního tukového polštářku dalších 50 000 buněk z nádorů vystavených působení sulforafanu. Růst nádorů byl sledován a jejich objem měřen dvakrát týdně. Když některý z obou nádorů dosáhl objemu 300 až 500 mm³, byla myš humaně utracena.

Analýza Western blot. Buňky byly po dobu uvedenou v legendách k obrázkům vystaveny působení sulforafanu v různých koncentracích. Buňky byly shromážděny, lyzovány v pufru pro radioimunoprecipitační test [20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 1 % NP40, 5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l Na₃VO₄ (pH 7,5)] suplementovaném koktejlem inhibitorů proteázy (Pierce) a inhibitorem fosfatázy (Calbiochem, EMD Biosciences) a po dobu 30 minut inkubovány na ledu. Buněčný lysát byl centrifugován rychlostí 14 000 ot/min a byl odebrán supernatant.

Životnost buněk (%)

Koncentrace SF (μmol/l)

Násobný nárůst aktivity caspase-3

Koncentrace SF (μmol/l)

Obr. 1. Sulforafanem inhibovaná proliferace a vyvolaná apoptóza v buňkách rakoviny prsu. A – buňky SUM159 a MCF7 rozmnožující se v log fázi byly po dobu 48 hodin vystaveny rostoucím koncentracím sulforafanu. Antiproliferační účinek sulforafanu byl měřen MTS testem. B – sulforafanem zvýšená aktivita caspase-3 v buňkách SUM159. Hodnoty jsou průměry (n ≥ 3); úsečky = směrodatná odchylka; SF = sulforafan.

<p>A Primární mammosféry</p> <p>Tvorba sfér normalizovaná vůči kontrole (%)</p> <p>Koncentrace SF ($\mu\text{mol/l}$)</p>	<p>B Velikost mammosfér</p>
<p>C 2. pasáž</p> <p>Tvorba sfér normalizovaná na kontrolu (%)</p> <p>Koncentrace SF ($\mu\text{mol/l}$)</p>	<p>3. pasáž</p> <p>Tvorba sfér normalizovaná vůči kontrole (%)</p> <p>Koncentrace SF ($\mu\text{mol/l}$)</p>

Obr. 2. Inhibiční účinek sulforafanu na tvorbu mammosfér. Buňky MCF7 a SUM159 byly pěstovány v podmínkách tvorby mammosfér. A – primární mammosféry byly inkubovány 7 dní se sulforafanem (0,5, 1 a 5 $\mu\text{mol/l}$) nebo DMSO. Působením sulforafanu se počet primárních mammosfér snížil. B – sulforafan zmenšoval velikost primárních mammosfér (zvětšení 100 \times). Objem mammosfér byl odhadnut podle vzorce $V = (4/3) \pi R^3$. C – za nepřítomnosti léčiva poskytl druhá a třetí pasáž původně primárních mammosfér vystavených sulforafanu méně sfér než kontrola. Body – průměr ($n = 3$); úsečky = směrodatná odchylka. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; SF = sulforafan.

Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí BCA Protein Assay Reagents (Pierce). Stejná množství proteinu byla podrobena SDS-PAGE a přenesena na polyvinyliden-difluoridovou membránu (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), která pak byla inkubována s příslušnými protilátkami.

TOP-dGFP lentiviral β -catenin reporter test. TCF/LEF-1 (TOP-dGFP, FOP-dGFP) lentivirální signální systém byl laskavě darován Dr. Wiessmanem z Ludwig Center, Stanford University School of Medicine (Stanford, CA, USA)(26). Buňky byly infikovány TOP-dGFP nebo kontrolním FOPdGFP se zmutovanými vazebnými místy TCF/LEF-1. TOP-dGFP MCF7 a FOP-dGFP MCF7 buňky byly uchovávány v témže RPMI 1640 jako MCF7 buňky. MCF7, TOP-dGFP MCF7 a FOP-dGFP MCF7 buňky byly po dobu 5 dní kultivovány v témže séra prostém mammary epithelium basal médiu jako mammosféry v šestijamkových ultralow attachment destičkách v hustotě 1000 až 1500 buněk/ml. Jednotlivé buňky připravené z primárních sfér byly 48 hodin inkubovány v médiu obsahujícím 5 $\mu\text{mol/l}$ sulforafanu nebo/a 0,5 $\mu\text{mol/l}$ BIO. Po disociaci byla suspenze jednotlivých buněk použita k průtokové cytometrické analýze na populaci dGFP-pozitivních buněk. Mateřské buňky MCF7 sloužily jako kontrola na autofluorescenci. Pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TE2000-S ve spojení s přístrojem MetaMorph 7.6.0.0 byly pořízeny fotografie mammosfér.

Statistická analýza. Statistické rozdíly byly stanoveny pomocí dvoustranného Studentova t-testu. Údaje jsou prezentovány ve formě průměru \pm směrodatná odchylka ($n \geq 3$).

Výsledky

Sulforafan inhibuje proliferaci a vyvolává apoptózu buněk rakoviny prsu. Již minule bylo ukázáno, že sulforafan inhibuje v buňkách rakoviny prsu proliferaci (27) a vyvolává apoptózu (28). Poprvé jsme antiproliferativní účinek sulforafanu na dvou buněčných liniích lidské rakoviny prsu, SUM159 a MCF7, vyhodnotili MTS testem. Buňky byly vystaveny rostoucím koncentracím sulforafanu po dobu 48 hodin; poměrný počet životaschopných buněk po tomto působení v porovnání s kontrolou je vyneseno na obr. 1A. Přežívání buněk s rostoucí koncentrací sulforafanu klesalo; hodnota IC_{50} činila u buněk SUM159 přibližně 10 $\mu\text{mol/l}$ a u buněk MCF7 16 $\mu\text{mol/l}$. Fluorometrický test na caspase-3 ukázal, že sulforafan (10 $\mu\text{mol/l}$) vyvolává významně ($P = 0,005$) aktivaci caspase-3 (obr. 1B).

Sulforafan inhibuje in vitro kmenové/progenitorové buňky rakoviny prsu. Bylo prokázáno, že prsní kmenové/progenitorové jsou obohaceny nonadherentními sférickými buněčnými shluky, tzv. mammosférami (22). Tyto buňky jsou schopny poskytovat sekundární sféry a diferencovat se podél násobných linií (22). K posouzení, zda by sulforafan mohl potlačovat tvorbu mammosfér in vitro, jsme primární MCF7 a SUM159 sféry vystavili různým koncentracím sulforafanu a potom je kultivovali ve dvou dalších pasážích za nepřítomnosti látky. Jak ukazuje obr. 2A a 2B, sulforafan tvorbu primárních sfér inhiboval. Nejen že počet sfér poklesl o 45–75 % ($P < 0,01$; obr. 2A), ale 8násobně až 125násobně se zmenšila také jejich velikost (obr. 2B). Dále, významný pokles počtu buněk tvořících sféry v následných pasážích prokázal u těchto kmenových/progenitorových buněk sníženou schopnost samoobnovování (obr. 2C) (22). MCF7 buňky původně rozmnožované za přítomnosti 5 $\mu\text{mol/l}$ sulforafanu téměř neprodukovaly sekundární sféry a žádné buňky neprošly do třetí generace (obr. 2C). Je třeba poznamenat, že koncentrace sulforafanu, které postačovaly k potlačení tvorby mammosfér (IC_{50} , zhruba 0,5–1 $\mu\text{mol/l}$ u sfér jak SUM159, tak MCF7), byly přibližně 10násobně nižší než koncentrace vykazující antiproliferativní účinky v MTS testu (IC_{50} , ~10 $\mu\text{mol/l}$ v případě SUM159 a 16 $\mu\text{mol/l}$ v případě MCF7).

U karcinomu prsu bylo ukázáno, že buněčná populace s vysokou ALDH aktivitou podle Aldefluor testu obohacuje tumorogenní kmenové/progenitorové buňky (23). Tato buněčná populace je schopná samoobnovování a dokáže generovat nádory podobné mateřskému nádoru (23). Jelikož SUM159 má poměrně vysoký podíl ALDH-pozitivních buněk, zvolili jsme SUM159 ke zkoumání, zda sulforafan inhibuje nádor-iniciující ALDH-pozitivní buňky in vitro. Jak ukazuje obr. 3A, 1 $\mu\text{mol/l}$ sulforafan významně snižuje ALDH-pozitivní populaci buněk SUM159 o více než 65 % ($P = 0,008$) a 5 $\mu\text{mol/l}$ vyvolává u ALDH-pozitivní populace pokles přes 80 % ($P < 0,008$). Typické grafy průtokové cytometrie jsou prezentovány na obr. 3B. Tyto údaje ukazují, že sulforafan inhibuje ALDH-pozitivní buňky v podobných koncentracích, jako ve kterých inhibuje tvorbu mammosfér, a v koncentracích 10krát nižších, než ve kterých v MTS testu inhibuje rakovinové buňky.

Tato zjištění tedy prokazují, že sulforafan redukuje populaci kmenových/progenitorových buněk rakoviny prsu in vitro. Zajímavým zjištěním je, že sulforafan dokáže kmenové/progenitorové buňky inhibovat v koncentracích 0,5–5 $\mu\text{mol/l}$, které prakticky neovlivňují hlavní (bulk) populaci nádorových buněk, z čehož lze vyvodit, že se sulforafan zřejmě přednostně zaměřuje na kmenové/progenitorové buňky v porovnání s diferencovanými rakovinovými buňkami.

A

ALDH-pozitivní buňky
Koncentrace SF ($\mu\text{mol/l}$)

B

Kontrola 1 $\mu\text{mol/l}$ SF 5 $\mu\text{mol/l}$ SF

Obr. 3. Inhibiční účinek sulforafanu na ALDH-pozitivní buněčnou populaci. Buňky SUM159 byly po dobu 4 dnů vystaveny sulforafanu (1 a 5 $\mu\text{mol/L}$) nebo DMSO a zkoumány Aldefluor testem a průtokovou cytometrií. A – sulforafan snižuje podíl ALDH-pozitivních buněk. Sloupce = průměr ($n = 3$); úsečky = směrodatná odchylka. B – reprezentativní grafy průtokové cytometrie. R2 pokrývá oblast ALDH-pozitivních buněk. SF = sulforafan.

A 1. generace

B 1. generace

Objem nádoru (mm^3)
Dnů po očkování

Tělesná hmotnost (g)
Dnů po očkování

C

D

Kontrola

Působení

% ALDH-pozitivních buněk

Boční rozptyl

Boční rozptyl

Kontrola Působení

Obr. 4. Sulforafan (SF) snižuje velikost nádoru a populaci ALDH-pozitivních buněk v primárních xenoštěpech rakoviny prsu. NOD/SCID myším nesoucím v tukových polštářcích jako xenoštěpy buňky SUM159 byly po dobu 2 týdnů denně aplikovány i.p. injekce kontroly nebo 50 mg/kg sulforafanu. Objem nádoru (A) a tělesná hmotnost myši (B) byly stanoveny, jak je uvedeno v části Materiály a metody. Koncem léčby činila velikost nádorů u myši, jimž byl aplikován sulforafan, 50 % velikosti u kontrolních myši. C – sulforafan snižuje v xenoštěpových nádorech prsu podíl ALDH-pozitivních buněk. D – soubor reprezentativních grafů průtokové cytometrie. Data jsou ve tvaru průměr \pm směrodatná odchylka ($n = 6$).

Sulforafan eliminuje prsní RKB in vivo. Ke stanovení, zda se sulforafan může zaměřovat na prsní RKB in vivo, jsme použili xenoštěpový model buněk SUM159 u NOD/SCID myši. Dva týdny po naočkování buněk byl zvířatům denně injekčně aplikován sulforafan v dávce 50 mg/kg. Po 2 týdnech aplikace činila velikost nádoru u myši, jimž byl aplikován sulforafan, 50 % velikosti u kontrolních myši, jimž byl aplikován 0,9% roztok NaCl ($P = 0,018$; obr. 4A), přičemž sulforafan zjevně nepůsobil toxicky, jak vyplývá z tělesné hmotnosti (obr. 4B). Nádory byly z těl zvířat izolovány a nádorové buňky byly analyzovány Aldefluor testem. Jak ukazuje obr. 4C a D, sulforafan snižoval ALDH-pozitivní populaci v porovnání a kontrolními myši o více než 50 % ($P = 0,003$).

Pokles populace ALDH-pozitivních buněk v nádorech po působení sulforafanu sice naznačuje, že se sulforafan může zaměřovat na kmenové/progenitorové buňky rakoviny prsu, rozhodnějším testem je však schopnost reziduálních nádorových buněk iniciovat nádor po reimplantaci do sekundárních myši (6). Proto jsme zkoumali růst sekundárních nádorů u NOD/SCID myši naočkovaných buňkami primárního nádoru získanými z primárních xenoštěpů. Abychom předešli případným výkyvům v důsledku heterogenity myši, bylo každé recipientní myši do jedné strany inguinálního prsního tukového polštářku injekčně aplikováno 50 000 buněk z nádorů vystavených sulforafanu a do kontralaterálního tukového polštářku dalších 50 000 buněk z kontrolních nádorů. Výsledky ukázaly, že zatímco rakovinové buňky z kontrolních zvířat vyvolaly u sekundárních NOD/SCID myši rychlý růst nádoru, jehož konečný objem činil 300 až 500 mm^3 , rakovinové buňky z myši, jimž byl aplikován sulforafan, již v recipientní myši do 33 dní po implantaci žádný nádor nevyvolaly (obr. 5A). Obr. 5A a B ukazují, že nádorové buňky z myši ošetřovaných sulforafanem vyvolávaly po sedmi očkováních 19. dne pouze jeden malý nádor (6 mm^3), zatímco kontrolní nádorové buňky poskytovaly nádory již 7. dne ($P < 0,01$). Všechna kontrolní očkování vyvolala do 15. dne nádor (obr. 5B). Z těchto výsledků lze vyvodit, že sulforafan dokáže v primárních xenoštěpech eliminovat RKB, čímž u sekundárních myši vylučuje růst nových nádorů. Ve spojení s výsledky Aldefluor testu in vivo lze z těchto zjištění vyvodit, že se sulforafan zaměřuje na prsní RKB s vysokou potencí.

Sulforafan omezuje v buňkách rakoviny prsu dráhu Wnt/ β -katenin. Dále jsme zkoumali mechanismy, jež se mohou na účinku sulforafanu na prsní RKB podílet. Významným regulátorem samoobnovování kmenových buněk je dráha Wnt/ β -katenin (8). Jelikož bylo publikováno, že sulforafan omezuje (downreguluje) β -katenin v lidských buněčných liniích rakoviny děložního čípku a karcinomu jater (19), zkoumali jsme, zda β -katenin a Wnt/ β -katenin downstream od cílů jsou sulforafanem omezovány (downregulovány) také v lidských buňkách rakoviny prsu. Jak ukazuje obr. 6A, snižoval sulforafan v buňkách MCF7 a SUM159 proteinovou hladinu β -kateninu až o 85 % a také exprese cyklinu D1, jednoho z cílových genů Wnt/ β -katenin, poklesla až o 77 %. K dalšímu potvrzení, že downregulace proteinových hladin β -kateninu snižuje jeho transkripční aktivity, jsme použili TCF/LEF TOP-dGFP lentivirální reporter systém. β -katenin aktivuje v jádře TCF/LEF, čímž podporuje transkripci destabilizovaného genu zeleně fluoreskujícího proteinu (dGFP). Expese dGFP byla dále analyzována fluorescenční mikroskopií a kvantifikována průtokovou cytometrií. Podle průtokové cytometrie jsou přibližně 3 % transfikovaných buněk dGFP pozitivní a sulforafan v koncentraci 5 μ mol/l tuto populaci snižoval o 30–40 % ($P = 0,002$) (obr. 6B).

A 2. generace

Objem nádoru (mm^3)	Kontrolní skupina 1 Kontrolní skupina 2 SF skupina 1 SF skupina 2
Dny po inokulaci	

B 2. generace

% myši bez nádoru	Kontrola 50 mg/kg SF
Dny po inokulaci	

Obr. 5. Sulforafan (SF) vymýtil prsní RKB in vivo, jak bylo vyvozeno z reimplantace do sekundárních myši. Každé sekundární NOD/SCID myši bylo do jedné strany polštářku prsního tuku vpraveno 50 000 buněk z kontrolních nádorů a do kontralaterálního tukového polštářku dalších 50 000 buněk z nádorů po působení sulforafanu. A – křivky růstu nádoru u příjmových NOD/SCID myši. Body = průměr (skupina 1: $n = 4$, skupina 2: $n = 3$); úsečky = směrodatná odchylka. Sulforafan zabránil tumorigenitě prsních RKB. B – podíl myši bez nádoru ke dni utracení jednotlivých skupin. Čtyři myši byly utráceny 20. dne a tři byly utráceny 33. dne kvůli masivní nádorové zátěži na kontrolní straně.

Nitrobuňčná hladina β -kateninu je regulována jeho fosforylačním statusem a následnou proteazomální degradací. Když je β -katenin fosforylován na Ser33/Ser37/ Thr41 působením GSK3 β , okamžitě podléhá ubikvitin-proteazomové degradaci (17). Fosforylací GSK3 β na Ser9 se může snižovat aktivita GSK3 β , čímž se β -katenin stabilizuje (29, 30). Použili jsme tedy inhibitor proteazomu MG132 k zablokování funkce proteazomu a zjišťovali akumulaci fosfo- β -kateninu (Ser33/ Ser37/Thr41) v reakci na sulforafan (obr. 6C nahoře). Za přítomnosti LiCl jakožto inhibitoru GSK3 β se sulforafanem indukovaná fosforylace β -kateninu obrátila (obr. 6C nahoře) (31). Jak ukazuje obr. 6B, 0,5 μ mol/l BIO, další specifický inhibitor GSK3 β (31, 32), zvyšoval populaci dGFP-pozitivních buněk více než pětinašobně ($P < 0,0001$) a sulforafan (5 μ mol/l) tuto populaci za přítomnosti BIO snižoval o více než 60 % ($P < 0,0001$). Dále, naše výsledky ukazují, že s rostoucí koncentrací sulforafanu klesá v buňkách hladina fosfo-GSK3 β (Ser9) až o 74 % (obr. 6C, uprostřed). Bylo zjištěno, že LiCl inaktivuje GSK3 β fosforylací Ser9, čímž se potlačuje fosforylace β -kateninu na Ser33/ Ser37/Thr41 a jeho degradace (31, 32). Jak vidíme na dolním panelu obr. 6C, sulforafan dokáže potlačovat LiCl-indukovanou fosforylací GSK3 β a akumulaci β -kateninu.

V souhrnu lze z těchto údajů vyvodit, že downregulace samoobnovovací dráhy Wnt/ β -katenin může přispívat k inhibičním účinkům sulforafanu na prsní RKB.

Bylo by tedy účelné provést další studie ke stanovení této výrazné úlohy downregulace při inhibici prsních RKB působením sulforafanu.

Diskuse

Účinnost sulforafanu, přírodní sloučeniny získávané z brokolice a jejích výhonků, proti rakovině byla hodnocena u různých typů rakoviny. Například perorální nebo i.p. aplikace sulforafanu inhibuje růst nádoru v prostatických PC-3 a pankreatických Panc-1 xenoštěpech (33, 34). Bylo prokázáno, že riziko premenopauzální rakoviny prsu je ve vztahu nepřímé úměry ke konzumaci brokolice (35). Perorálně podaný sulforafan se dostává do prsních žláz a zvyšuje aktivitu detoxifikačního enzymu (36). Dále byla vyslovena domněnka, že sulforafan má potenciál k tomu, aby bránil rezistenci a relapsu/recidivě nádoru (37). Jedna studie z poslední doby prokázala účinnost sulforafanu při snižování rezistence nádoru slinivky břišní vůči ligandu indukujícímu apoptózu spojenou s nekrotickým faktorem a tím, že interferuje s NF-

kB-indukovanou antiapoptotickou signalizací (18). Z jiné studie vyplývá, že sulforafan dokáže překonávat doxorubicinovou rezistenci a obnovovat v buňkách indukci apoptózy (38).

