

Forschungsschwerpunkt 2009: Sekundäre Pflanzenstoffe

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg - Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Arbeitsgruppe „Präventive Ernährung“

Erniedrigt Sulforaphan über die Induktion von Glutathion-S-Transferasen mögliche kritische Eigenschaften von Selen hinsichtlich Insulinresistenz und Lipogenese?

Fragestellung:

Ein hoher Selen (Se)-Status respektive die Einnahme von Se-Supplementen sind in den letzten Jahren in vielen Studien in Zusammenhang mit der frühzeitigen Entwicklung von Insulinresistenz, Typ II Diabetes, Hyperlipidämien sowie einer Hyperhomocysteinämie gebracht worden. Diese unerwünschten physiologischen Eigenschaften eines hohen Se-Status basieren auf der Herunter-Regulierung von Schlüsselenzymen der Glutathion (GSH)-Biosynthese sowie einer Reihe von Glutathion-S-Transferasen (GSTs) und weiterer Diabetes-protektiver Xenobiotika-metabolisierender Enzyme (XEs). Das Senfölglykosinolat Sulforaphan (SFN) ist seit einigen Jahren durch seine Krebsprophylaktische Wirkung, die insbesondere auf der Hoch-Regulierung von GSH-Biosyntheseenzymen, GSTs und XEs beruht, in den Focus zahlreicher Forschungsarbeiten gelangt. Die Fragestellung des Projektes (2009/6) war es daher in verschiedenen Tiermodellen zu überprüfen, ob die Verfütterung eines natürlichen Brokkoliextraktes, welches den SFN Glukosinolatprecursor Glucoraphanin (GRA) enthält, die kritischen Eigenschaften des Se hinsichtlich der o.g. Stoffwechselerkrankungen durch die Hoch-Regulierung von GSH Biosyntheseenzymen, GSTs und XEs antagonisieren kann.

Tierversuche:

In einem ersten Versuch wurden 96 männliche abgesetzte, gesunde Albinoratten (8 Gruppen á 12 Ratten) mit 4 Diäten gefüttert, die abgestufte Selenkonzentrationen von Se-arm (15 µg Se/kg Diät) bis zum 3-fachen der empfohlenen Zufuhr (450 µg Se/kg Diät) enthielten. Die Diäten 4 weiterer Versuchsgruppen enthielten die gleichen Se-Konzentrationen, waren jedoch zusätzlich mit 300 mg GRA/kg (700 µmol/kg) GRA aus einem Brokkoliextrakt (Jarrow-Formulas®) supplementiert. Nach 8 Wochen auf den Diäten wurden die Ratten zur Probenentnahme getötet.

In einem zweiten Versuch mit 36 Leptinrezeptor-defekten, Typ II Diabetes-entwickelnden db/db-Mäusen (4 Gruppen á 9 Mäuse) wurden an 2 Gruppen Diäten verfüttert, welche sich in Ihrem Selengehalt unterschieden (1/3 der empfohlenen Zufuhr, 50 µg Se/kg Diät; das 3-fache der empfohlenen Zufuhr 450 µg Se/kg Diät). Die Diäten zweier weiterer Versuchsgruppen enthielten die gleichen Se Konzentrationen, waren jedoch zusätzlich mit einer höheren GRA Dosis von 2400 mg/kg (5600 µmol/kg) als im Rattenversuch supplementiert. Das GRA stammte auch in diesem Versuch wieder aus einem Brokkoliextrakt (Jarrow-Formulas®) der auf eine GRA Konzentration von 10% (w/w) standardisiert ist. Nach 8 Wochen auf den Diäten wurden die Mäuse zur Probenentnahme getötet.

Ergebnisse aus dem Versuch mit Ratten:

Se-arm ernährte Ratten mit oder ohne GRA-Supplement wiesen geringere Endgewichte auf als ihre Se-supplementierten Artgenossen.

Die Aktivitäten der Selenoenzyme GPx1 (Leber, Dickdarm) und GPx3 (Plasma) zeigten sehr sensitiv die abgestufte Se-Supplementierung der Diäten an

Die differenzielle mRNA-Regulation der wichtigsten cytosolischen und mitochondrialen GSTs in der Leber ergab, trotz einzelner individueller Unterschiede, ein insgesamt einheitliches Profil. Während alle GSTs in der Se-arm ernährten Kontrollgruppe die höchste Expression zeigten, bewirkte die zunehmende Se-Supplementierung eine Herunter-Regulierung der mRNA-Spiegel auf Werte zwischen 30 und 60%. Entgegen der Erwartung führte die Supplementierung der Diäten mit dem GRA-haltigen

Brokkoliextrakt schon in der Se-armen Gruppe zu 20 bis 55% niedrigeren mRNA-Gehalten genannter Enzyme im Vergleich zur Se-armen Gruppe ohne GRA. Die zusätzliche Se-Supplementierung senkte die mRNA-Konzentrationen teils noch weiter ab, oder hielt sie auf einem niedrigen Niveau. Die Ergebnisse der mRNA-Daten wurden durch die Messung der Aktivität der GSTs alpha und pi1 bestätigt. Die Schlüsselenzyme der GSH-Biosynthese wurden in der Leber analog zu den GSTs reguliert. Im