A

B TOP-dGFP TOP-dGFP+SF

% dGFP-pozitivních buněk

C

Obr. 6. Sulforafan downreguluje samoobnovovací dráhu Wnt/ β -katenin. A – sulforafan snižuje v buněčné linii SUM159 i MCF7 proteinové hladiny β -kateninu a cyklinu D1. B – MCF7 mammosféry infikované TOP-dGFP reporter lentivirem byly po dobu 2 dnů vystaveny působení vyznačených sloučenin (0.5 μ mol/l BIO a 5 μ mol/l sulforafan) jednotlivě nebo v kombinaci. Sulforafan snižuje podíl dGFP-pozitivních buněk o 30–40%. BIO tuto populaci zvyšuje, kdežto sulforafan ji za přítomnosti BIO snižuje o více než 60 %. Vpravo: reprezentativní výsledky průtokové cytometrie mammosfér TOP-dGFP a jejich vzhled pod fluorescenčním mikroskopem (zvětšení $\times 100$). C – sulforafan napomáhá fosforylaci β -kateninu na Ser33/37/Thr41, zatímco LiCl fosforylaci potlačuje inaktivaci GSK3 β (nahofe). Sulforafan snižuje hladinu fosfo-GSK3 β (Ser9), zatímco celkový GSK3 β zůstává nezměněný (uprostřed). LiCl zvyšuje proteinovou hladinu β -kateninu fosforylaci/inaktivaci GSK3 β na Ser9, kdežto sulforafan LiCl-indukovanou fosforylaci GSK3 β a akumulaci β -kateninu snižuje (dole). SF = sulforafan, dGFP = destabilizovaný zeleně fluoreskující protein.

Z těchto zjištění je zřejmé, že k výzkumu chemopreventivních vlastností sulforafanu nebo brokolice či jejich výhonků v klinických studiích jsou pádné důvody.

Existuje stále více dokladů na podporu teorie RKB, podle níž je celá řada typů rakoviny podněcována a udržována malým podílem RKB (8). Koncepte RKB má zásadní klinické implikace pro léčbu a prevenci rakoviny (8, 39). Ze studií z poslední doby vyplývá, že RKB mají schopnost rezistenci a relaps/recidivu nádoru podněcovat (40, 41). Nepostačující účinnost současných léků proti pokročilému a metastázujícímu onemocnění si vyžaduje nové přístupy, které se zaměří specificky na cílovou populaci RKB (8, 42, 43). Léčivé přípravky zaměřené jak proti diferencovaným rakovinovým buňkám, tak proti RKB, se tedy mohou při léčbě těchto onemocnění výrazně osvědčit. Výzkumní pracovníci zjistili, že mnohé sloučeniny přítomné ve stravě jsou perspektivními látkami účinnými proti RKB; patří k nim například kurkumin (13, 14). Proto jsme s ohledem na chemopreventivní aktivitu sulforafanu a implikace teorie RKB použili sulforafan v systémech jak in vitro, tak in vivo ke zjištění, zda tato látka působí proti prsním RKB.

K izolaci a charakterizaci prsních RKB in vitro byla vyvinuta řada technik. Kulturu mammosfér použili k izolaci a expanzi prsních kmenových/progenitorových buněk Dontu et al. (22) s ohledem na skutečnost, že kmenové/progenitorové buňky se dokážou rozmnožovat v suspenzi bez séra, zatímco diferencované buňky v těchto podmínkách nepřežívají (21). Použitím této metody jsme prokázali, že sulforafan (0,5–5 μ mol/l) výrazně potlačuje tvorbu mammosfér u buněk jak SUM159, tak MCF7 (obr. 2). Další metoda spočívá ve využití buněčných markerů, např. CD44⁺CD24^{low}lin⁻ a ALDH pozitivních (21, 23, 25), k odlišení prsních kmenových/progenitorových buněk od diferencovaných rakovinových buněk. Bylo publikováno, že pouhých 500 ALDH-pozitivních buněk dokáže během 40 dní vygenerovat nádor prsu, zatímco 50 000 ALDH-negativních buněk nádor nevytvoří (23). ALDH-pozitivní buňky a CD44⁺CD24^{low}lin⁻ byly identifikovány jako malé překryvy, které mají nejvyšší tumorigenní schopnosti – dokážou vytvořit nádor z pouhých 20 buněk (23). Naproti tomu ALDH-pozitivní buňky bez markeru CD44⁺CD24^{low}lin⁻ dokážou vyprodukovat nádor z 1500 buněk, což ani 50 000 CD44⁺CD24^{low}lin⁻ ALDH-negativních buněk nedokáže (23). K vyhodnocení schopnosti sulforafanu zacílit se na kmenové/progenitorové buňky rakoviny prsu jsme použili Aldefluor test. Ukázali jsme, že v koncentraci 1–5 μ mol/l dokáže sulforafan inhibovat nádor-iniciující ALDH-pozitivní buňky in vitro o 65–80 % (obr. 3). Zvláštní pozornost si zaslouží skutečnost, že v koncentracích, v nichž inhibuje kmenové/progenitorové buňky jak v testu tvorby mammosfér, tak v Aldefluor testu, má sulforafan jen minimální vliv na hromadnou (bulk) populaci buněčných linií rakoviny prsu, z čehož přednostní zacílení na kmenové/progenitorové buňky vyplývá.

Spolehlivý a citlivý systém in vivo pro studium lidské rakoviny prsu představuje injekce buněk lidské rakoviny prsu do prsních tukových polštářků imunodeficientních NOD/SCID myši (25, 44). Pomocí tohoto xenoštěpového modelu jsme prokázali, že se sulforafan dokáže zaměřovat na prsní RKB in vivo. Denní injekce sulforafanu aplikované po dobu 2 týdnů potlačuje u primárních NOD/SCID myši růst nádoru a zhruba o 50 % redukuje populaci ALDH-pozitivních nádorových buněk (obr. 4). Důležitější je naše zjištění, že nádorové buňky z myši ošetřovaných sulforafanem nedokážou do 33 dnů vytvořit u recipientních myši sekundární nádor (obr. 5). Pro rozdíl mezi 50% poklesem ALDH-pozitivní populace a nevyvoláním růstu nádoru u sekundárních myši jsou dvě možná vysvětlení. Jedno spočívá v tom, že i když jsou ALDH-pozitivní buňky obohaceny kmenovými/progenitorovými buňkami, ne všechny z nich jsou schopny vyvolat nádor. Druhým důvodem může být experimentální uspořádání, které jsme u primárních NOD/SCID myši použili.

Primární NOD/SCID myši jsme naočkovali 2 000 000 buňkami SUM159 a léčivo jsme jim aplikovali po dobu 2 týdnů od inokulace, což obojí mohlo vést k podhodnocení účinku sulforafanu na populaci ALDH-pozitivních buněk. Ovšem schopnost RKB se samoobnovovat a diferencovat stanovená reimplantací primárních nádorových buněk do sekundárních myši je spolehlivějším funkčním testem (6). Ty jsou v souladu se zjištěním in vitro, že se sulforafan zaměřuje přednostně na rakovinové kmenové/progenitorové buňky a nikoli na hromadnou buněčnou populaci. Preference sulforafanu ve smyslu likvidace RKB může mít význam pro chemoprevenci.

U známého kurkuminu bylo zjištěno, že v rakovinových buňkách tlustého střeva a slinivky břišní narušuje samoobnovovací dráhy Wnt resp. Notch (13, 14). Bylo publikováno, že jablečný kvercetin a epigallokatechin-gallát ze zeleného čaje regulují v lidských buňkách rakoviny tlustého střeva základní elementy drah Wnt a Notch (15). Podle Parka et al. (19) je β -katenin downregulován v HeLa a HepG2 buňkách. V souladu s touto studií jsme prokázali, že sulforafan dokáže v buňkách rakoviny prsu downregulovat samoobnovovací dráhu Wnt/ β -katenin a že sulforafanem vyvolaná fosforylace β -kateninu (Ser33/Ser37/Thr41) a degradace proteazomu probíhá možná přes aktivaci GSK3 β (obr. 6). Podle Myzaka et al. (45) zvyšuje sulforafan u HDAC1-transfikovaných buněk HEK293 aktivitu β -kateninu, aniž by změnil jeho proteinovou hladinu. Rozdíly mezi studiemi mohou být způsobeny použitými buněčnými liniemi a podmínkami zpracování.

Jako chemopreventivní látka má sulforafan řadu výhod, jako je vysoká biologická dostupnost a nízká toxicita (4). Sulforafan z brokolicevých výtažků se v lidském tenkém střevě účinně a rychle vstřebává a distribuuje v těle (2, 46). Ekvivalentní plazmatické koncentrace sulforafanu v lidském těle dosáhly vrcholu 1 hodinu po podání jednorázové dávky 200 μ mol isothiokyanátů z brokolicevých výhonků (hlavně sulforafanu), a to 0,94–2,27 μ mol/l (47). V jedné nedávne pilotní studii byla u osmi žen, které konzumovaly přípravek z brokolicevých výhonků obsahující 200 μ mol sulforafanu, zjištěna zhruba 1 hodinu před operací akumulace sulforafanu v lidské prsní tkáni v množství 1,45 \pm 1,12 pmol/mg u pravého prsu a 2,00 \pm 1,95 pmol/mg u levého prsu (36). Podle našich výsledků in vitro lze předpokládat, že v těchto koncentracích je sulforafan účinný proti prsním RKB. Sulforafan sám sice nebyl na člověku hodnocen, brokolicevé výhonky však byly na toxicitu hodnoceny v klinických studiích (4). V hodnocení fáze I bylo prokázáno, že brokolicevé výhonky podávané po dobu 7 dní perorálně v dávce 25 μ mol isothiokyanátů (hlavně sulforafanu) nevyvolávají žádnou významnou toxicitu (48). V jiné studii byl tolerován 200 dospělými osobami, které každou noc po dobu 2 týdnů konzumovaly roztok z brokolicevých výhonků obsahující 400 μ mol glukorafaninu (prekurzoru sulforafanu) (49). Dále, sulforafan v koncentracích pod 10 μ mol/l nevykazoval žádný významný vliv na zástavu buněčného cyklu a indukci apoptózy lidských netransformovaných T lymfocytů (50).

Závěrem lze tedy shmout, že jsme prokázali, že se sulforafan dokáže zaměřit na prsní RKB, jak bylo stanoveno testem tvorby mammosfér, Aldefluor testem a měřením růstu nádoru po reimplantaci sekundárním myším.

Dále jsme ve studii zjistili downregulaci samoobnovovací dráhy Wnt/ β -katenin způsobenou sulforafanem jakožto jeden z možných mechanismů jeho účinnosti. Tyto studie podporují použití sulforafanu k chemoprevenci rakoviny prsu. Jsou pádným důvodem pro předklinické a klinické sulforafanu nebo brokolice či jejich výhonků jako přípravků pro léčbu rakoviny prsu.

Oznámení možného střetu zájmů

Nedochází k žádnému střetu zájmů.

Poděkování

Děkujeme dr. Stephenu P. Ethierovi z Karmanos Cancer Center za buněčnou linii SUM159 a dr. Irvingu L. Weissmanovi z Ludwig Center, Stanford University School of Medicine za laskavé poskytnutí TCF/LEF-1 (TOP-dGFP, FOP-dGFP) lentivirálního reporter systému.

Grantová podpora

Grant NIH (RO1 CA120023), University of Michigan Cancer Center Research Grant (Munn), a University of Michigan Cancer Center (D. Sun).

Náklady na publikaci tohoto článku byly zčásti pokryty z poplatků ze stránky. Proto musí být článek podle ustanovení zákona 18 U.S.C. Section 1734 označen jako inzerce.

Došlo 3. 11. /2009, revidováno 15. 2. 2010, přijato 26. 2. 2010; online zveřejněno poprvé 13. 4. 2010.

Literatura

1. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2399–403.
2. Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett* 2008;269:291–304.
3. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10367–72.
4. Zhang Y, Tang L. Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28:1343–54.
5. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2005;7:86–95.

6. Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ β -catenin signaling. *PLoS Biol* 2009;7:e1000121.
7. Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006;66:6063–71.
8. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105–11.
9. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 2004;6: R605–15.
10. Smalley MJ, Dale TC. Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:215–30.
11. Shafee N, Smith CR, Wei S, et al. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res* 2008;68:3243–50.
12. Hambardzumyan D, Squatrito M, Holland EC. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer Cell* 2006;10:454–6.
13. Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH. Notch-1 downregulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer* 2006;106:2503–13.
14. Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. β -Catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002;21:8414–27.
15. Pahlke G, Ngiewih Y, Kern M, Jakobs S, Marko D, Eisenbrand G. Impact of quercetin and EGCG on key elements of the Wnt pathway in human colon carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2006;54: 7075–82.
16. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469–80.
17. Liu C, Li Y, Semenov M, et al. Control of β -catenin phosphorylation/ degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837–47.
18. Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, et al. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF- κ B-induced antiapoptotic signalling. *Gut* 2009;58:949–63.
19. Park SY, Kim GY, Bae SJ, Yoo YH, Choi YH. Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. *Oncol Rep* 2007;18:181–7.
20. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;65:5506–11.
21. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* 2008;75:75–84.
22. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003;17:1253–70.
23. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;1:555–67.
24. Luo M, Fan H, Nagy T, et al. Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res* 2009;69:466–74.
25. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983–8.
26. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in selfrenewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:409–14.
27. Azarenko O, Okounova T, Singletary KW, Jordan MA, Wilson L. Suppression of microtubule dynamic instability and turnover in MCF7 breast cancer cells by sulforaphane. *Carcinogenesis* 2008;29: 2360–8.
28. Pledger-Tracy A, Sobolewski MD, Davidson NE. Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1013–21.
29. Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 1998;273:19929–32.
30. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:769–76.
31. Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, Klein PS. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 1997;185:82–91.
32. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:8455–9.
33. Pham NA, Jacobberger JW, Schimmer AD, Cao P, Gronda M, Hedley DW. The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1239–48.
34. Singh AV, Xiao D, Lew KL, Dhir R, Singh SV. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* 2004;25:83–90.
35. Ambrosone CB, McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Zhang Y, Shields PG. Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr* 2004;134:1134–8.
36. Cornblatt BS, Ye L, Dinkova-Kostova AT, et al. Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis* 2007;28:1485–90.
37. Myzak MC, Dashwood RH. Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett* 2006;233:208–18.
38. Fimognari C, Nusse M, Lenzi M, Sciuscio D, Cantelli-Forti G, Hrelia P. Sulforaphane increases the efficacy of doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53 mutations. *Mutat Res* 2006;601:92–101.
39. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 2008;26:2813–20.
40. Sakariassen PO, Immervoll H, Chekenya M. Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in brain tumors: status and controversies. *Neoplasia* 2007;9:882–92.
41. Tang C, Chua CL, Ang BT. Insights into the cancer stem cell model of glioma tumorigenesis. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36:352–7.
42. Lippman ME. High-dose chemotherapy plus autologous bone marrow transplantation for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:1119–20.
43. Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 1987;316: 1435–40.
44. Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3547–9.
45. Myzak MC, Karplus PA, Chung FL, Dashwood RH. A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res* 2004;64:5767–74.

46. Petri N, Tannergren C, Holst B, et al. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos* 2003;31:805–13.
47. Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* 2002;316:43–53.
48. Shapiro TA, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, et al. Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr Cancer* 2006;55:53–62.
49. Kensler TW, Chen JG, Egnér PA, et al. Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2605–13.
50. Fimognari C, Nusse M, Berti F, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P. Isothiocyanates as novel cytotoxic and cytostatic agents: molecular pathway on human transformed and non-transformed cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1133–8.

Klinický výzkum rakoviny

Potravinové lněné semeno vyvolává při postmenopauzální rakovině prsu změny nádorových biologických markerů

Lilian U. Thompson, Jian Min Chen, Tong Li, et al.

Clin Cancer Res 2005;11:3828-3835. Online zveřejněno 16. 5 2005.

Aktualizované znění Nejnovější znění článku naleznete na adrese
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-04-2326](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2326)

Citované články V tomto článku jsou odkazy na 56 článků, z nichž 17 je volně přístupných na adrese
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/10/3828.full.html#ref-list-1>

Citace v člancích Tento článek je citován ve 13 člancích, jejichž hostitelem je HighWire a jež jsou přístupné na adrese
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/10/3828.full.html#related-urls>

E-mailová upozornění Přihlaste se, pokud máte zájem o bezplatná e-mailová upozornění týkající se tohoto článku nebo časopisu.

**Reprinty a
subskripce** K objednání reprintů tohoto článku nebo k předplacení časopisu kontaktujte AACR Publications Department na adrese pubs@aacr.org.

Povolení Chcete-li si zažádat o povolení použít znovu tento článek nebo jeho část, kontaktujte AACR Publications Department na adrese permissions@aacr.org.

Léčba rakoviny: klinická

Potravinové lněné semeno vyvolává při postmenopauzální rakovině prsu změny nádorových biologických markerů

Lilian U. Thompson¹, JianMin Chen¹, Tong Li², Kathrin Strasser-Weippl² a Paul E. Goss³

Abstrakt

Účel: Bylo prokázáno, že lněné semeno, nejbohatší zdroj savčích prekurzorů lignanu, brzdí u potkanů růst nádorů. V předkládané randomizované dvojité zaslepené placebem kontrolované klinické studii byl u postmenopauzálních pacientek s nově diagnostikovanou rakovinou prsu zkoumán vliv potravinového lněného semene na nádorové biologické markery a vylučování lignanu močí.

Experimentální uspořádání: Pacientky byly randomizovány k denní konzumaci buď muffinu obsahujícího 25 g lněného semene (n = 19) nebo kontrolního (placebového) muffinu (n = 13). V době diagnózy a znovu při konečném chirurgickém zákroku byla nádorová tkáň analyzována z hlediska míry proliferace nádorových buněk (proliferiční index Ki-67, primární hodnocený parametr), apoptózy, exprese c-erbB2 a hladin estrogenového a progesteronového receptoru. Čtyřadvacetihodinové vzorky moči byly analyzovány na lignany a týdenní stravovací záznamy byly hodnoceny z hlediska příjmu makronutrientů a kalorické hodnoty. Doba hlavní léčby činila u skupiny s lněnými semeny 32 dní a u skupiny s placebem 39 dní.

Výsledky: U skupiny se lněnými semeny byl zjištěn pokles indexu Ki-67 (34,2 %; P = 0,001) i exprese c-erbB2 (71,0 %; P = 0,003) a nárůst apoptózy (30,7 %; P = 0,007); u kontrolní skupiny k těmto jevům nedošlo. Mezi oběma skupinami ani mezi obdobími před léčbou a po ní nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v kalorickém příjmu nebo v příjmu makronutrientů. U skupiny se lněnými semeny byl v porovnání s kontrolní skupinou pozorován významný nárůst vylučování lignanu močí (1 300 %; P < 0,01). Celkový příjem lněných semen byl korelován se změnou skóre c-erbB2 (r = -0,373; P = 0,036) a apoptotického indexu (r = 0,495; P < 0,004).

Závěr: Lněné semeno ve stravě má schopnost brzdit u pacientek s rakovinou prsu růst nádoru.

Byl zjištěn výrazný kladný vztah mezi vysokými koncentracemi estrogenu v plazmě a zvýšeným rizikem vzniku rakoviny prsu (1–3). Antagonizací účinku estrogenu pomocí antiestrogenických léků, jako je tamoxifen nebo inhibitory aromatázy (estrogen-syntetázy), se četnost i růst invazivní i neinvazivní rakoviny prsu snižuje (4, 5). Tamoxifen však má nepříznivé účinky, jako je tromboembolie nebo endometriální rakovina, takže jeho použití k chemoprevenci u žen není zcela vhodné. Je proto žádoucí používat při léčbě a prevenci rakoviny prsu jiné antiestrogenické látky. Působením bakteriální flóry v tlustém střevě jsou z prekurzorů, jako je sekoisolaricresinol-diglukosid z rostlinné stravy, produkovány savčí lignany, zejména enterolakton a enterodiol (6) (obr. 1). Ty se účastní enterohepatické cirkulace a některé jsou vylučovány močí. Množství rostlinných lignanů ve stravě přímo koreluje s plazmatickými koncentracemi a urinární exkrecí savčích lignanů (6, 7). Lignany mají podobnou chemickou strukturu jako estradiol a selektivní modulátor estrogenového receptoru tamoxifen, z čehož lze usoudit, že by mohly mít hormonální (estrogenické nebo antiestrogenické) vlastnosti.

V rámci studií *in vitro* bylo zjištěno, že lignany: vyvolávají v rakovinových buňkách MCF-7 mRNA expresi estrogen responsivního proteinu pS2 (8); v placentálních mikrozomech, buňkách lidského choriokarcinomu JEG-3, preadipocytech a buňkách MCF-7 inhibují aromatázu (9–11); váží se na potkaní i lidský α -fetoprotein a soupeří o vazebné místo s estradiolem a estronem (12); za nepřítomnosti estrogenu stimulují růst estrogen-dependentních lidských buněk rakoviny prsu a za přítomnosti estrogenu růst inhibují (13–15); stimulují syntézu sexuálního hormonu vzájemného globulinu (16); u potkanů soupeří s estradiolem o vazebné místo uterinního jaderného estrogenu typu II (16) a váží se na estrogenový receptor (ER), zejména ER- β (17). Lignany mají také neendokrinní vlastnosti, včetně antioxidantního (18–21) a antiangiogenního účinku (22). Epidemiologickými studiemi byl zjištěn významný pokles rizika rakoviny prsu u žen s nejvyšším versus nejnižším kvantilem urinární exkrece enterolaktonu (23, 24), sérových hladin enterolaktonu (25) a příjmu lignanů (26).

Lněné semeno je nejbohatším zdrojem prekurzorů savčího lignanu, s koncentracemi 100krát až 600krát vyššími než u 66 jiných rostlinných potravin ve vegetariánské stravě (27). Lněné semeno obsahuje také ve výjimečně vysokých koncentracích kyselinu α -linolenovu (57 % všech mastných kyselin), jejíž ochranné účinky vůči rakovině prsu byly prokázány ve studiích na zvířatech i v epidemiologických studiích (28).

Pracoviště autorů: ¹Department of Nutritional Sciences, ²Princess Margaret Hospital, University of Toronto, Toronto, Ontario, Kanada, a ³Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts Došlo 15. 11. 2004, revidováno 4. 2. 2005, přijato 23. 2. 2005.

Grantová podpora: Granty American Institute for Cancer Research a Canadian Breast Cancer Research Foundation (L.U. Thompson a P.E. Goss). Náklady na publikaci tohoto článku byly zčásti pokryty z poplatků ze stránky. Proto musí být článek podle ustanovení zákona 18 U.S.C. Section 1734 označen jako inzerce.

Žádosti o reprinty: Paul E. Goss, Massachusetts General Hospital Cancer Center, Cancer Center Administration, 55 Fruit Street, Cox Building, Room 640, Boston, MA 02114, USA. Tel.: 617-724-3118, fax: 617-724-3166, e-mail: pgoss@partners.org. F2005 American Association for Cancer Research.



Obr. 1. Metabolismus rostlinných lignanů na savčí lignany.

Na základě těchto údajů byla vyslovena domněnka, že by lněné semeno mohlo být účinné při léčbě a prevenci rakoviny. Když bylo lněné semeno podáváno v preiniciačním nebo promočním stadiu potkanům, na něž bylo působeno karcinogeny, byl zjištěn významný pokles incidence a velikosti nádorů (29–31). Když bylo podáváno v době, kdy se prsní nádor již vytvořil, zmenšila se velikost nádoru (32). Růst nádoru a/nebo incidence metastáz se také snižovaly u athymických myší, jimž byly vstříknuty lidské ER-pozitivní (MCF-7) (33) nebo ER-negativní (MDA MB 435) (34, 35) buňky rakoviny prsu. Účinek čistého sekoisolariciresinol-diglukosidu izolovaného z lněného semene byl podobný jako u lněného semene samého (32, 36), což ukazuje, že účinek lněného semene je přinejmenším zčásti způsobený lignany. Celkově lze z těchto zjištění vyvodit, že lněné semeno může mít u pacientek s rakovinou prsu vliv na vývoj nádoru.

Schopnost inhibovat kinetiku růstu nádoru při neoadjuvantní léčbě byla dříve použita jako míra účinnosti látky v jiných klinických situacích (37–39). Korelace mezi buněčným proliferačním markerem Ki-67 a klinickým výsledkem byla ověřena v řadě situací, včetně porovnání mezi inhibitory aromatázy letrozolem a tamoxifenem (40). Naše studie se zaměřila na stanovení vlivu lněného semene ve stravě na parametry odrážející kinetiku růstu nádoru a vylučování lignanu močí po předoperačním podávání pacientkám s nově diagnostikovanou rakovinou prsu.

Materiály a metody

Pacientky a uspořádání studie. Provedli jsme randomizovanou placebem kontrolovanou dvojitě zaslepenou prospektivní studii, do které byly zařazeny postmenopauzální pacientky s primární rakovinou prsu. Pacientkami (z University Health Network v Torontu) byly ženy s nově diagnostikovanou bulkou s podezřením na rakovinu, kde byla zapotřebí potvrzující biopsie. Kritéria pro zařazení byla tato: menopauza alespoň 6 měsíců; histologicky (core biopsií) diagnostikovaný karcinom prsu; pacientka v době do 90 dní před první biopsií neužívala hormonální léky a nepožívala sojové potraviny ani lněná semena; v době 3 dnů před první biopsií neužívala antibiotika; nemá známou alergii na lněné semeno, laktózu, pšenici ani na určité druhy koření; při core biopsii jí byl odebrán dostatečný vzorek tkáně k posouzení biomarkerů. Přihlásilo se 65 postmenopauzálních pacientek, avšak po výchozí biopsii jich 18 nesplňovalo kritéria pro zařazení, protože jejich původní nádor byl vyhodnocen jako benigní. Dalších 15 účastnic odstoupilo kvůli problémům s konzumací objemného muffinu, obtížím s cestováním do zdravotnického zařízení, depresím z nedávné diagnózy rakoviny prsu nebo nedostatku času. Nakonec tedy bylo zařazeno 32 pacientek, které do této randomizované studie předoperační stravovací intervence nastoupily a absolvovaly ji. Charakteristika pacientek je shrnuta v tab. 1. V žádné z proměnných při nástupu (baseline) nebyly významné rozdíly.

Tab. 1. Charakteristika pacientek a doba léčby

	Placebo	Lněné
semeno		
Věk, roky (rozsah)		
Hmotnost, kg (rozsah)		
Doba léčby, dny (rozsah)		
Typ nádoru (%)		
dukální		
loburální		
smíšený		
Histologický stupeň (%)		
3		
2		
1		
ER+ a PR+ (%)		
ER– nebo PR– (%)		

Pozn.: Mezi oběma skupinami nebyly testem χ^2 zjištěny žádné významné rozdíly.

V době mezi první biopsií a chirurgickým výkonem byly pacientky randomizovány do skupiny s léčivem nebo s placebem. Pacientky nebyly stratifikovány, z hlediska node-pozitivity resp. negativity však byly obě skupiny vyvážené. Interval mezi první core biopsií a konečnou chirurgickou excizí nádoru nebyl protokolem studie předepsán, nýbrž byl určen standardním léčebným postupem zavedeným v naší instituci. Pacientky v léčené skupině (n = 19) konzumovaly v rámci své běžné stravy denně jeden muffin obsahující 25 g lněných semen. Pacientky v kontrolní skupině (s placebem) (n = 13) konzumovaly stejný typ muffinu, ovšem bez lněných semen. Aby se zachoval dvojitě zaslepený status studie, byly muffiny zabaleny do neprůsvitného obalu, takže různé muffiny nebylo možno vizuálně rozlišit. Před předáním pracovníkovi z výzkumné skupiny byly balíčky s muffiny označeny číselným kódem. Pracovník výzkumné skupiny obdržel seznam, podle kterého pak kódované balíčky rozdal účastnicím studie. Ani on, ani pacientky tedy nevěděly, které muffiny kdo dostává. Všechny pacientky byly poučeny o stravovacích zásadách, tak aby jim muffin, ať již s lněnými semeny nebo bez nich, nepřivodil zvýšený příjem kalorií nebo nárůst tělesné hmotnosti.

Tkáň z core biopsie provedené v rámci diagnostiky a při operaci byla analyzována z hlediska proliferace buněk (proliferací index Ki-67), apoptózy, exprese c-erbB2 a exprese ER a progesteronového receptoru (PR). Před léčbou a před jejím ukončením byly odebrány 24hodinové vzorky moči ke stanovení lignanů a 3denní záznamy o stravě k posouzení příjmu živin.

Studii schválila Human Subjects Ethics Committee při University of Toronto a Toronto Hospital Human Experimentation Committee. Všechny pacientky poskytly před nástupem písemný informovaný souhlas.

Muffiny. Muffiny pro studii vyrobila běžným postupem společnost Canada Bread Co. (Toronto, ON, Kanada). Muffiny měly podobné složení; muffiny s lněnými semeny byly připraveny z 20,7 g bílé pšeničné mouky, placebové muffiny z 20,7 g celozrnné pšeničné mouky. Množství přidávaných mletých lněných semen činilo 25 g. Celozrnná pšeničná mouka místo bílé pšeničné mouky byla u placebových muffinů použita proto, aby se zvýšil obsah vlákniny a přiblížil se v tomto ohledu muffinům s lněnými semeny. Receptura zajišťovala u všech muffinů stejnou kalorickou hodnotu a ekvivalentní obsah tuků, bílkovin a vlákniny. Za tímto účelem byl k placebovým muffinům přidáván v množství 10 g řepkový olej. K lepšímu zachování zaslepenosti byly muffiny ochuceny muškátovým oříškem, skořicí a vanilkovým výtažkem. Všechna lněná semena pocházela z jednoho zdroje (Omega Products, Melfort, Saskatchewan, Kanada) a z jedné šarže a obsahovala v jednom gramu 2 mg sekoisolariciresinol-diglukosidu. Pacientky uchovávaly svůj týdenní příděl muffinů při teplotě -20 °C a podle potřeby je rozmrazovaly. Konzumovaly k snídani denně jeden muffin. Pokud některý muffin nebyl nebo nedoedly, byly zbytky vráceny a zváženy. Denní příjem lněných semen byl odhadnut jako 25 g krát počet dní léčby minus nesnědený podíl.

Imunohistochemická analýza nádorů. Ke stanovení Ki-67, c-erbB2, ER a PR byly imunohistochemicky obarveny 5µm řezy tkáně fixované formalinem a zalité do parafinu (33, 34). Stručně řečeno bylo na řezy působeno 3% vodným roztokem H₂O₂ a poté byly vzorky zpracovány v mikrovlnné troubě s citrátovým pufrům 10 mmol/l (pH 6,0). Primární protilátky (Dako, Mississauga, Ontario, Kanada) byly zředěny ředícím pufrům firmy Dako v těchto poměrech: Ki 67 (MIB-1) 1:100, c-erbB2 (králičí protilátek) 1:500, ER (ID5) 1:100 a PR (PgR 636) 1:100. Řezy s protilátkou byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C a pak na ně bylo působeno soupravou Dako se značeným systémem streptavidin-biotin (Universal LSAB 2 Kit) a AEC+ substrát-chromogenem (Dako) se světlým kontrastním barvením hematoxylinem. Pro testy apoptózy byl použit postup in situ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling za použití soupravy ApopTag Detection Kit (Intergen, Purchase, NY) podle protokolu výrobce. Stručně řečeno, řezy byly nejprve zpracovány proteínázou K (20 µg/ml) a potom po dobu 1 hodiny inkubovány při teplotě 37 °C v reakční směsi obsahující terminální transferázu a digoxigenin dUTP, po čemž následovala po dobu 30 minut protilátka proti digoxigeninu spojená s křenuvou peroxidázou. K detekci imunoreaktivity byl použit diaminobenzidin, s kontrastním barvením methylovou zelení.

U každé barvicí šarže byla použita pozitivní i negativní (ředící pufr) kontrola. Řezy od každé pacientky před léčbou a po ní byly obarveny ve stejnou dobu. Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem při 400 (sic.) a bylo počítáno minimálně 1000 buněk z 5 až 10 náhodně vybraných polí. Vzorky byly pro pracovníka zaslepeny, pokud jde o skupinu a dobu (před/po léčbě). Proliferační index Ki-67 a apoptotický index byly vypočítány jako procentický podíl pozitivních buněk ze všech počítaných buněk. K hodnocení exprese c-erbB2, ER a PR bylo použito H-skóre. Intenzita zbarvení byla hodnocena na stupnici negativní (0), slabá (1), střední (2) a silná (3), násobeno počtem buněk dané intenzity. Skóre bylo vypočítáno jako: [(1 x počet buněk + 2 x počet buněk + 3 x počet buněk) / celkový počet buněk] (34, 41). Skórovací systém, kde se násobí podíl pozitivních buněk a intenzita zbarvení, poskytuje smysluplnější změny vyvolané léčbou než intenzita samotná.

Záznamy o stravě a analýza lignanů v moči. Příjem lněných semen byl zaznamenáván denně. Ve výchozím stavu a před operací pořídily pacientky tři záznamy o stravě – za 2 pracovní dny a 1 víkendový den; ty pak byly hodnoceny z hlediska příjmu kalorií a makronutrientů podle kondenzovaného Canadian Nutrient File (42). Lignany v moči byly analyzovány kombinací plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie, jak naše skupina popsala dříve (7, 43).

Statistická analýza. Hodnocené subjekty byly náhodně rozřazeny do skupin se lněnými semeny nebo placebem pomocí metody náhodné permutace. Studie byla uspořádána tak, aby detekovala minimálně 20% změnu ve specifických před- a poléčebných větvích a 30% rozdíl mezi oběma léčebnými skupinami v procentické změně biologických markerů, konkrétně indexu Ki-67 jako primárního hodnoceného parametru. Cílem tedy bylo získat alespoň 10 až 15 pacientek v každé skupině, aby se dosáhlo síly 80 % pro oboustranný test s α -hodnotou 0,05.

Rozdíl mezi oběma léčebnými větvemi ve výchozím stavu (před léčbou) byly posuzovány pomocí Mann-Whitneyho testu. Změny jednotlivých biologických proměnných před léčbou a po ní v jednotlivých léčebných větvích byly analyzovány Wilcoxonovým párovým (signed rank) testem, jenž bere v úvahu jak velikost, tak směr (nárůst či pokles) pozorovaných změn. U každé pacientky v každé skupině byla vypočítána procentická změna hodnoty každého

biologického markeru a porovnána Mann-Whitneyho testem. Ke stanovení vztahů mezi párovými proměnnými, jako jsou biomarkery versus demografické charakteristiky nebo délka léčby, byl použit Spearmanův korelační koeficient. Všechny statistické testy významnosti ($P < 0,05$) byly dvoustranné. Statistické analýzy byly provedeny za použití SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

Výsledky

Kompliance příjmu muffinů byla dobrá (95,4 % ve skupině s placebem a 92,5 % ve skupině s lněnými semeny) a mezi oběma skupinami se významně nelišila. To se promítlo do významného nárůstu (1 300 %, $P < 0,01$) průměrné hodnoty lignanů v moči ve skupině s lněnými semeny, nikoli však ve skupině s placebem (tab. 2). Jedinými hlášenými nežádoucími účinky byla plnost břicha a zvýšený pohyb střev. Ani mezi léčebnými skupinami, ani mezi obdobími před léčbou a po ní nebyly zjištěny významné rozdíly v příjmu kalorií nebo makronutrientů (údaje nejsou znázorněny). Průměrná doba léčby ve skupině s lněnými semeny byla 32 dní (medián 30 dní) a ve skupině s placebem 39 dní (medián 37 dní) (tab. 1).

Výsledky biologických markerů měřených ve vzorcích nádorů před léčbou a po ní jsou shrnuty v tab. 2 a na obr. 2. Ve výchozích (baseline) hodnotách nebyly u žádného markeru zjištěny mezi oběma skupinami významné rozdíly.

Tab. 2. Vliv lněných semen na vylučování lignanů močí a na biomarkery karcinomu prsu

	Placebo		Lněné semeno	
	před	po	před	po
Medián				
Průměr				
Skóre				

Zkratky: před = před léčbou, po = po léčbě; ER = estrogenový receptor; PR = progesteronový receptor.

* $P < 0,01$ po léčbě versus před léčbou Wilcoxonovým párovým (signed rank) testem (podrobnosti na obr. 2).

Po skončení léčby byl v obou skupinách zjištěn pokles proliferace nádorových buněk a exprese c-erbB2 a nárůst buněčné apoptózy, ovšem ve skupině s lněnými semeny byly tyto změny zjištěny u většího podílu pacientek (74–84 %) než ve skupině s placebem (54–61 %). Ve skupině s lněnými semeny proliferace nádorových buněk (index Ki-67; obr. 2A) významně poklesla o 34,2 % (medián), apoptotický index (obr. 2B) významně vzrostl až o 30,7 % (medián), exprese c-erbB2 (obr. 2C) významně poklesla o 71,0 % (medián), zatímco ve skupině s placebem tyto změny pozorovány nebyly. V žádné ze skupin nebyly při porovnání doby po léčbě s dobou před léčbou pozorovány významné změny ER nebo PR hladin.

Porovnání obou skupin z hlediska procentických změn před léčbou a po ní u jednotlivých subjektů hodnocení je ilustrováno na obr. 3. Procento změn vylučování lignanů s močí (obr. 3A), apoptotického indexu (obr. 3C) a skóre cerB2 (obr. 3D) bylo ve skupině s lněnými semeny významně vyšší ($P < 0,05$) než ve skupině s placebem.

Také procentická změna indexu Ki-67 (obr. 3B) byla ve skupině s lněnými semeny vyšší než ve skupině s placebem, rozdíl však nedosahoval statistické významnosti. V procentické změně hladin ER a PR nebyly mezi oběma skupinami zjištěny významné rozdíly (obr. 3E a F).

Celkový příjem lněných semen koreloval významně se změnami skóre c-erbB2 ($r = -0,373$; $P = 0,036$) a apoptotického indexu ($r = 0,495$; $P < 0,004$), nikoli však se změnami proliferačního indexu Ki-67, hodnoty ER nebo PR. Žádný významný vztah nebyl zjištěn mezi věkem a tělesnou hmotností pacientky, výchozími (baseline) charakteristikami nádoru, jako je jeho stupeň, a stavem ER nebo PR, a změnami pozorovanými v průběhu léčby (údaje nejsou znázorněny).

Diskuse

Naše studie ukazuje, že denní příjem 25 g lněných semen dokáže u lidských buněk rakoviny prsu významně snížit proliferaci buněk, zvýšit apoptózu a ovlivnit signalizaci buněk snížením exprese c-erbB2. Procentický pokles exprese nádorového c-erbB2 a procentický nárůst buněčné apoptózy neměly vztah k výchozím charakteristikám nádoru, tj. věku a tělesné hmotnosti pacientky, stupni nádoru, statusu ER a PR, významně však korelovaly s celkovým množstvím zkonsumovaných lněných semen. Pokles proliferace buněk a exprese c-erbB2 a nárůst apoptózy byly sice zjištěny i u některých pacientek ve skupině s placebem, tyto změny však byly malé a nevýznamné. Lze je připsat dalším fytochemikáliím, jako jsou antioxidanty, kyselina fytová, fytoosteroly, minerály a vitamíny v celozrnné mouce placebových muffinů, u nichž byl zjištěn vztah s poklesem rizika rakoviny (44).

Expresa c-erbB2 (HER2) se pojí s agresivnějšími fenotypy rakoviny prsu a vyšší možností tvorby metastáz (45–47). Hraje také úlohu při diferenciaci, adhezi a motilitě buněk (48, 49). V nedávných studiích byla prokázána negativní korelace mezi expresí HER1/2 a odezvou na antiestrogenickou léčbu, nikoli však na léčbu inhibitorem aromatázy (39). Z našich výsledků lze tedy vyvodit, že příjem lněných semen může zpomalit progresi preinvazivní nebo invazivní rakoviny prsu změnou fenotypu rakovinných buněk na méně agresivní formu. Změny způsobené lněnými semeny vykazovaly také další endokrinní látky, jako je tamoxifen (37, 40, 50), faslodex (51), raloxifen (41) nebo inhibitory aromatázy vorozol (52), letrozol (37, 38, 40) a anastrozol (38). V jedné nedávné studii bylo zjištěno, že velikost poklesu

indexu Ki-67 lze při léčbě rakoviny prsu brát jako náhradní end-pointový biomarker účinnosti endokrinních látek a že účinnost léčby rakoviny prsu endokrinními přípravky závisí na úspěšném vyvolání blokování proliferace buněk (40). To je základem četných současných hodnocení nových endokrinních přípravků a inhibitorů buněčné signalizace v předoperačních situacích.

Výsledky většiny předchozích studií nejsou s předkládanou studií porovnatelné, protože doba léčby v neoadjuvantních studiích bývá přinejmenším 12 týdnů. Ve studiích s kratší dobou léčby (tj. v předoperačních studiích) byl pokles proliferativního indexu Ki-67 vyvolaný tamoxifenem vyšší, než jaký byl dosažen se lněnými semeny v naší studii (50). Například při podobném experimentálním uspořádání vedla každodenní léčba 20 mg tamoxifenu po dobu (medián) 21 dní (rozsah 6-65 dní) k poklesu indexu Ki-67 o 46,4 % (50).

Proliferační index Ki-67 (%)

Apoptotický Index (%)

Skóre c-erbB2

Placebo Lněné semeno

Obr. 2. Individuální změny (A) proliferačního indexu Ki-67; (B) apoptotického indexu; (C) skóre c-erbB2 u pacientek po léčbě placebem neb lněnými semeny (Wilcoxonův párový test).

To je více, než 34,2% pokles zjištěný při léčbě dávkami 25 g lněných semen v naší studii. V jiné studii vedla 14denní léčba raloxifenem k poklesu indexu Ki-67 o 21 % (41). Lněná semena představují ovšem dobře snášenou intervenci stravou a nikoli lék s průvodními nežádoucími účinky. Jedinými nežádoucími účinky, které subjekty hodnocení hlásily, byla zvýšená plnost břicha a pohyby střev způsobené zvýšeným obsahem vlákniny ve lněných semenech. Jelikož u pacientek s nízkým příjmem vlákniny a chronickou zácpou může být zvýšený pohyb střev dokonce žádoucí, není třeba považovat tento účinek za nežádoucí, zejména v porovnání s nežádoucími účinky vyvolávanými léky na rakovinu prsu, jako jsou tamoxifen nebo inhibitory aromatázy (4). U ovariektomizovaných athymických myší krmených po dobu 21 dní 10% potravinářskými lněnými semeny nebyl pozorován žádný nežádoucí účinek na důležité orgány, včetně uteru (33) a kostí⁴, což ukazuje, že střední příjem lněných semen je relativně bezpečný.

Výsledky tohoto klinického hodnocení jsou v souladu s předchozími klinickými i předklinickými studiemi, které prokazují protinádorové účinky lněných semen u pacientů s rakovinou prostaty (53), potkanů, jimž byly podávány karcinogeny (32), athymických myší se zjištěnou ER-pozitivní (33) nebo ER-negativní rakovinou prsu (34, 35) a nádor nesoucích transgenických myší (54). Strava s 5 % nebo 10 % lněných semen používaná ve studiích se zvířaty odpovídá zhruba 25 až 30 gramům lněných semen podávaných pacientkám s rakovinou prsu nebo pacientům s rakovinou prostaty, v závislosti na zkonsumovaném množství ostatních potravin. Naše výsledky jsou také v souladu s epidemiologickými studiemi prokazujícími, že se vysoké úrovně příjmu lignanů (26), plazmatické hladiny nebo urinární exkrece savčích lignanů (23–25) nebo vysoké hladiny α -linolenové kyseliny v adipózních tkáních (28) pojí se sníženým rizikem rakoviny prsu.

Mechanismy ochranného účinku lignanů vůči druhům rakoviny spojenými s hormony nejsou dosud zcela objasněny. V předchozích studiích se autoři zaměřovali na schopnost lignanů antagonizovat metabolismus a působení estrogenu (9–11, 55, 56). V našich předchozích studiích jsme prokázali, že denní příjem 25 g lněných semen u postmenopauzálních žen zvyšuje hladinu 2/16 α OHE1 v moči, což poukazuje na pokles estrogenických a potenciálně karcinogenních účinků (56). Byla vyslovena domněnka, že lignany působí jako antiestrogeny tím, že soupeří s estradiolem o vazbu na ER. Je prokázáno, že savčí lignan enterolakton inhibuje aktivitu aromatázy (9–11), což vede k poklesu syntézy endogenního estrogenu.

Účinek lněných semen u pacientek s ER-pozitivním nádorem lze částečně připsat vysoké koncentraci lignanů kyseliny α -linolenové v těchto semenech (32) a jejich účinku na metabolismus estrogenu. Pokles proliferace buněk a nárůst apoptózy však byl pozorován i u ER-negativních nádorů, což ukazuje, že lněná semena mohou na nádor působit jak endokrinními, tak neendokrinními mechanismy. Hormonálně nezávislé účinky lněných semen mohou být důsledkem antioxidantních a antiangiogenních vlastností jejich lignanů nebo mohou být způsobeny jinými mechanismy. Enterodiol a enterolakton i jejich prekurzory sekoisolaricresinol-diglukosid a hydroxymatairesinol mají schopnost vylučovat hydroxylové radikály (18–20). Jsou-li například mladým potkanům krátkodobě podávána lněná semena nebo sekoisolaricresinol-diglukosid, projevuje se u nich mírný účinek na hepatický endogenní antioxidantní status (21).

⁴K. Power, N. Saarinen, J. M. Chen, W.E. Ward, L.U.Thompson: nepublikované údaje.

Vylučování lignanů		Index Ki-67	
Změna	Změna	Změna	Změna
Placebo	Ln. semena	Placebo	Ln. semena
Apoptotický index		Skóre C-erbB2	
Změna	Změna	Změna	Změna
Placebo	Ln. semena	Placebo	Ln. semena
Estrogenový receptor		Progesteronový receptor	
Změna	Změna	Změna	Změna
Placebo	Ln. semena	Placebo	Ln. semena

Obr. 3. Medián procentických změn vylučování lignanů močí a biomarkerů v období před léčbou a po ní ve skupině s placebem a s lněnými semeny. A = lignan v moči, B = proliferační index Ki-67, C = apoptotický index, D = skóre c-erbB2, E = index estrogenového receptoru, F = index progesteronového receptoru. *, P < 0,05 versus placebo podle Mann-Whitneyho testu.

Antiangiogenní účinky lněných semen potvrzují četné předklinické studie. Pozorovali jsme například pokles růstu lidského nádoru, metastáz a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru u athymických myší krmených lněnými semeny (33–35). Savčí lignan enterolakton také snižuje proliferaci endoteliálních buněk *in vitro* (22) a inhibuje aromatázu (9–11).

Neendokrinní účinek lněných semen na nádorové buňky může také zahrnovat inhibici cest růstového faktoru. Vedle zjištění, že lněná semena snižují expresi nádorového c-erbB2 (naše studie) a v mléčných žlázách potkanů (57), jsme dříve zjistili, že u potkanů, na něž bylo působeno karcinogeny, snižují tato semena významně plazmatickou hladinu inzulínu-podobného růstového faktoru 1 (58) a u athymických myší, jimž byly injikovány ER-negativní buňky rakoviny prsu, hladiny nádorového inzulínu-podobného růstového faktoru 1 a receptoru epidermálního růstového faktoru (34).

Další možný antitumorigenní účinek lněných semen má vztah k α -linolenové kyselině, což je mastná kyselina n-3. Bylo zjištěno, že ekvivalentní množství oleje bohatého na α -linolenovou kyselinu v 5 % lněných semen snižuje u potkanů, na něž bylo působeno karcinogeny, růst vzniklých nádorů (32), možná přispěním k antiangiogenním účinkům lněných semen (59–61) nebo jinými protinádorovými mechanismy, jako jsou účinky na humorální a buňkami zprostředkovanou imunitu, pozměněním míst vazujících růstový faktor a tvorba cytotoxických lipidických peroxidačních produktů (62).

Dříve byla vyslovena domněnka, že lněná semena mohou narušovat antiestrogenní účinky tamoxifenu v důsledku endokrinních vlastností (33). Naše studie athymických myší se vzniklým ER-pozitivním lidským nádorem prsu (MCF-7) však prokázaly, že při krátkodobém působení lněná semena zvyšují účinnost tamoxifenu při snižování růstu nádoru, a to za přítomnosti jak vysokých, tak nízkých hladin estrogenu (33). *In vitro* studie také prokázaly, že kroky zúčastněné na metastáze rakoviny, tj. invazivita a adhezivita lidských nádorových buněk, se účinkem lignanů v kombinaci s tamoxifenem snižují ve větší míře, než každou z těchto látek samotnou (63).

Naše studie je malá, takže než bude možno s konečnou platností tvrdit, že lněná semena mají schopnost omezovat růst a invazivnost rakoviny prsu, bude třeba výsledky potvrdit na větším počtu pacientek a za použití delší doby léčby. Díky tomu, že jsou výborně tolerována, jsou lněná semena obzvláště atraktivní pro studie prevence rakoviny prsu, kde bude možno nabídnout zdravým ženám dobře snášenou intervenci pro dlouhodobé užívání. V budoucnu bude také třeba se zabývat interakcemi lněných semen a jejich lignanových a olejových složek s dalšími hormonálně aktivními látkami. Pokud se bude léčebný přínos zjištěn v rámci této studie udržovat dlouhodobě, mohou se levná a snadno dostupná lněná semena stát potravinovou alternativou nebo doplňkem současných léčiv proti rakovině prsu.

Poděkování

Děkujeme L. Orchesonovi, F. Cheungovi a M. Chenovi za technickou pomoc, společnosti Omega Products, Ltd., za lněná semena; společnosti Canada Bread, Co., za výrobu muffinů a všem lékařům, výzkumným pracovníkům i pacientkám, kteří se studie zúčastnili.

Literatura

1. Rose DP. Diet, hormones and cancer. *Annu Rev Public Health* 1993;14:1 - 17.
2. Clemons M, Goss PE. Mechanisms of disease: estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:276-85.
3. Adlercreutz H. Western diet and Western disease: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:3-23.
4. Clemons M, Danson S, Howell A. Tamoxifen (Nolvadex): a review. *Cancer Treat Rev* 2002;28:165-80.
5. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;348:2431-42.
6. Thompson LU. Analysis and bioavailability of lignans. In Thompson LU, Cunnane SC, editors. *Flaxseed in human nutrition*, 2nd ed. Champaign: AOCS Press; 2003, p. 92-116.
7. Nesbitt PD, Lam Y, Thompson LU. Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. *Am J Clin Nutr* 1999;69:549-55.
8. Sathyamoorthy N, Wang TTY, Phang TM. Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. *Cancer Res* 1994;54:957-61.
9. Adlercreutz H, Bannwart K, Wahala T, et al. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;44:147-53.
10. Wang C, Makela T, Hase T, Adlercreutz H, Kurzer MS. Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;50:205-12.
11. Brooks JD, Thompson LU. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. In press 2005.
12. Garreau B, Vallette G, Adlercreutz H, et al. Phytoestrogens: new ligands for rat and human α -fetoprotein. *Biochem Biophys Acta* 1991;1094:339-45.
13. Mousavi Y, Adlercreutz H. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:615 - 9.
14. Welshons WV, Murphy CS, Koch R, Calaf G, Jordan VC. Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast Cancer Res Treat* 1987;10: 169 - 75.
15. Wang C, Kurzer MS. Effect of phytoestrogens on DNA synthesis in MCF-7 cells in the presence of estradiol or growth factors. *Nutr Cancer* 1998;31: 90-100.
16. Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, et al. Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:331-7.
17. Saarinen NM, Warri A, Makela SI, et al. Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*). *Nutr Cancer* 2000;36:207-16.
18. Kitts DD, Yuan YV, Wijewickreme, Thompson LU. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol Cell Biochem* 1999;202:91-100.
19. Prasad K. Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flaxseed. *Mol Cell Biochem* 1997;168:117-23.
20. Kangas L, Saarinen N, Mutanen M, et al. Antioxidant and antitumor effects of hydroxymatairesinol (HM-3000, HMR), a lignan isolated from the knots of spruce. *Eur J Cancer Prev* 2002;11:S48-57.
21. Yuan YV, Rickard SE, Thompson LU. Short term feeding of flaxseed or its lignan has minor influence on in vivo hepatic antioxidant status in young rats. *Nutr Res* 1999;19:1233-43.
22. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci US A* 1993;90:2690-4.
23. Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D. Case-control study of phyto-estrogens and breast cancer. *Lancet* 1997;350:990-4.
24. Dai Q, Franke AA, Jin F, et al. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:815-21.
25. Pietinen P, Stumpf K, Mannisto S, Kataja V, Uusitupa M, Adlercreutz H. Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in eastern Finland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10: 339-44.
26. McCann SE, Moysich KB, Freudenheim JL, Ambrosone CB, Shields PG. The risk of breast cancer associated with dietary lignans differs by CYP17 genotype in women. *J Nutr* 2002;132:3036-41.
27. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer* 1991;16:43- 52.
28. Bougnoux P, Chajes V. α -linolenic acid and cancer. In Thompson LU, Cunnane SC, editors. *Flaxseed in human nutrition*, 2nd ed. Champaign: AOCS Press; 2003. p. 232-44.
29. Serraino M, Thompson LU. The effect of flaxseed supplementation on early risk markers for mammary carcinogenesis. *Cancer Lett* 1991;60:135- 42.
30. Serraino M, Thompson LU. The effect of flaxseed supplementation on the initiation and promotional stages of mammary tumorigenesis. *Nutr Cancer* 1992; 17:153 - 9.
31. Rickard SE, Yuan YV, Chen J, Thompson LU. Dose effects of flaxseed and its lignan on methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Nutr Cancer* 1999;35:50-7.
32. Thompson LU, Rickard S, Orcheson L, Seidl MM. Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:1373-6.
33. Chen J, Hui E, Yip T, Thompson LU. Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) in nude mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7703 - 11.
34. Chen J, Stavro M, Thompson LU. Dietary flaxseed inhibits breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor. *Nutr Cancer* 2002;43:187-92.
35. Dabrosin C, Chen J, Wang L, Thompson LU. Flaxseed inhibits metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts. *Cancer Lett* 2002;186:31-7.
36. Thompson LU, Seidl M, Rickard S, Orcheson LJ, Fong HH. Antitumorigenic effect of mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr Cancer* 1996;26: 159 - 65.
37. Miller WR, Dixon JM, Macfarlane L, Cameron D, Anderson TJ. Pathological features of breast cancer response following neoadjuvant treatment with either letrozole or tamoxifen. *Eur J Cancer* 2003;39:462- 8.
38. Miller WR, Dixon JM, Cameron DA, Anderson TJ. Biological and clinical effects of aromatase inhibitors in neoadjuvant therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;79:103-7.
39. Ellis MJ, Rosen E, Dressman J, Marks J. Neoadjuvant comparisons of aromatase inhibitors and tamoxifen: pre-treatment determinants of response and on-treatment effect. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86: 301-7.
40. Ellis MJ, Coop A, Singh B, et al. Letrozole inhibits tumor proliferation more effectively than tamoxifen independent of HER1/2 expression status. *Cancer Res* 2003;53:6523-31.

41. Dowsett M, Bundred NJ, Decensi A, et al. Effect of raloxifene on breast cancer cell Ki67 and apoptosis: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial in postmenopausal patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:961-6.
42. Health and Welfare Canada. Nutrient value of some common foods. Ottawa, Canada: Supply and Services; 1991.
43. Rickard SR, Orcheson LJ, Seidl MM, Luyengi L, Fong HH, Thompson LU. Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside from flaxseed. *J Nutr* 1996;126:2012-9.
44. Slavin J. Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2003;62:129-34.
45. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erb B-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 1991;63:434-8.
46. Tan M, Yao J, Yu D. Overexpression of the c-erbB2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res* 1997;57:1199-205.
47. DiGiovanna MP, Carter D, Fly SD, Stern DF. Functional assay for HER-2/neu demonstrates active signaling in a minority of HER-2/overexpressing invasive human breast tumors. *Br J Cancer* 1996;74:802-6.
48. De Potter CR, Schelfhout AM. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Arch* 1995;426:107-15.
49. Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol* 1999;12:827-34.
50. Clarke RB, Laidlaw IJ, Jones LJ, Howell A, Anderson E. Effect of tamoxifen on Ki67 labeling index in human breast tumors and its relationship to oestrogen and progesterone receptor status. *Br J Cancer* 1993;67:606-11.
51. Robertson JF, Nicholson RI, Bundred NJ, et al. Comparison of the short-term biological effects of 7 α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfanyl)-nonyl] estradiol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:6739-46.
52. Harper-Wynne CL, Sacks NP, Shenton K, et al. Comparison of the systemic and intratumoral effects of tamoxifen and the aromatase inhibitor vorozole in postmenopausal patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1026-35.
53. Demark-Wahnefried W, Price DT, Polascik TJ, et al. Pilot study of dietary fat restriction and flaxseed supplementation in men with prostate cancer before surgery: exploring the effects on hormonal levels, prostate-specific antigen, and histopathologic features. *Urology* 2001;58:47-52.
54. Lin X, Gingrich JR, Li J, Haroon ZA, Demark-Wahnefried W. Effect of flaxseed supplementation on the development of prostatic neoplasia and metastasis in transgenic (TRAMP) mice. *J Nutr* 2001;131:3136-7S.
55. Bradlow H. 2-hydroxyestrone: the "good" estrogen. *J Endocrinol* 1996;150:S259-65.
56. Brooks JD, Ward WE, Lewis JE, et al. Diet supplemented with flaxseed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than with an equal amount of soy. *Am J Clin Nutr* 2004;79:318-25.
57. Tan KP, Chen J, Ward WE, Thompson LU. Mammary gland morphogenesis is enhanced by exposure to flaxseed or its major lignan during suckling in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:147-57.
58. Rickard SR, Yuan YV, Thompson LU. Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer Lett* 2000; 161:47-55.
59. Rose DP, Connolly JM. Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr Cancer* 2000;37:119-27.
60. Rose DP, Connolly JM, Yayburn J, Coleman M. Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1995;87: 587-92.
61. Natarajan R, Nadler J. Roles of lipoxygenase in breast cancer. *Front Biosci* 1998;8:E81-8.
62. Rose DP. Dietary fatty acids and prevention of hormone responsive cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:224-33.
63. Chen J, Thompson LU. Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:163-70.

Výživa a rakovina

Mechanismy působení a antiproliferativní vlastnosti šťávy zeleniny druhu *Brassica oleracea* v buněčných liniích lidské rakoviny prsu^{1,2}

Giorgio Brandi^{†‡3}, Giuditta F. Schiavano[†], Nadia Zaffaroni[‡], Cinzia De Marco[‡], Mirko Paiardini^{***}, Barbara Cervasi^{**} a Mauro Magnani^{†***}

**Institut hygieny, †Centrum biotechnologie, **Institut biochemie "G. Fornaini", Università di Urbino, 61029 Urbino, Itálie, a ‡Ústav experimentální onkologie, jednotka 10, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Miláno, Itálie*

ABSTRAKT Brukvovitá zelenina je důležitým zdrojem sloučenin, jež mohou hrát významnou úlohu při chemoprevenci. V této studii jsme vyhodnocovali antiproliferativní účinky šťávy řady odrůd *Brassica oleracea* na estrogen-receptor (ER)-pozitivní (ER+; MCF-7 a BT474) i ER-negativní (ER-; MDA-MB-231 a BT20) buněčné linie lidské rakoviny prsu. Účinek šťávy na buněčnou proliferaci byl vyhodnocován na syntéze DNA a na proteinech spojených s buněčným cyklem. Šťáva výrazně snižovala syntézu DNA, hodnocenou pomocí inkorporace [3H]thymidinu, počínaje od nízkých koncentrací (konečná koncentrace 5–15 ml/l), přičemž tato aktivita byla nezávislá na ER. Všechny zkoušené odrůdy květáku potlačovaly proliferaci buněk v míře závislé na koncentraci. Inhibice buněčného rozmnožování byla při vyšších koncentracích šťávy provázena významnou smrtí buněk, apoptóza však nebyla prokázána. Zajímavé je, že šťáva vykazovala preferenční aktivitu vůči buňkám rakoviny prsu v porovnání s ostatními zkoumanými savčími buněčnými liniemi (ECV304, VERO, Hep2, 3T3 a MCF-10A) ($P < 0,01$). Na molekulární úrovni se inhibice proliferace pojila s významně sníženou expresí CDK6 a zvýšenou hladinou p27 v ER+ buňkách, avšak nikoli v ER- buňkách, přičemž společnou vlastností u všech buněčných linií byla významně snížená fosforylace retinoblastomového proteinu. Z těchto závěrů lze vyvodit, že požitelná část brukve *Brassica oleracea* obsahuje látky, jež dokáží významně brzdit růst ER+ i ER- buněčných linií lidské rakoviny prsu, ovšem různými mechanismy. Tyto výsledky naznačují, že běžné druhy brukvovité zeleniny jsou potenciálními zdroji chemopreventivních látek. 135: 1503–1509, 2005.

KLÍČOVÁ SLOVA: • rakovina prsu • šťáva z brukvovité zeleniny • CDK6 • p27 • chemoprevence

V posledních letech si chemoprevence získala pozornost jako na prostředek k blokování zhoubné transformace v raných stadiích a postupu choroby v pozdějších stadiích. Bylo zjištěno, že mnoho potenciálně antikarcinogenních sloučenin je přítomno v ovoci a zelenině, zvláště v rostlinách rodu *Brassica* (brukev), například v květáku a brokolici (1–3). Tyto křížaté rostliny obsahují značné množství glukosinolátů (GLS)⁴, o jejichž hydrolytických produktech bylo zjištěno, že brání, brzdí nebo vyvolávají reverzi karcinogeneze vyvolané různými chemickými sloučeninami (4–6). V čerstvých rostlinách jsou GLS přítomny ve stabilní formě, kompartmentalizované na různých místech z endogenního enzymu myrosinázy; kdy jsou tkáně rozrušené, přichází myrosináza s GLS do styku a hydrolyzuje je na řadu rozkladných produktů, například isothiokyanáty (ITC; isothiokyanáty sulforafan, benzylisothiokyanát a propylisothiokyanát, fenethylisothiokyanáty), a indoly (3,3'-diindolylmethan, askorbagen, indol-3-karbinol, indol-3-benzylkarbazol) (7).

Mechanismus či mechanismy chemopreventivního účinku brukvovité zeleniny nejsou většinou zcela známy, byla ovšem předložena řada hypotéz, z nichž první předpokládá, že některé účinné látky v této zelenině vykazují ochranný účinek modulací aktivity enzymů metabolizujících drogy fáze II a fáze I. Zejména bylo prokázáno, že ITC a indol-3-karbinol indukují tzv. enzymy fáze II, (glutathion S-transferázu, chinon reduktázu, glukoronosyl transferázu), jež hrají významnou úlohu při detoxifikaci toxinů a karcinogenů (4,8–11) a inhibují enzymy fáze I, odpovědné za metabolickou aktivaci většiny chemických karcinogenů (10,12).

1 Částečně prezentováno na "40° Congresso Nazionale SItI," září 2002, Cernobbio, Itálie [Brandi, G., Cervasi, B., Amagliani, G., Schiavano, G. F., Sisti, M. a Paiardini, M. (2001) Valutazione dell'attività antiproliferativa di succo di Brassica Oleracea in cellule di tumore mammario umano. Panorama della Sanità. P07-P09 (abs.)].

2 Za podpory Banca di Credito Cooperativo di Fano and Fanoateneo.

3 Korespondenční autor. E-mail: brandi@uniurb.it.

4 Použité zkratky: CDK – cyklin-dependentní kináza, DMSO – dimethylsulfoxid, ER – estrogenový receptor, FCS – fetální telecí sérum, GLS – glukosinolát, I3C – indol-3-karbinol, IC50 – 50% inhibiční koncentrace, ITC – isothiokyanát, pRb – retinoblastomový protein

V poslední době byla k výkladu ochranného účinku spojeného s konzumací brukvovité zeleniny vůči rakovině prsu navržena řada dalších mechanismů, například interakce mezi agens obsaženými v této zelenině a estrogenovým metabolismem (nebo dráhami přenosu signálů) (13,14), navození apoptotické smrti buněk (15–18) nebo interference s regulačními proteiny buněčného cyklu (19–22). V předchozí práci (22) jsme prokázali, že tetramerní derivát (tetramer) indol-3-karbinolu (I3C), což je přírodní látka přítomná v brukvovité zelenině, dokáže inhibovat růst buněk rakoviny prsu. Tento účinek spočívá v tom, že indukuje jejich zádrž v G1 fázi buněčného cyklu v důsledku inhibice exprese a aktivity CDK6, zvýšení expresní úrovně p27 a snížení exprese a fosforylace retinoblastomového proteinu (pRb).

Většina dokladů antikarcinogenních účinků produktů hydrolýzy GLS pochází z experimentů na zvířatech, kde indoly a ITC redukuje četnost a multiplicitu experimentálně navozených nádorů (4, 6, 23–26). Naproti tomu u člověka je úloha konzumace brukvovité zeleniny v prevenci rakoviny stále nejasná (6). Řada epidemiologických studií poukazuje na pokles výskytu různých typů lidské rakoviny u osob konzumujících velká množství zeleniny bohaté na GLS, jako jsou brukvovité druhy (2,3,27–31), přičemž stupeň výsledné ochrany byl úměrný míře konzumace této zeleniny (6). V jiných kohortových studiích byla zjištěná spojitost mezi celkovým příjmem zeleniny nebo ovoce a kolorektálním karcinomem slabá nebo nebyla žádná (32–34). Účinek stravy bohaté na brukvovitou zeleninu na prevenci rakoviny se ovšem může lišit podle typu a místa karcinomu (24,35). Mimoto je spojitost mezi spotřebou brukvovité zeleniny a rakovinou prsu u člověka stále nejasná, protože zatímco některé studie prokázaly při konzumaci brukvovité zeleniny významný ochranný účinek, jiné naprosto žádnou takovou spojitost nezjistily (31, 36–40). V některých případech mohou být tyto rozpory důsledkem rozdílnosti použitých metod nebo hodnocených parametrů (41). Úloha přírodních sloučenin nacházejících se v brukvovité zelenině jako chemoprotektivních látek si tedy zaslouhuje další výzkum. Existuje sice celá řada studií antikarcinogenní aktivity indolů či ITCs nebo jiných samostatných komponent, ovšem studií prováděných s celou brukvovitou zeleninou je jen velmi málo. Nelze vyloučit, že díky možným interakcím mezi sloučeninami přítomnými v celistvé zelenině jsou chemopreventivní vlastnosti celé zeleniny z čeledi brukvovitých vůči rakovině účinnější, než jak je tomu u izolovaných složek.

V předkládané studii jsme zkoumali účinek a mechanismus působení šťávy z čerstvého celého květáku na růst a životaschopnost buněk lidské rakoviny prsu.

MATERIÁLY A METODY

Materiály. DMEM, inzulin, Hoechst 33342, a ethidiumbromid pocházely od firmy Sigma Chemical. Fetální telecí sérum (FCS) bylo získáno od firmy Mascia Brunelli. [³H]thymidin byl zakoupen od firmy NEN Life Science Products.

Příprava květákové šťávy. Čerstvé listy květáku byly získány v zimních a jarních měsících od místních pěstitelů. Plná šťáva byla připravena mechanickým rozmělněním listů s následnou homogenizací. Homogenizát byl po dobu 10 minut za teploty 4 °C odstředován při 8000 x g a supernatant byl dekantován, sterilizován filtrací na filtrech 0,22 μm a ihned použit ke zpracování.

Příprava suchých výtažků květákové šťávy. Čerstvé listy květáku byly omyty roztokem 0,4 mg/l chloru, opláchnuty sterilní vodou a dehydrovány při 40 °C při vzduchové ventilaci. Dále byly tyto listy nasekány nadrobno a zpracovány k extrakci ethanolem nebo vodou. Suché výtažky obsahovaly ≤ 5 % vody. Výtažek byl ze šťávy z listů získán sprejovým sušením (Model B-191-Buchi, Miláno) při vstupní teplotě 180 °C a výstupní teplotě 90 °C.

Kultivace buněk. Buněčné linie lidského adenokarcinomu prsu ER+ (MCF-7 a BT474) a ER- (MDA-MB-231 a BT 20) byly získány od Centro di Biotecnologie Avanzate. Buňky byly pěstovány v DMEM suplementovaném 10% FCS, 2 mmol/l L-glutaminu, 10 g/l neesenciálních aminokyselin, 50 mg/l streptomycinu, 1000 U/L penicilinu, s (MCF-7) nebo bez 10 mg/l inzulinu. VERO fibroblastoidní buňky ledvin afrického kočkodana zeleného, permanentní buňky ECV304, lidské epiteliální buňky Hep2, myší embryonální fibroblastické buňky 3T3 a netumorigenní lidské prsní buňky MCF-10A byly kultivovány na příslušných půdách suplementovaných 10 % FCS, 50 mg/l streptomycinu a 1000 U/l penicilinu. Všechny buněčné linie byly pěstovány ve formě monovrstev při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂. Experimenty byly provedeny s buňkami v logaritmické fázi růstu.

Inkorporace [³H]thymidinu. Buňky byly naočkovány v hustotě 30 000/jamku v 24jamkových kultivačních miskách a ponechány přes noc. Duplicitní vzorky množících se buněk byly po dobu 48 h (ECV304, VERO, Hep2 a 3T3) nebo 72 h (MCF-7, MDA-MB-231 a MCF-10A) vystaveny šťávě v koncentrační řadě od 0,5 do 60 ml/l. V průběhu posledních 4 hodin byly buňky pulzovány 111 MBq/l

[³H]thymidinu (962 Bq/mmol) a zpracovány podle Brandiho et al. (22). Výsledky byly vyjádřeny jako průměrná hodnota dpm vzorků, na něž bylo působeno šťávou, v porovnání s kontrolními vzorky.

Test na životaschopnost buněk. Buňky MCF-7 byly naočkovány v hustotě 6×10^5 buněk/60mm miskou a ponechány přes noc. Buňky byly vystaveny rostoucím koncentracím květákové šťávy a po 72 hodinách od zahájení zpracování byly všechny buňky (plovoucí i připojené buňky shromážděné trypsinizací) obarveny 0,4% trypanovou modří a spočítány na hematocytometru.

Hodnocení morfologie apoptických buněk. Buňky byly sebrány v různých intervalech od působení šťávou; plovoucí a přilnuvší buňky byly shromážděny zvlášť a apoptóza byla posouzena barvením buněk činidlem Hoechst 33342 (2 mg/l; Sigma) při teplotě 37 °C po dobu 15 minut a přibarvením ethidiumbromidem (5 mg/l) přidaným po dobu 5 min těsně před pozorováním. Po obarvení byly preparáty pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Procentický podíl buněk s apoptickou jadernou morfologií byl stanoven skórováním alespoň 300 buněk z každého vzorku.

Analýza obsahu DNA průtokovou cytometrií. Buňky byly naočkovány na plastové baňky 75 cm² a vystaveny rostoucím koncentracím šťávy. V různých intervalech (24, 48 a 72 h) od začátku působení šťávou byly buňky shromážděny a vzorky 1×10^6 buněk byly fixovány v 70% ethanolu, promyty PBS a po dobu 30 minut barveny při teplotě 4 °C roztokem obsahujícím 50 mg/l propidiumjodidu, 50 g/l RNAzy a 0,05 % NP40. Následně byly analyzovány na průtokovém cytometru FACScan (Becton Dickinson). Distribuce buněčného cyklu byla hodnocena na grafech DNA pomocí softwaru CellFit podle modelu SOBR (Becton Dickinson).

Měření aktivity caspase. Katalytická aktivita caspase byla stanovena u buněk vystavených po dobu 72 hodin květákové šťávě o koncentraci 10 ml/l pomocí soupravy Caspase-9/Mch6 Fluorometric Protease Assay Kit (MBL) a Caspase-3 Assay Kit (BD Biosciences, Pharmingen). Celkový protein a specifický fluorogenní substrát (Ieu-glu-hisasp-7-amino-4-trifluoromethylkumarin, LEHD-AFC, v případě caspase-9 a N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd-7-amino-4-methylkumarin, Ac-DEVD-AMC, v případě caspase-3) byly míseny při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. V testu na aktivitu caspase-3 byla negativní kontrola získána inkubací každého vzorku za přítomnosti inhibitoru Ac-DEVD-CHO. Hydrolýza substrátů pro caspase-9 a caspase-3 byla monitorována spektrofluorometricky při vlnové délce 505 resp. 440 nm.

Analýza Western blot. Expresí CDK6, p27^{kip1} a proteinu pRb byla hodnocena analýzou Western blot. Jak neexponované vzorky, tak vzorky vystavené působení šťávy byly lyzovány na ledu po dobu 20 minut postupem podle Brandiho et al. (22). Z celkových extrahovaných proteinů bylo 25 μg frakcionováno na SDS-PAGE, elektricky přeneseno na nitrocelulózoové membrány a inkubováno s protilátkami proti CDK6 (1:200), p27^{kip1} (1:500) a pRb (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Proteiny detekované s činidly se zvýšenou chemiluminiscencí byly stanoveny na přístroji ChemiDoc (Bio-Rad). K potvrzení rovné proteinové zátěže byl použit aktin.

Izolace a hybridizace RNA a makroarray analýza dat. Genová exprese byla analyzována za použití komerčně dostupného array zařízení pro nukleové kyseliny PanoramaTM Human Apoptosis Gene Array (Sigma Genosys), sestávajícího ze 198 různých lidských genů souvisejících s apoptózou. Všechna RNA byla izolována reagentem Trizol LS z buněk MCF-7 zpracovaných nebo nezpracovaných květákovou šťávou. Potom byly připraveny komplexní sondy reverzní transkripcí za přítomnosti 740 kBq [α -³²P] dCTP, Neinkorporované nukleotidy byly odstraněny na rotační koloně s náplní Sephadex G-25.

Generovaná cDNA byla inkubována v hybridizačním roztoku a po dobu 10 minut denaturována při teplotě 95 °C. Membrána byla hybridizována přes noc a nakonec exponována fosforimageru. Výsledky byly normalizovány vydělením intenzity signálního genu průměrnou intenzitou signálů 5 housekeeping genů, které měly mezi jednotlivými vzorky poměrně stálou úroveň exprese.

Statistická analýza. Výsledky jsou uvedeny ve tvaru průměr \pm SEM z minimálně tří samostatných experimentů, z nichž každý byl proveden dvojnásobně. Data byla analyzována podle situace pomocí 1cestné nebo 2cestné ANOVA s následným Tukeyho post hoc testem. Rozdíly byly považovány za významné při $P < 0,05$.

VÝSLEDKY

Vliv květákové šťávy na proliferaci buněk. Květáková šťáva výrazně snižovala u buněk MCF-7 syntézu DNA (obr. 1A). Inhibice závisela na dávce; zhruba 50% inhibice buněčné proliferace bylo dosaženo při koncentraci 3,5 ml/l, více než 90% inhibice pak při koncentraci 25 ml/l. Šťáva aplikovaná po dobu 72 h v téže koncentraci jako v případě buněk MCF-7 inhibovala v závislosti na koncentraci růst ER- buněk (obr. 1B). K potvrzení těchto údajů jsme působení šťávy zopakovali i na dalších ER+ (BT20) i ER- (BT474) buněčných liniích lidské rakoviny prsu. Získané výsledky (zde neuvedené) byly podobné jako v obr. 1 a pořadí citlivosti vůči šťávou vyvolané inhibici inkorporace [³H]thymidinu,

sestavěné za použití hodnot 50% inhibiční koncentrace (IC_{50}), bylo následující: BT474 > MCF-7 = MDA-MB-231 > BT20 (BT474 vs. MCF-7, $P < 0,05$; MCF-7 vs. BT20, $P < 0,05$).

Zatímco u buněk rakoviny prsu MCF-7 byla inhibice syntézy DNA v závislosti na dávce zjevná, byl u dalších savčích buněčných linií pokles inkorporace [3H]thymidinu jen mírný ($P < 0,01$) (obr. 2).

OBR. 1 Syntéza DNA v buňkách rakoviny prsu MCF-7 (A) a MDA-MB-231 (B),

a na něž bylo po dobu 72 hodin působeno šťávou v uvedených koncentracích. V průběhu posledních 4 hodin působení byly buňky pulzovány [3H]thymidinem a byla stanovena jeho inkorporace do DNA. Hodnoty jsou uvedeny ve tvaru průměr \pm SEM, $n = 5$. Hodnoty bez společného písmena jsou různé, $P < 0,05$.

OBR. 2 Vliv šťávy květáku na syntézu DNA v různých

savčích buněčných liniích. Na buňky bylo působeno šťávou ve znázorněných koncentracích po dobu 48 hodin a dále byly zpracovány, jak je uvedeno v legendě k obr. 1.

Hodnota IC_{50} pro buňky MCF-7 činila ~ 5 ml/l, oproti hodnotám > 20 ml/l u ostatních buněčných linií. Hodnoty jsou ve tvaru průměr \pm SEM, $n = 3$. *Odlíšné od všech ostatních buněčných linií, $P < 0,01$.

U buněk MCF-7 činila hodnota IC_{50} 5,1 ml/l, oproti hodnotám u ostatních buněčných linií, kde dosahovala výše 44,3 (VERO), 19,8 (3T3), 29,6 (Hep2) a 25,5 (ECV304) ml/l. U netumorigenních lidských prsních buněk MCF-10A neměla expozice 15 μ l šťávy po dobu 72 h na inkorporaci [3H]thymidinu vliv ($89 \pm 4,5$ % kontroly), zatímco 30 μ l šťávy inkorporaci inhibovalo ($P < 0,05$) ($38,8 \pm 3,4$ % kontroly). Při této koncentraci byla ovšem inkorporace [3H]thymidinu do buněčných linií rakoviny prsu MCF-7 a MDAMB- 231 prakticky nulová (obr. 1). Výsledky tedy ukazují, že šťáva rostliny *Brassica oleracea* je potentním inhibitorem syntézy DNA v lidských buňkách rakoviny prsu. Také jsme prokázali, do různé míry jsou tyto antiproliferativní vlastnosti zachovány ve všech odrůdách této rostliny (obr. 3)

Působení šťávy květáku. Suché vodné nebo vodno-alkoholické extrakty šťávy květáku získané vymrazením měly znatelný ($P < 0,05$) vliv na syntézu DNA v buňkách MCF-7, přičemž tento vliv byl závislý na koncentraci (obr. 4A). Aktivita vodného extraktu uchovávaného v suchu byla po dobu 1 měsíce stálá (obr. 4B). Oproti tomu u buněk exponovaných poměrně vysokým koncentracím extraktu získaného sprejovým sušením nebyla pozorována žádná antiproliferativní aktivita, z čehož lze vyvodit, že tyto aktivní látky jsou labilní vůči zvýšeným teplotám.

OBR. 3 Syntéza DNA v buňkách MCF-7, na něž bylo po dobu

72 hodin působeno různými koncentracemi šťáv získaných z různých odrůd *Brassica oleracea*. Hodnoty jsou uvedeny ve tvaru průměr \pm SEM, $n = 3$. Hodnoty pro jednotlivé odrůdy bez společného písmene se liší, $P < 0,05$.

OBR. 4 Syntéza DNA v buňkách MCF-7, na něž bylo po dobu

72 h působeno zvyšovanými koncentracemi (A) vymrazeného extraktu bezprostředně po přípravě a (B) vymrazeného vodného extraktu uchovávaného po různou dobu za nízké teploty. Hodnoty jsou ve tvaru průměr \pm SEM; $n = 3$. Hodnoty pro extrakt (A) nebo pro stejnou dobu (B) bez společného písmene se liší, $P < 0,05$.

Působení na buněčný cyklus. K posouzení vlivu šťávy květáku na buněčný cyklus jsme použili koncentrace v rozmezí od 2,5 do 10 ml/l, které dokáží inhibovat inkorporaci [3H]thymidinu do DNA v buňkách MCF-7 z 10 – 71 % a v buňkách MDA-MB-231 z 22 – 91 %. Z průtokové cytometrických profilů jaderného obsahu DNA v buňkách ER+ a ER- vyplynulo, že u buněk MCF-7 šťáva buněčný cyklus nenarušuje a u buněk MDA-MB-231 byla po působení vyšší koncentrace šťávy (10 ml/l) zjištěna pouze mírná akumulace buněk v S-kompartmentu (tab. 1). Z těchto výsledků lze vyvodit, že přinejmenším při nízkých koncentracích potlačuje šťáva buněčný růst, aniž by vyvolávala specifické blokování buněčného cyklu. Když však byly ER+ a ER- buňky vystaveny vyšším koncentracím šťávy (> 20 ml/l), byl po 48 hodinách působení naakumulován v S a G_2/M fázích značný počet buněk. Souběžně s tím došlo k poklesu počtu buněk v G_0/G_1 fázi a nárůstu procentického obsahu debris (údaje zde nejsou znázorněny).

Cytostatické a cytotoxické účinky. K posouzení, zda k poklesu inkorporace [3H]thymidinu u buněk vystavených šťávě došlo v důsledku cytotoxického nebo cytostatického účinku, jsme vyhodnotili životaschopnost buněk MCF-7 po působení šťávy v lineárním rozmezí závislosti odezvy na dávce získaném v rámci testu antiproliferativního účinku (obr. 1). Působením šťávy došlo při nižších koncentracích ($\leq IC_{50}$) k dávkově závislé inhibici proliferace buněk ($P < 0,05$) bez poklesu životaschopnosti buněk, kdežto při koncentracích dokonce nad IC_{50} byl zjištěn proporcionální nárůst

procentického podílu nekrotických buněk (při koncentraci šťávy 20 ml/l až 25 %, $P < 0,05$), jak ukazuje pokles životaschopnosti a nárůst debris (**obr. 5**).

TAB. 1

Působení šťávy květáku na buněčné cykly ER-pozitivních (MCF-7) a ER-negativních (MDA-MB-231) buněčných linií^{1,2}

Šťáva, μ l	48 h				%	72 h			
	Debris	G _{0/1}	S	G ₂ M		Debris	G _{0/1}	S	G ₂ M
MCF-7									
0	5	57	34	9		8	59	32	9
2,5	18	58	32	10		19	59	29	12
5,0	32	59	31	10		25	63	25	13
10,0	42	60	29	11		38	54	25	11
MDA-MB-231									
0	7	50	31	19		12	55	30	15
2,5	12	51	29	20		15	58	28	14
5,0	17	45	33	22		20	52	29	19
10,0	30	35	45	20		34	38	40	22

¹ Údaje jsou vyjádřeny jako procentický podíl všech buněk a představují průměry dvojitých měření, jež se nelišily více než o 10 %.

² Pre-G_{0/1} peak apoptotických buněk byl u všech vzorků nedetekovatelný.

Jelikož průtokově cytometrické analýzy u buněk MCF-7 a MDA-MB-231 po působení šťávy v koncentracích, které dokáží snížit proliferaci buněk (≤ 10 ml/l), nepoukazovaly na přítomnost detekovatelné populace pre-G₁ apoptotických buněk (tab. 1), analyzovali jsme apoptózu; také jsme vyhodnocovali kondenzaci jaderného chromatinu a fragmentaci jader, což jsou obě běžné charakteristiky apoptotických buněk. Po 48 a 72 hodinách působení bylo na základě analýzy fluorescenčních jader zjištěno, že typické apoptotické vlastnosti vykazuje pouze velmi malý podíl (< 3 %) buněk exponovaných šťávě. Ani na molekulární úrovni nebyl zjištěn žádný doklad apoptózy vyvolané působením šťávy; expozicí buněk MDA-MB-231 šťávě květáku o koncentraci 10 ml/l po dobu 72 hodin se katalytická aktivita caspase-9 a caspase-3 v porovnání s kontrolními vzorky nijak nezvýšila (výsledky zde nejsou znázorněny). Podobně se u buněk MCF-7 nezvýšila aktivita caspase-9 (výsledky zde nejsou znázorněny).

OBR. 5 Inhibice růstu buněk vyvolaná šťávou květáku u buněk

MCF-7, na něž bylo působeno různými koncentracemi šťávy; po 72 hodinách kultivace byl zjišťován počet životaschopných a mrtvých buněk. Hodnoty jsou uvedeny ve tvaru průměr \pm SEM, $n = 3$. Hodnoty bez společného písmena jsou různé, $P < 0,05$.

U těchto buněk se analýza omezovala na caspase-9, protože caspase-3 neexprimují (42). Tyto výsledky ukazují, že zastavení růstu buněk vystavených šťávě se pojí s cytostatickým mechanismem a se smrtí nekrotických buněk, k čemuž dochází při použití vyšších koncentrací.

Vliv na proteiny závislé na buněčném cyklu. Analýza Western blot provedená u ER+ buněk ukázala, že se vlivem působení šťávy výrazně zvýšily hladiny p27 CDK inhibitoru, a to u buněk jak MCF-7 ($P < 0,01$) (**obr. 6**), tak BT474 ($P < 0,01$; zde neuvedeno) a selektivně – zejména u buněk MCF-7 – snížila hladina CDK6 proteinu ($P < 0,01$). U buněk MCF-7 se hladina proteinu p27 zvyšovala v závislosti na dávce až na 200 % výchozí hodnoty působením 10 μ l šťávy (**obr. 6**). U některých buněk se 72hodinovým působením 5 a 10 μ l šťávy snížila výchozí hladina CDK6 po řadě na 20 a 15 %. Naproti tomu nitrobuňková hladina CDK4 se působením šťávy nezměnila (neukázáno). Analyzovali jsme také expresi p27^{kip1} a CDK6 u ER– buněk (MDA-MB-231 a BT20). Je zajímavé, že u těchto buněk neměly tytéž koncentrace šťávy na expresi p27 a CDK6 žádný vliv (**obr. 7A**).

Jedním ze základních substrátů pro G₁ CDKs je retinoblastomový protein (pRb). Antiproliferativní aktivita Rb je regulována posttranslační modifikací; pro progresi buněčným cyklem je zejména kritická fosforylace pRb (43). V ER+ buňkách, a kupodivu také v ER– buňkách, vystavených šťávě bylo množství celkového a hyperfosforylovaného pRB výrazně sniženo (v obou případech $P < 0,01$) (**obr. 6A, B** a **obr. 7B**). Za pokles fosforylace Rb a tedy za zástavu proliferace buněk v případě ER+ a ER– buněk tak nejspíše odpovídají různé mechanismy.

Expresse genů spojených s buněčným cyklem a apoptózou. U exponovaných buněk byla exprese řady genů spojených s apoptózou regulována směrem vzhůru (údaje nejsou znázorněny). Z genů, jejichž produkty mají antiapoptotickou funkci, jsme overexpresi zjistili u *survivinu* (150% nárůst).

OBR. 6 Expresse proteinu závislého na G_1 buněčném cyklu a úroveň endogenní fosforylace Rb proteinu v buňkách MCF-7 vystavených po dobu 22 a 72 hodin šťávy. (A) Celkové buněčné extrakty byly analyzovány na Cdk6, p27^{Kip1}, pRb a aktinové proteiny metodou Western blot. Hyperfosforylovaný Rb (ppRb) vykazuje v porovnání se samotným hypofosforylovaným (pRb) charakteristický posun mobility. (B) Relativní hladina Cdk6, p27^{Kip1} a ppRb proteinů v buňkách MCF-7 po působení různých koncentrací šťávy byla stanovena na přístroji ChemiDoc, normalizována na aktin a vyjádřena jako procentický podíl hodnoty bez působení (definované jako 100). Hodnoty jsou ve tvaru průměr \pm SEM, $n = 3$. *Odlíšné od neexponovaných buněk, $P < 0,01$.

OBR. 7 Expresse proteinu závislého na G_1 buněčném cyklu a úroveň endogenní fosforylace Rb proteinu v ER- buňkách. Buňky byly exponovány a zpracovány, jak je uvedeno v legendě k obr. 7. (A) Analýza Western blot Cdk6, p27^{Kip1} a aktinových proteinů v buňkách MDA-MB-231 (vlevo) a BT20 (vpravo) po působení 10 ml/l šťávy. (B) Reprezentativní Western blot analýza pRb a ppRb (vlevo) a hladiny ppRb (vpravo) v buňkách MDA-MB-231 a BT20 po 72hodinovém působení různých koncentrací šťávy. Hladiny proteinů byly normalizovány na aktin. Hodnoty jsou ve tvaru průměr \pm SEM, $n = 3$. *Odlíšné od neexponovaných buněk, $P < 0,01$.

Z genů, jejichž produkty se vyznačují proapoptotickou funkcí, jsme zjistili overexpresi *TRADD* (tumor necrosis factor receptor associated death domain, 180% nárůst), *TRAF-2* (tumor necrosis factor receptor associated factor 2, 120% nárůst) a *BID* (170% nárůst) a pokles exprese *FAAD* (Fas-associated death domain, 50% pokles).

DISKUSE

Během posledního desetiletí zaujala ve vyvinutých zemích rakovina prsu první místo jako příčina rakoviny u žen. Hlavními způsoby boje proti těmto novotvarům jsou chirurgické odstranění nádoru a chemoterapie. Chirurgický zákrok je však ve fázi metastáz často neúčinný. Pokud jde o chemoterapii, je značný počet pacientek k antiestrogenovým sloučeninám od počátku rezistentních nebo rezistenci k běžným lékům získají při dlouhodobé léčbě. V posledních letech byla z hlediska potenciální účinnosti jako zdroje chemopreventivních látek studována řada druhů zeleniny; z epidemiologických studií pak vyplývá, že druhy brukve mají protektivní účinky in vivo vůči různým typům rakoviny, včetně rakoviny prsu (3, 31, 44). Byla vyslovena domněnka, že antitumorigenní aktivita některých látek přítomných v této zelenině má spojitost s indukcí detoxifikačních enzymů, inhibicí aktivity prekancerogenů, působením antioxidantů a záchytem karcinogenů vlákninou v trávicím ústrojí (5). V této studii jsme prokázali, že surová šťáva květáku je potentním inhibítozem růstu buněk lidské rakoviny prsu in vitro a že její antiproliferativní vlastnosti jsou společným rysem různých kultivarů rostliny *Brassica oleracea*, i když s různou účinností. Tyto rozdíly v účinnosti mohou být dány genotypem, podmínkami růstu, dobou sběru a klimatem (45,46) a zasluhují si další výzkum.

Naše údaje ukazují, že šťáva dokáže blokovat proliferaci ER+ i ER- buněk rakoviny prsu, a naznačují, že se na tom mohou podílet různé cesty inhibice růstu, s jedinečným společným cílem, jímž je výrazný pokles endogenní fosforylace Rb.

Na molekulární úrovni snižuje šťáva v ER+ buňkách selektivně hladiny CDK6 a zvyšuje hladinu CDK6 inhibitoru p27. Jelikož endogenním substrátem pro G_1 CDK-6 je Rb, klesá vlivem snížené hladiny CDK-6 rozsah fosforylace Rb, v důsledku čehož se Rb ve formě hypofosforylátu váže a inaktivuje transkripci E2F, čímž zastavuje buněčný cyklus. V ER- buňkách zůstávají CDK6 a p27 po expozici nezměněné, z čehož lze vyvozovat, že se na poklesu úrovně fosforylace Rb, a tedy blokování proliferace buněk, mohou podílet další proteiny nebo kinázy. Hong et al. (47) uvádí, že 3,3'-diindolylmethan, což je indol odvozený z

rostlin druhu *Brassica*, indukuje v buňkách rakoviny prsu zástavu G_1 buněčného cyklu mechanismem zahrnujícím p21 a že indukce exprese p21 závisí na estrogenovém receptoru. Mechanismus zastavení růstu v buňkách rakoviny prsu zahrnující proteiny p27 a CDK6 buněčného cyklu G_1 publikovali Cover et al. (19) pro I3C a my pro tetramerní derivát I3C (22). Tyto sloučeniny indukují overexpresi p27 a také snižují hladinu CDK6 v ER+ buňkách. Dále, zástava proliferace buněk se pojila s blokováním buněk v G_1 fázi buněčného cyklu, což je situace, která u a buněk exponovaných šťávě pozorována nebyla. Je ovšem třeba poznamenat, že v předchozí studii jsme také zjistili, že je k tetrameru vysoce citlivá pRb-negativní buněčná linie rakoviny prsu (BT-549), a to i za nepřítomnosti akumulace buněk G_1 fáze (22). Proto, v souladu s údaji získanými s tetramerem u buněk BT-549, není pravděpodobné, že by CDK6 byl jediným důležitým molekulárním terčem aktivity šťávy brukve.

Antiproliferativní aktivita šťávy se jeví jako způsobená jak cytostatickým, tak cytotoxickým mechanismem, v závislosti na její koncentraci. Při nižších koncentracích ($\leq IC_{50}$) vyvolává šťáva značnou inhibici proliferace bez výraznějšího poklesu životaschopnosti buněk, z čehož lze vyvodit, že k zástavě dochází cytostatickým mechanismem, zatímco při vyšších koncentracích ($> IC_{50}$) způsobuje šťáva významnou smrt buněk. V této studii jsme také šťávu použili v koncentracích $> IC_{90}$ a zjistili jsme, že se značný podíl buněk akumuluje v S a G_2/M fázi. Smrt buněk při nejvyšších koncentracích může být ovšem také způsobena specifickým toxickým účinkem šťávy, jak bylo publikováno v případě ITC (48). V rámci několika studií bylo zjištěno, že některé látky přirozeně přítomné v kvěťáku, jako jsou indoly, ITC a sulforafan, vyvolávají apoptózu v různých druzích rakovinových buněk (15, 17, 48–53), včetně buněk rakoviny prsu (15, 17, 50). V naší studii jsme prokázali, že surová kvěťáková šťáva nedokáže v ER+ a ER- buňkách rakoviny prsu vyvolat apoptózu (přínejmenším po dobu pozorování, kterou jsme v práci použili) a že smrt buněk je v našich pokusných podmínkách způsobena nekrotickými událostmi. To, že působením šťávy kvěťáku není vyvolána apoptóza, je v souladu s údaji makroarray analýzy u buněk MCF-7, což poukazuje na zvýšenou expresi jak anti-, tak pro-apoptotických genů.

Shrneme-li tyto výsledky, můžeme z nich vyvodit, že inhibice růstu buněk rakoviny prsu vystavených účinku šťávy kvěťáku může být způsobena více mechanismy a že antikarcinogenní aktivita šťávy se alespoň částečně liší od mechanismu předpokládaného u I3C a jeho tetrameru (19, 22).

Významným zjištěním v této studii je skutečnost, že šťáva kvěťáku vykazuje preferenční aktivitu vůči buňkám rakoviny prsu. Porovnáme-li totiž hodnotu IC_{50} u buněk MCF-7 a u dalších zkoumaných savčích buněčných linií, zjistíme, že prsní buňky jsou k působení šťávy 3,7krát až 8,7krát citlivější. Jelikož jsme použili buněčné linie s vysokou mírou replikace, lze z tohoto zjištění vyvodit, že je nepravděpodobné, že by v koncentracích blokujících růst buněk rakoviny prsu mohla šťáva poškozovat in vivo normální buňky. Jelikož však byly ke kultivaci různých buněčných linií použity rozdílné půdy, nemůžeme vyloučit možnost, že k různé citlivosti zjištěné u různých buněk přispívá alespoň částečně interakce mezi extraktem a některou složkou či složkami jednotlivých půd. Menší antiproliferativní účinek byl v netumorigenní linii lidských prsních buněk pozorován pouze při vysokých koncentracích extraktu; tento účinek není fyziologicky relevantní a potvrzuje selektivitu aktivity šťávy kvěťáku vůči buňkám rakoviny prsu.

Mnohé druhy křížaté zeleniny, k nimž kvěťák patří, se před konzumací tepelně upravují. Tepelnou úpravou se však ničí myrosináza, čímž se snižuje biologická dostupnost ITC a dalších potenciálních chemopreventivních sloučenin. K řešení tohoto problému jsme zpracovali kvěťákové listy na suchý extrakt a prokázali, že suchý prášek získaný postupem za nízké teploty si po delší dobu uchovává stabilitu. Extrakt by tedy mohl být nutraceutickým průmyslem využíván k chemoprevenci. Naproti tomu sprejovým sušením se tato aktivita ničí. Nevíme, která je to sloučenina, jež je tímto postupem narušena. Nicméně došlo ke ztrátě řady sloučenin, včetně těch, jež jsou odpovědné za antioxidační aktivitu (neznázorněno).

V této studii je podle našich znalostí poprvé prokázáno, že kvěťák působí jako potentní inhibitor růstu jak ER+, tak ER- buněk rakoviny prsu. Mechanismus

inhibice růstu je sice třeba dále zkoumat, ovšem výsledky ukazují, že květák obsahuje sloučeniny vykazující antikarcinogenní účinky, jež nejspíše působí mechanismy jak ER-independentními, tak ER-dependentními. V této studii nebyla použita jedna izolovaná čistá sloučenina, nýbrž plná šťáva, díky čemuž byly využity všechny aktivní sloučeniny. Možnost využití této jedlé rostliny, v přírodě velice rozšířené, k chemoprevenci některých druhů rakoviny u vysoce ohrožených osob nebo jako chemoterapeutického materiálu je vysoce zajímavá a je třeba ji dále zkoumat.

PODĚKOVÁNÍ

S vděčností děkujeme prof. Paolu Ninfalimu za pomoc a informace o přípravě suchých extraktů ze šťávy a dr. Mauro De Santimu za pomoc při statistických analýzách.

LITERATURA

- Hocman, C. (1989) Prevention of cancer: vegetables and plants. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 201–212.
- Steinmetz, K. A. & Potter, J. D. (1991) Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 2: 325–357.
- Blok, G., Patterson B. & Subar, A. (1992) Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18: 1–29.
- Fahey, J. W., Khang, Y. & Talalay, P. (1997) Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 10367–10372.
- Verhoeven, D.T.H., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A. & van Poppel, G. (1997) A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem. Biol. Interact.* 103: 79–129.
- Conaway, C. C., Yang, Y.-M. & Chung, F.-L. (2002) Isothiocyanate as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr. Drug Metab.* 3: 233–255.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. & Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plant. *Rev. Phytochem.* 56: 5–15.
- Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. & Talalay, P. (1992) Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2394–2398.
- Zhag, Y. S., Talalay, P., Cho, C. G. & Posner, G. H. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli— isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2399–2403.
- Zhag, Y. S. & Talalay, P. (1994) Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanism. *Cancer Res. (suppl.)* 54: 1976s–1986s.
- Yang, C. S., Smith, T. J. & Hong, J.-Y. (1994) Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations. *Cancer Res.* 54: 1982s–1986s.
- Guo, Z., Smith, T. J., Wang, E., Eklind, K. I., Chung, F.-L. & Yang, C. S. (1993) Structure-activity relationships of arylalkyl isothiocyanates for the inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1butanone metabolism and the modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes in rats and mice. *Carcinogenesis* 14: 1167–1173.
- Fowke, J. H., Longcope, C. & Hebert, J. R. (2000) Brassica vegetable consumption shifts estrogen metabolism in healthy postmenopausal women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 9: 773–779.
- Riby, J. E., Chang, G.H.F., Firestone, G. & Bjeldanes, L. F. (2000) Ligand-independent activation of estrogen receptor function by 3,3'-diindolylmethane in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 60: 167–177.
- Ge, X., Yannai, S., Rennet, G., Gruener, N. & Fares, F. A. (1996) 3,3 Diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 228: 153–158.
- Katdare, M., Osborne, M. P. & Telang, M. T. (1998) Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncol. Rep.* 5: 311–315.
- Ge, X., Fares, F. A. & Dannai, S. (1999) Induction of apoptosis in MCF-7 cells by indole-3-carbinol is independent of p53 and Bax. *Anticancer Res.* 19:3199–3204.
- Hong, C., Firestone, G. L. & Bjeldanes, L. F. (2002) Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1085–1097.
- Cover, C. M., Hsieh, S. J., Tran, S. H., Hallen, G., Kim, G. S., Bjeldanes, L. F. & Firestone, G. L. (1998) Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 3838–3847.
- Cover, C. M., Hsieh, S. J., Cram, E. J., Hong, C., Riby, J. E., Bjeldanes, L. F. & Firestone, G. L. (1999) Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 59: 1244–1251.
- Cram, E. J., Liu, B. D., Bjeldanes, L. F. & Firestone, G. L. (2001) Indole-3-carbinol inhibits CDK6 expression human MCF-7 breast cancer cells by disrupting Sp1 transcription factor interactions with a composite element in the CDK6 gene promoter. *J. Biol. Chem.* 276: 22332–22340.
- Brandi, G., Paiardini, M., Cervasi, B., Fiorucci, C., Filippone, P., De Marco, C., Zaffaroni, N. & Magnani, M. (2003) 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.* 63: 4028–4036.
- Zhag, Y. S., Kensler, T. W., Cho, C. G., Posner, G. H. & Talalay, P. (1994) Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3147–3150.
- Verhoeven, D. T. H., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H. & van den Brandt, P. A. (1996) Epidemiological studies on Brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5: 733–748.
- Hecht, S. S. (1999) Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogens metabolism. *J. Nutr.* 129: 768S–774S.

26. Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P. & Lozniewski, A. (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 7610–7615.
27. Steinmetz, K. A. & Potter, J. D. (1996) Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 96: 1027–1039.
28. Willett, W. C. & Hunter, D. J. (1994) Prospective studies of diet and breast cancer. *Cancer* 74: 1085–1089.
29. Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., Vena, J. E., Laughlin, R., Brasure, J. R., Swanson, M. K., Nemoto, T. & Graham, S. (1996) Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruit, and related nutrients. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 340–348.
30. Nicholson, A. (1996) Diet and the prevention and treatment of breast cancer. *Altern. Ther. Health Med.* 2: 32–38.
31. Terry, P. & Wolk, A. (2001) Brassica vegetables and breast cancer risk. *J. Am. Med. Assoc.* 285: 2975–2977.
32. Platz, E. A., Giovannucci, E., Rimm, E. B., Rockett, H. R., Stampfer, M. J., Colditz, G. A. & Willett, W. C. (1997) Dietary fiber and colorectal adenoma in men. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 6: 661–670.
33. Pietinen, P., Malila, N., Virtanen, M., Hartman, T. J., Tangrea, J. A., Albanes, D. & Virtamo, J. (1999) Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer Causes Control* 10: 387–396.
34. Voorrips, L. E., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Sturmans, F., Hermus, R.J.J. & van den Brandt, P. A. (2000) Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 152: 1081–1092.
35. Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G. & Anton-Culver, H. (1993) Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 101: 372–377.
36. Graham, S., Marshall, J., Mettlin, C., Rzepka, T., Nemoto, T. & Byers, T. (1982) Diet in the epidemiology of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 116: 68–75.
37. Katsouyanni, K., Trichopoulos, D., Boyle, P., Xirouchaki, E., Trichoulou, A., Lisseos, B., Vasilaros, S. & MacMahon, B. (1986) Diet and breast cancer: a case control study in Greece. *Int. J. Cancer* 38: 815–820.
38. Franceschi, S., Parpinel, M., La Vecchia, C., Favero, A., Tetamini, R. & Negri, E. (1998) Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer of the colon, rectum, and breast. *Epidemiology* 9: 338–341.
39. Zhag, S., Hunter, D., Forman, M. R., Rosner, B. A., Speizer, F. E., Colditz, G. A., Manson, J. E., Hankinson, S. E. & Willett, W. C. (1999) Dietary carotenoids and vitamin A, C and E and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 547–556.
40. Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Yaun, S.-S., Adami, H. O., Beeson, W. L., Brand, P. A., Folsom, A. R., Fraser, G. E., Freudenheim, J. L., et al. (2001) Intake of fruit and vegetables and risk of breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *J. Am. Med. Assoc.* 285: 769–776.
41. Fowke, J. H., Chung, F.-L., Jin, F., Qi, D., Cai, Q., Conaway, C., Cheng, J.-R., Shu, X.-O., Gao, Y.-T. & Zheng, W. (2003) Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Res.* 63: 3980–3986.
42. Yang, X.-H., Sladek, T. L., Liu, X., Butler, B. R., Froelich, C. J. & Thor, A. D. (2001) Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61: 348–354.
43. Qin, X. O., Livingston, D. M., Ewen, M., Sellers, W. R., Arany, Z. & Kaelin, W. G., Jr. (1995) The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action. *Mol. Cell. Biol.* 15: 742–755.
44. Ames, B. N., Gold, L. S. & Willett, W. C. (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 5258–5265.
45. Fenwick, G. R., Heany, R. K. & Mullin, W. J. (1983) Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18: 123–201.
46. Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Juvik, J. A., Klein, B. P., Walling, M. A. & Jeffery, E. H. (1999) Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1541–1548.
47. Hong, C., Kim, H.-A., Firestone, L. G. & Bjeldanes, L. F. (2002) 3,3-diindolylmethane (DIM) induces a G1 cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21WAF1/CIP1 expression. *Carcinogenesis* 23: 1297–1305.
48. Yu, R., Mandelkar, S., Harvey, K. J., Ucker, D. S. & Kong, A.-N.T. (1998) Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Res.* 58: 402–408.
49. Gamet-Payrastré, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M.-A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J. & Terce, F. (2000) Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.* 60: 1426–1433.
50. Rahman, W.K.M., Aramha, O., Glazirin, A., Chinni, S. R. & Sarkar, F. H. (2000) Translocation of Bax to mitochondria induces apoptotic cell death in indole-3-carbinol (I3C) treated breast cancer cells. *Oncogene* 19: 5764–5771.
51. Bennesen, C., Eggleston, I. M. & Hayes, J. D. (2001) Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 61: 6120–6130.
52. Xu, K. & Thornalley, P. J. (2001) Signal transduction activated by the cancer chemopreventive isothiocyanates: cleavage of BID protein, tyrosine phosphorylation and activation of JNK. *Br. J. Cancer* 84: 670–673.
53. Fimognari, C., Nusse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G. & Hrelia, P. (2002) Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis* 23: 581–586.



Decolen

pre ženy

Pre plnosť, pevnosť
a zdravie ženského poprsia

Decolen

pro ženy

Pro plnost, pevnost
a zdraví ženského poprsí



Doplněk stravy

50 tablet

Decolen

pro ženy

Pro plnost, pevnost
a zdraví ženského poprsí



Doplněk stravy

50 tablet

ZELENÁ LINKA
800 141 141

1111-1345
11

Decolen pro ženy

Decolen pro ženy je první přírodní tableta vyvinutá s cílem udržovat plnost a pevnost poprsí a zdraví prsní tkáně. Obsahuje jak směs rostlinných fytoestrogenů, sterolů a lignanů, tak i další důležité látky s anti-oxidačními účinky. Rostlinné výtažky fytoestrogeny přispívají k stimulaci prsní tkáně a napomáhají získat přirozeně plný tvar poprsí. Antioxidanty ze semínků vinných hroznů, lykopen, vitamin D a látky z brukve chrání buňky prsní tkáně před škodlivými účinky volných radikálů a dlouhodobě přispívají k jejich zdraví. Decolen je určen ženám všech věkových kategorií, které mají zájem pečovat o zdraví svého poprsí a o šetrné, nechirurgické a efektivní zlepšení jeho vzhledu.

Decolen pro ženy je první přírodní tableta vyvinutá s cílem udržovat plnost a pevnost poprsí a zdraví prsní tkáně. Obsahuje jednak zmes rostlinných fytoestrogenů, sterolov a lignanov, tak tiež i ďalšie dôležité látky s anti-oxidáčnými účinkami. Rastlinné výtažky fytoestrogeny prispievajú k stimulácii prsného tkaniva a napomáhajú získat prirodzene plný tvar poprsia. Antioxidanty zo semienok vinných hroznov, lykopen, vitamín D a látky z hlávkovej kapusty chránia bunky prsného tkaniva pred škodlivými účinkami volných radikálov a dlhodobu prispievajú k ich zdraviu. Decolen je určený ženám všetkých vekových kategórií, ktoré majú záujem starať sa o zdravie svojho poprsia a o šetrné, nechirurgické a efektívne zlepšenie jeho vzhľadu.

Denní dávka obsahuje/Denná dávka obsahuje:	hmot./1 tbl.	hmot./2 tbl.	% DDD/ODD*
Andělka čínská/Angelica čínska (Angelica sinensis) extrakt	112,5 mg	225,0 mg	
Brusnice zelená/Hlávková kapusta (Brassica oleracea) extrakt	67,5 mg	135,0 mg	
Bedrník anýz/Bedrník anýzový (Foeniculum vulgare) extrakt	60,0 mg	120,0 mg	
Chmel otáčivý/Chmel otáčivý (Humulus lupul) extrakt	37,5 mg	75,0 mg	
Iskobilanec	25,0 mg	50,0 mg	
Smetanka lékařská (Hydroxypropylmethylcelulóza) extrakt	22,5 mg	45,0 mg	
Semínka z vinných hroznů/Semienka z vinných hroznov extrakt	12,5 mg	25,0 mg	
Len seletý/Len seletý (Linum catharticum) extrakt	7,5 mg	15,0 mg	
Ornitidin/Ornitín (Decoson) sifosový extrakt	5,0 mg	10,0 mg	
Lycopen/Lykopen	2,5 mg	5,0 mg	100
Vitamin D3/Vitamin D	0,4 mg	0,8 mg	100

* % doporučené denní dávky ve 2 tbl./odporúčanej dennej dávky v 2 tbl.: - není stanoveno/ nie je stanovené

Složení: andělka čínská extrakt, fosforečnan vápenatý, brukve zelená extrakt, bedrník anýz extrakt, rostlinné steroly, mikrokrytalická celulóza, chmel otáčivý extrakt, rajče jedlé extrakt, smetanka lékařská extrakt, z kofeina, karboxymethylcelulóza, semínka z vinných hroznů extrakt, hydroxypropylmethylcelulóza, kyselina stearová (látky protipětkavá), len seletý extrakt, stearyl hořečnatý (látky protispěškové), smičinec - extrakt z kofeina, titanová běloba (barvivo), cholekalCIFeral, glycerol.

Dávkování: 2 tablety denně, zapít tekutinou.

Upozornění: Nepřekračujte doporučenou denní dávku. Přípravek není určen jako náhrada pestré stravy. Výrobek není určen pro děti, těhotné a kojící ženy. Ukládat mimo dosah dětí! Skladujte v suchu a temnu při teplotě do 25 °C.

Minimální trvanlivost do konce data uvedené na spodní straně obalu (EXP).

Složenie: angelika čínska extrakt, fosforečnan vápenatý, hlávková kapusta extrakt, bedrník anýzový extrakt, rastlinné steroly, mikrokrytalická celulóza, chmel otáčivý extrakt, rajčina jedlá extrakt, pôpava lekárska extrakt, z kofeína, karboxymethylcelulóza, semienka z vinných hroznov extrakt, hydroxypropylmethylcelulóza, látky protihrudkujúce (kyselina stearová, stearyl hořečnatý), len seletý extrakt, smičník extrakt z kofeína, farbivo (titanová běloba), cholekalCIFeral, glycerol.

Dávkovanie: 2 tablety denne, zapít tekutinou.

Upozornenie: Prípravok nie je určený pre deti, tehotné a dojčiacie ženy. Neprekračujte ustanovenú dennú dávku. Nesmie sa používať ako náhrada pester stravy. Skladujte mimo dosahu detí, v suchu a tme, pri teplotě do 25 °C.

Minimálna trvanlivost do konce dátumu uvedené na spodnej strane obalu (EXP).

Decolen pre ženy

Pre plnosť, pevnost
a zdravie ženského poprsia



Výživový doplnok

50 tabliet

ZELENÁ LINKA
0800 191 191

MFG180112
L 0241944
EXP 012015



8 595165 263459

Distributor/Distribútor:

WALMARK, a.s.,
Oldřichovice 44,
739 61 Trinec, Česká republika

Hmotnost/Hmotnosť obsahu:
29,0 g (- 5 %)

W 3459/S/01/CZE/SLO

www.decolen.cz



**RADA
PRO ROZHLASOVÉ A TELEVIZNÍ
VYSÍLÁNÍ**

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání

Škrétova 44/6, 120 00 Praha 2

Tel.: + 420 274 813 830 / Fax: + 420 274 810 885 / e-mail: info@rrtv.cz
www.rrtv.cz

**STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU
LÉČIV**

Šrobárova 48
100 41 Praha 10
Česká republika

**Sp. zn./Ident.: 2012/518/had/WAL
Č.j.: BUR/3140/2012
Zasedání Rady č. 15 - 2012 / poř.č.: 18**

Vážení,

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání (dále jen „Rada“) postupuje Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv podnět občanského sdružení Unicampus o. s. ve věci reklamy DECOLEN, který byl Radě doručen dne 22. června 2012. Zároveň si Vás dovolujeme požádat o posouzení skutečné klasifikace tohoto přípravku.

Stěžovatelé uvedli, že je *spotřebitelům uváděno zejména tvrzení, že složení výrobku má hormonální vliv na tkáň lidského prsu ve smyslu účinku na tkáň prsní žlázy, a to do takové míry, že dochází ke tkáňovým změnám typu růstu a vývoje tkáň prsní žlázy, v jejich důsledku se mění tvar ženských prsou. Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky skutečně disponuje, jedná se zcela jednoznačně o léčivý přípravek „dle funkce“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. b) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech. V takovém případě se dopouští společnost Walmark protiprávní reklamy výrobku DECOLEN ve smyslu § 5 odst. 3 zákona č. 40/1995 Sb., o regulaci reklamy a nekalé (klamavé) obchodní praktiky vůči spotřebiteli ve smyslu zákona č. 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele tím, že klame spotřebitele o povaze výrobku uváděním textu „doplňek stravy“. Výrobek DECOLEN je totiž dle své funkce léčivým přípravkem, neregistrovaným na našem trhu. Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky objektivně nedisponuje, a výrobce není schopen unést důkazní břemeno spočívající v důkazu všeobecné vědecké akceptace poznatků o hormonálním a přírůstovém vlivu účinných látek výrobku DECOLEN na tkáň prsní žlázy (nebo tukovou tkáň prsu?), pak zůstává objektivní skutečností, že výrobek DECOLEN byl prezentován jako léčivý přípravek. Kdyby výrobek DECOLEN skutečně disponoval vlastnostmi uváděnými v jeho obchodní prezentaci, tak by se jednoznačně jako léčivý přípravek „dle funkce“ kvalifikoval, a proto se kvalifikuje jako léčivý přípravek „dle prezentace“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. a) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech.“*

Bylo zjištěno, že se jedná o reklamu DECOLEN, odvysílanou premiérově dne 1. 6. 2012 od 7:16:54 hodin na programů Óčko, v celkovém počtu 1041 repríz za období června 2012, na programech AXN, CS Film, Nova, Nova Cinema, prima Family, Prima Cool, Prima Love, Spektrum, Universal Chanell, Film+ a TV Paprika.

Rada se s podnětem seznámila na svém 13. zasedání 2012, a následně bezodkladně vyzvala zadavatele předmětné reklamy, aby k obsahu stížnosti podal vysvětlení, což také učinil.

Následná analýza reklamy na přípravek DECOLEN neshledala žádné prvky, které by navozovaly léčebný účinek tohoto přípravku. Taktéž není na základě analýzy sporu o tom, že předmětný přípravek je doplňek stravy a nikoliv léčivo.

Pokud jde o námitku, že se jedná o léčivo s ohledem na judikaturu Evropského soudního dvora, Rada rozhodla postoupit stížnost Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv a požádat o posouzení skutečné klasifikace přípravku.

Stížnost je přiložena, stejně jako obrazově-zvukový záznam předmětné reklamy.

Děkujeme Vám za spolupráci.

S pozdravem

V Praze dne: 21.8.2012

JUDr. Kateřina Kalistová

*předsedkyně Rady
pro rozhlasové a televizní vysílání*

Přílohy: Pošta (příchozí, 6.9.2012, Jan Vavrečka, Unicampus, o. s., 6006/2012/P, podnět - společnost Walmark DECOLEN)

Odesílatel: unicampus@seznam.cz

Adresát: info@rrtv.cz

Odesláno: 22.6.2012 11:18:03

Zpracováno: 25.6.2012 7:51:50

Předmět: Podání podnětu k zahájení správního řízení DECOLEN

Vážené vedení RRTV,

zasíláme Vám podnět k zahájení správního řízení proti společnosti Walmark za protiprávní způsob propagace neregistrovaného léčivého přípravku DECOLEN v udiovizuálních obchodních sděleních.

S pozdravem,

Jan Vavrečka

Unicampus, o. s.

Centrum vzdělávání, výzkumu a aplikace práva Kubelíkova 1224/42 130 00

Praha 3 - Žižkov

Adresát:

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání
Škrétova 44/6, 120 21 Praha 2

Podání podnětu o zahájení správního řízení z moci úřední dle § 46 zákona č. 500/2004, správního řádu (dále jen SpŘ)

a prohlášení o vedlejších účastenství Unicampus, o. s. ve smyslu § 27 odst. 2 SpŘ v zahájeném správním řízení

ve věci:

Nařízení zdržení se dalšího protiprávního jednání vůči spotřebiteli ze strany společnosti WALMARK, a. s., Oldřichovice č.p. 44, 739 61 Trinec, v audiovizuálních obchodních sděleních propagujících neregistrovaný léčivý přípravek DECOLEN.

Unicampus, o. s. (dále jen „žadatel“) tímto žádá Radu pro rozhlasové a televizní vysílání (dále jen RRTV) jako věcně a místně příslušný dozorový orgán o vydání rozhodnutí nařizujícího společnosti WALMARK, a. s. (dále jen Walmark), zdržet se dalšího protiprávního jednání vůči spotřebiteli v audiovizuálních obchodních sděleních propagujících výrobek DECOLEN a v souvislosti s tímto správním rozhodnutím splnit mezinárodní oznamovací povinnost dle čl. 7. odst. 1 nařízení ES č. 2006/2004.

Unicampus, o. s. se dále na základě svých práv založených mu směrnicí 2009/22/ES prohlašuje za vedlejšího účastníka případně zahájeného správního řízení z moci úřední.

Odůvodnění žádosti uvádíme níže.

Jan Vavrečka
předseda sdružení
unicampus@seznam.cz
v Praze. dne 22. 6. 2012

Oprávnění Unicampus, o. s.

Směrnice 2009/22/ES založila našemu sdružení Unicampus, o. s. právo jehož výkon se přímo a výhradně váže k věci porušování zákonů na ochranu spotřebitele, jak jsou uvedeny v příloze I. této směrnice a provedeny do vnitrostátních právních předpisů jednotlivých členských států EU.

Výkon tohoto práva má směřovat zamýšleným účinkům směrnice 2009/22/ES - k dosažení ukončení protiprávního jednání vůči spotřebiteli. Naše sdružení může být dotčeno na svých právech a souvisejících povinnostech vyplývajících mu ze Stanov tím, pokud by nebylo dosaženo zdražení se protiprávního jednání společnosti Walmark, nebo bylo dosaženo zdržení se protiprávního jednání v nedostatečném rozsahu k objektivnímu rozsahu porušování zákonů na ochranu spotřebitele.

V smyslu § 27 odst. 2 SpŘ je proto naše sdružení Unicampus, o. s. vedlejším účastníkem tohoto správního řízení vedeného z moci úřední, pokud bude ze strany RRTV zahájeno.

Za vedlejšího účastníka řízení se tímto prohlašujeme.

Základní odůvodnění podání a související návrhy

Společnost Walmark protiprávně propaguje výrobek DECOLEN v tištěných i audiovizuálních reklamních materiálech.

Viz. například reklamní spoty TV vysílání na stanici PRIMA COOL 20. 6. 2012 (kolem 19:00 a 20:30). Je však vysoce pravděpodobné, že stejný spot byl vysílán v podobném období také na jiných stanicích.

V rámci propagace výrobku DECOLEN je spotřebitelům uváděno zejména tvrzení, že složení výrobku má hormonální vliv na tkáň lidského prsu (*mammy*) ve smyslu účinku na tkáň prsní žlázy, a to do takové míry, že dochází ke tkáňovým změnám typu růstu a vývoje tkáň prsní žlázy, v jejich důsledku se mění tvar ženských prsou.

Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky skutečně disponuje, a jeho reklama tedy není pouze další standardně klamavý paskvil společnosti Walmark, poté se jedná zcela jednoznačně o léčivý přípravek „dle funkce“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. b) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech. V takovém případě se dopouští společnost Walmark protiprávní reklamy výrobku DECOLEN ve smyslu § 5 odst. 3 zákona č. 40/1995 Sb., o regulaci reklamy a nekalé (klamavé) obchodní praktiky vůči spotřebiteli ve smyslu zákona 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele tím, že klame spotřebitele o povaze výrobku uváděním textu „doplňek stravy“. Výrobek DECOLEN je totiž dle své funkce léčivým přípravkem, neregistrovaným na našem trhu.

Pokud výrobek DECOLEN takovými hormonálními účinky objektivně nedisponuje, a výrobce není schopen unést důkazní břemeno spočívající v důkazu všeobecné vědecké akceptace poznatků o hormonálním a přírůstovém vlivu účinných látek výrobku DECOLEN na tkáň prsní žlázy (nebo tukovou tkáň prsu?), pak zůstává objektivní skutečností, že výrobek DECOLEN byl prezentován jako léčivý přípravek. Kdyby výrobek DECOLEN skutečně disponoval vlastnostmi uváděnými v jeho obchodní prezentaci, tak by se jednoznačně jako léčivý přípravek „dle funkce“ kvalifikoval, a proto se kvalifikuje jako léčivý přípravek „dle prezentace“ ve smyslu § 2 odst. 1 písm. a) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech.

Výrobek DECOLEN tedy nelze v žádném, případě kvalifikovat jako potravinu, potažmo ani jako doplňek stravy, pokud nebude odlišně postulováno a obhájeno tvrzení, že hormonální účinky na růst a vývoj tkání lidského těla jsou funkce, které léčivým přípravkům nepřísluší, a které proto obecně mohou vykazovat potravinářské, kosmetické a jiné výrobky – pokud se samozřejmě jedná o skutečnosti dostatečně vědecky prokázané.

Proto žádáme RRTV, aby nařídila společnosti Walmark zdržení se protiprávního jednání spočívajícího v jakékoliv další reklamě a propagaci neregistrovaného léčivého přípravku DECOLEN a s ohledem na všechny okolnosti a závažnost případu udělila společnosti Walmark sankci ve výši 3 000 000 Kč.

Dále žádáme RRTV, aby posléze informovala o této skutečnosti Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) a předala mu své rozhodnutí. Je již autonomní povinností SÚKL zajistit stažení výrobku z trhu v takovém případě.

S ohledem na objektivní skutečnost, že tento výrobek společnosti Walmark je nabízen a distribuován i v dalších členských státech EU, je naplněna definice protiprávního jednání uvnitř Společenství ve smyslu nařízení ES č. 2006/2004.

http://www.klubzdravia.sk/produkty/decolen_1243.aspx

http://www.walmark.eu/cz/Stranky/walmark_v_zahranici2.aspx

Proto žádáme RRTV, aby splnila svou oznamovací povinnost a postupovala v tomto případě dle čl. 7. odst. 1. nařízení ES 2006/2004, aby příslušné orgány ostatních členských států byla taktéž informovány a mohly zasáhnout na svých lokálních trzích ve prospěch ochrany spotřebitele.

Doplnění odůvodnění žádosti

- 1.) V souvislosti se stručnou a úspornou formou obsahu TV reklamních sdělení upozorňujeme RRTV na produktové stránky výrobku DECOLEN www.decolen.cz. (Zejména: Jak DECOLEN funguje?) Považujeme informace na těchto webových stránkách za důležité i pro posuzování TV reklamních spotů. Ve správním řízení by mělo být k jejich obsahu přihlíženo. Argumentace výrobce ve vztahu k vyznění sdělení z TV reklamy bude velmi pravděpodobně účelově manipulována směrem k takovému subjektivnímu záměru, který záměrem výrobce objektivně nebyl. Důkaz této skutečnosti, tedy důkaz jak výrobce skutečně vnímá účinky svého výrobku, pro které jej propaguje spotřebitelům, je obsažen právě na produktových stránkách výrobku. Spotřebitelé jsou dnes velmi často pouze inspirováni TV reklamou a hledají doplňující informace o výrobcích zejména na internetu. Sdělení z TV reklamy a internetové propagace výrobku DECOLEN vytváří informační komplex působení na spotřebitele, kdy obsah informací a claimů z TV reklamy je nutné vykládat právě v tom smyslu, jaký jim dává mnohem přesnější, rozsáhlejší a podrobnější oficiální internetová propagace téhož výrobku prováděná stejným subjektem.

Díličí informace o účincích výrobku DECOLEN uváděné na jeho produktových webových stránkách:

Decolen je čistě přírodním a nechirurgickým řešením ve formě směsi rostlinných látek, která je vědecky vyvinuta s cílem stimulovat růstovou aktivitu tkáně prsů a tak pomáhat přirozenému získání plného tvaru a zpevnění poprsí. Rostlinné výtažky obsažené v přípravku Decolen mají na prsa obdobný účinek jako přirozené ženské hormony estrogenu a způsobují reaktivaci růstové činnosti prsní tkáně.

V novém Decolenu pro ženy jsou posíleny právě složky bohaté na fytoestrogeny.

Účinné látky výrobku:

Andělíka čínská: (Angelica sinensis) Jeden z nejvýznamnějších prostředků klasické čínské medicíny. Podporuje zdravou produkci progesteronu.

Smetanka lékařská: (Taraxacum officinale) Tato rostlina významně ovlivňuje sekreční a vylučovací pochody v těle. Tím působí na „čištění“ receptorů a její sekreční účinky jsou klíčem k formování nových buněk a tkání prsou.

Smldinec: (Dioscorea villosa) Bohatý zdroj přírodních fytoestrogenů, fytonutrientů a diosgeninu, působí významně na normalizaci hormonálních funkcí organismu.

- 2.) Hormonální účinky estrogenů, progesteronu i jejich prekurzorů, představují velmi významné a závažné ovlivnění fyziologických pochodů v lidském organismu. Tyto hormony úzce souvisejí s regulací menstruačního cyklu, plodností ženy a mnoha

dalšími významnými fyziologickými i patofyziologickými procesy. Podávání těchto látek má prokázanou prokancerogenní aktivitu, která sice není vyjádřena ve velké míře, ale je jednou z příčin toho, že ženské hormony estrogenu a progesteronu i jejich funkční prekurzory jsou vyhrazeny v použití jedině v registrovaných léčivých přípravcích pro možné významné důsledky svých fyziologických účinků a svá potencionální a známá zdravotní rizika. Tyto hormonálně účinné látky se nesmí přidávat, a to ani v malých množstvích, například do kosmetických přípravků, ve kterých přitom mají pouze lokální účinky v místě své aplikace. Doplňky stravy jako potraviny jsou výrobky s celotělovou distribucí účinných látek, jejichž účinky se proto projeví vůči všem tkáním lidského organismu, které jsou hormonálně citlivé k těmto účinným látkám. Je naprosto absurdní vůbec uvažovat o přípustnosti výrobku DECOLEN na trhu v EU jako legální potraviny, pokud by deklarovanou hormonální účinnost skutečně měl.

Skutečnost, že tento typ farmakologických účinků by zakládal výrobku statut léčivého přípravku dle funkce per analogiam vyplývá například z případu Hoodia Spray a Hoodia patches řešeného SÚKLEM:

<http://www.sukl.cz/leciva/informace-o-vyskytu-nelegalniho-pripravku-3?highlightWords=Hoodia>

- 3.) Žádáme RRTV, aby v souvislosti s tímto případem vycházela a zohlednila judikaturu Soudního dvora EU k věci výkladu definice léčivého přípravku. Implementační praxe Státního ústavu pro kontrolu léčiv je praxe nekonformní a pochybně zákonná. Bude předmětem soudní žaloby i stížnosti Komise EU v blízké době. RRTV je orgánem s vlastní odpovědností za vlastní rozhodnutí a není její povinností vycházet z právně nezávazných stanovisek SÚKL tam, kde existují důvodné pochybnosti a významné odlišnosti od již podaného výkladu práva EU. (UST-30 SÚKL apod.)

V této souvislosti je nejvýznamnější dezinterpretací práva EU, že výrobek se pro účely právní kvalifikace jako léčivého přípravku musí posuzovat vždy komplexně. To je účelová dezinterpretace a nepravda, protože pro účel právní kvalifikace výrobku jako léčivého přípravku se vždy zcela zvlášť a naprosto samostatně hodnotí způsob jeho obchodní prezentace a jeho vědecky prokázaná fyziologická funkce.

Žádáme RRTV, aby zohlednila a postupovala sama konformně ve smyslu zejména této judikatura SDEU

„Uvedená směrnice tak poskytuje dvě definice léčivého přípravku, a sice definici „podle prezentace“ a definici „podle funkce“. Výrobek je léčivým přípravkem, pokud se na něj vztahuje jedna nebo druhá z těchto definic“.¹

„Podle ustálené judikatury musí být pojem „prezentace výrobku“ vykládán extenzivně. V tomto ohledu je namístě připomenout, že směrnice 2001/83 tím, že se opírá o kritérium

¹ Rozsudek SDEU ze dne 9. června 2005, *HLH Warenvertrieb a Orthica*, C-211/03, C-299/03 a C-316/03 až C-318/03, Recueil, s. I-5141, bod 49.

prezentace výrobku, má za cíl zahrnout nejen léčivé přípravky, které mají skutečný léčebný nebo lékařský účinek, ale rovněž výrobky, které nejsou dostatečně účinné nebo které nemají účinek, který jsou spotřebitelé oprávněni očekávat s ohledem na jejich prezentaci. Uvedená směrnice tak směřuje k ochraně spotřebitelů nejen před škodlivými nebo toxickými léčivými přípravky jako takovými, ale rovněž před různými výrobky používanými namísto vhodných léků.“²

² Rozsudek SDEU, ze dne 30. listopadu 1983, *van Bennekom*, C-227/82, Recueil, s. 3883, bod 17.

Stanovy občanského sdružení



PREAMBULE

Občanské sdružení Unicampus bylo založeno s cílem vzdělávání, výzkumu a aplikace práva v oblasti ochrany práv a oprávněných zájmů spotřebitele a ochrany veřejného zdraví a je zaměřeno na provádění systematické odborné činnosti zaměřené na výzkum, analýzu a řešení podstatných problémů z této oblasti. Záměrem sdružení je angažovat do provádění svých aktivit renomované i mladé nastupující odborníky, zejména studenty oborů s ekonomickou, právní či marketingovou orientací.

Cílem činnosti sdružení je analyzovat, zpracovávat i aktivně vytvářet a veřejně šířit důležité informace z oblasti ochrany spotřebitele a veřejného zdraví a propojit akademickou půdu a angažované teoretické odborníky se subjekty z komerční, správní a soudní praxe včetně mezinárodní spolupráce. Tímto způsobem bude odborně posílena a podpořena efektivita jiných organizací, které dnes vytvářejí protiváhu aktivitám poškozujícím práva a zájmy spotřebitelů a nekalým obchodním praktikám činěných vůči spotřebiteli i nekalému jednání vůči jiným subjektům s veřejným vlivem.

Občanské sdružení Unicampus se k tomuto zdrží jakékoliv odborné činnosti prováděné v soukromém zájmu fyzických či právnických osob vůči jiným osobám, pokud se současně nebude jednat o dostatečně silný veřejný zájem a především jeho ochranu.

I. Název, sídlo a právní postavení sdružení

1. **Název sdružení:** Unicampus
2. **Sídlo sdružení:** Kubelíkova 1224/42, 130 00 Praha 3 – Žižkov
3. **Právní postavení sdružení:** Sdružení je nezávislé, neziskové a nepolitické občanské sdružení s vlastní právní subjektivitou založené dle zákona o sdružování občanů, a to na dobu neurčitou. Sdružení je právní osobou registrovanou Ministerstvem vnitra České republiky.

II. Cíl a předmět činnosti

1. Cílem sdružení je odborně, účelně a prospěšně působit v oblasti:
 - a. ochrany práv a oprávněných zájmů spotřebitelů;
 - b. ochrany legální hospodářské soutěže s ohledem na veřejný zájem;
 - c. právotvorby a prosazování práva a kodexů chování v této oblasti.
2. Cílem sdružení je také rozvoj vzdělávání v této oblasti, efektivní šíření informací a podpora odborné způsobilosti uživatelů těchto informací, zejména:
 - a. studentů ekonomických, právních a marketingových specializací;
 - b. odborné veřejnosti;
 - c. dotčené širší a laické veřejnosti.
3. Cílem sdružení je vydat a průběžně aktualizovat „Kodex obchodních praktik“ (dále jen Kodex) za účelem:
 - a. podpory aplikace teoretických poznatků v oblasti mimoprávní regulace a ochrany veřejného zájmu;
 - b. podpory řádné, korektní a efektivní praxe držitelů kodexů chování.
4. Cílem sdružení je využívat k dosažení cíle 1a mj. také podání soudních žalob a žádostí o zahájení správních řízení ve věcech zdržení se protiprávního jednání vůči spotřebiteli ve smyslu směrnice 2009/22/ES.
5. Cílem sdružení je hospodářská činnost prováděná za účelem dalšího financování aktivit a činností sdružení naplňující cíle 1-3.

III. Členství, práva a povinnosti členů

1. **Členem sdružení** se mohou na základě písemné přihlášky – žádosti o členství - stát fyzické i právnické osoby, pokud prokáží dostatečnou odbornou způsobilost a dostatečnou nezávislost k řádnému a efektivnímu naplňování cílů sdružení.
2. Odchylně od odst. 1 může být členství fyzickým i právnickým osobám nabídnuto.
3. Členství ve sdružení nelze nárokovat. Žádost o členství může být odmítnuta i bez udání důvodů.
4. **Vznik členství:** Členství vzniká dnem, kdy Výbor schválí žádost o členství, nebo dnem doručení souhlasného stanoviska fyzické či právnické osoby, které bylo členství Výborem nabídnuto.
5. **Zánik členství:** Členství zaniká na písemnou žádost člena dnem jejího doručení Výboru; vyloučením člena rozhodnutím členské schůze; dnem zániku sdružení; dnem úmrtí člena případně jiným zákonem ustanoveným způsobem.
6. **Práva a povinnosti členů sdružení:**
 - a. právo podílet se na činnosti sdružení, být informován o jeho činnosti,
 - b. právo podávat návrhy, připomínky a náměty k činnosti sdružení,
 - c. právo volit a být volen do orgánů sdružení,
 - d. právo obracet se na orgány sdružení se žádostmi, podněty a stížnostmi,
 - e. povinnost dodržovat stanovy sdružení,
 - f. povinnost dbát dobrého jména sdružení.

IV. Orgány sdružení

1. Řídící, výkonné a kontrolní orgány sdružení jsou: Členská schůze a Výbor
2. Jménem sdružení jedná Výbor
3. Výbor má právo delegovat jednotlivé členy sdružení i jiné nezávislé odborníky či subjekty k samostatné realizaci odborných, organizačních či podpůrných aktivit naplňující cíle sdružení, včetně vystupování jménem sdružení v rámci jejich provádění.
4. **Členská schůze (ČS)** je nejvyšším řídicím orgánem sdružení.
 - a. ČS je svolávána:
 - i. Výborem nejméně jednou za 1 rok,
 - ii. dříve je svolávána ČS Výborem, požádá-li o to nadpoloviční většina členů.
 - b. ČS se účastní členové sdružení, členové Výboru
 - c. Usnášeníschopnost ČS a hlasování:
 - i. ČS je usnášeníschopná při přítomnosti nadpoloviční většiny členů;
 - ii. každý člen má jeden hlas;
 - iii. členové mohou být zastoupeni jinou osobou na základě plné moci ověřené notářem, nebo plné moci udělené v přítomnosti člena Výboru a tímto způsobem jím ověřené.
 - d. Do působnosti ČS patří:
 - i. přijímat, měnit a rušit stanovy,
 - ii. přijímat základní zásady strategie činnosti sdružení,
 - iii. volit členy Výboru
 - iv. projednat zprávu o činnosti Výboru.
5. **Výbor (V)** je statutárním orgánem sdružení, řídí sdružení v období mezi jednotlivými ČS a má nejméně 3 členy.
 - a. Zasedání V svolává a řídí předseda nebo místopředseda, příp. osoba jimi pověřená.
 - b. Do působnosti V patří zejména:
 - i. volit ze svého středu předsedu a místopředsedu,
 - ii. svolávat a připravovat podklady pro ČS,
 - iii. schvalovat vnitřní předpisy,
 - iv. schvalovat rozpočet a účetní závěrku,
 - v. přijímat členy sdružení na základě písemné přihlášky,
 - vi. rozhodovat o dalších otázkách týkajících se sdružení s výjimkou věcí spadajících pod výhradní působnost ČS.
 - vii. realizovat cíle sdružení
 - viii. vydat a aktualizovat Kodex. Toto oprávnění může V delegovat na zvolené členy sdružení. Vydání a aktualizace Kodexu může být rozhodnutím ČS podmíněno schválením Kodexu a jeho změn ČS.
 - c. Usnášeníschopnost V a hlasování:
 - i. V je usnášeníschopný při přítomnosti nadpoloviční většiny členů V,
 - ii. každý člen V má jeden hlas.
 - d. V případě bodu b) jedná V hlasováním dle bodu c).
 - e. V případě aktivit a činností, které nespádají pod bod b) jedná za V jeho předseda nebo společně alespoň dva členové V.

V. Zásady hospodaření

1. Sdružení:
 - a. při vyhledávání a využívání zdrojů a prostředků dbá o účelné hospodaření, naplňování cílů činnosti a dobrého jména sdružení,
 - b. dlouhodobě hospodaří s vyrovnaným rozpočtem,
 - c. používá prostředky pouze pro účely, které odpovídají cílům sdružení,
2. Prostředky na činnost čerpá sdružení zejména z:
 - a. grantů, dotací a prostředků veřejné podpory,
 - b. z darů fyzických či právnických osob.
3. Hospodářskou činnost provádí a odpovědnost za hospodářskou činnost sdružení nese V.

VI. Zánik sdružení

1. Sdružení může zaniknout:
 - a. dobrovolným rozpuštěním, a to na základě usnesení ČS přijatého většinou 2/3 členů účastnících se ČS,
 - b. pravomocným rozhodnutím Ministerstva vnitra ČR.
2. Nestanoví-li ČS jinak, pak při zániku sdružení bez právního nástupce se majetkový zůstatek převede na subjekt s obdobným předmětem činnosti.

Rada pro rozhlasové a televizní vysílání
Škrétkova 44/6
120 00, Praha 2

VÁŠ DOPIS Č.J./ZE DNE
BUR/3140/2012/12. 9. 2012

SP.ZN
sukls208556/2012

VYŘIZUJE/LINKA
Kalendová/718

DATUM
4. 6. 2013

Oznámení o ukončení šetření podnětu – výrobek Decolen

Vážení,

při posuzování výrobku podle prezentace Ústav vycházel z textu na obalu a v příbalovém letáku, které byly Ústavu předloženy výrobcem v rámci šetření podnětu. U výrobku je vymezen účel použití „pro plný a pevný tvar ženského poprsí díky obsahu chmelu“. V textu je uvedeno, že výrobek obsahuje mj. i rostlinné fytoestrogeny, a v tomto kontextu je zdůrazněn obsah lněného semínka a chmelu. K fytoestrogenům se uvádí, že působí podobně jako přirozené ženské hormony estrogeny. Chrání a podporují zdraví prsní tkáň, a tím pozitivně ovlivňují zdraví prsou. Stimulují prsní tkáň a mohou podpořit pevnost a plnost prsou. V příbalovém letáku se uvádí, že „Decolen pro ženy je navržen speciálně pro udržení zdraví (díky obsahu lignanů ze lnu) a tvaru (díky fytoestrogenům z chmele) ženských prsou.“.

Ve výše uvedené prezentaci výrobku na obalu a v příbalovém letáku, stejně jako v televizní reklamě, která je předmětem podnětu občanského sdružení UNICAMPUS o.s., Ústav neshledal, že by u výrobku byly prezentovány léčebné či preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí.

Protože občanské sdružení UNICAMPUS o.s. ve svém podnětu napadá i propagaci výrobku DECOLEN PRO ŽENY na jeho produktových stránkách, Ústav posoudil i informace k výrobku prezentované na stránkách www.decolen.cz (staženo 23.5.2013) a v Katalogu produktů Walmark 2011-12 dostupném na stránkách <http://www.walmart.eu/cz/Stranky/produkty.aspx> (staženo 23.5.2013). Text na těchto stránkách je shodný či velmi podobný textu na obalu a v příbalovém letáku či prezentaci v televizní reklamě a dle názoru Ústavu nedeklaruje léčebné či preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí.

S ohledem na výše uvedené skutečnosti Ústav nepovažuje výrobek DECOLEN PRO ŽENY za léčivý přípravek podle § 2 odst. 1 písm. a) zákona o léčivech.

Ke složení výrobku a jeho posouzení podle funkce Ústav uvádí:

Výrobek DECOLEN PRO ŽENY obsahuje látky, které se běžně používají v doplňcích stravy či jsou běžnou součástí potravin. Rostlinné fytoestrogeny se přirozeně vyskytují v řadě rostlin, kromě chmelu a lněného semínka, které jsou ve výrobku obsaženy, také např. v sóji (*Glycine max*) či v jetelu lučním (*Trifolium pratense*), jež jsou rovněž běžnou součástí potravin či se používají v doplňcích stravy. U žádné rostlinné složky obsažené ve výrobku DECOLEN PRO ŽENY se nejedná o látku zakázanou v doplňcích stravy.

Z hlediska složení Ústav nepovažuje výrobek DECOLEN PRO ŽENY za léčivý přípravek podle § 2 odst. 1 písm. b) zákona o léčivech. Ústav je toho názoru, že přítomnost rostlinných složek, které jsou ve výrobku obsaženy, je v doplňcích stravy akceptovatelná.

Závěrem Ústav uvádí, že na základě výše uvedených skutečností výrobek DECOLEN PRO ŽENY nepovažuje za léčivý přípravek, jeho složení i prezentaci ve výše uvedených materiálech (obal, příbalový leták, televizní reklama, citované webové stránky) Ústav považuje za akceptovatelné pro doplňky stravy.

Děkujeme Vám za spolupráci.

S pozdravem

MUDr. Michaela Hájková
vedoucí oddělení
dozoru nad reklamou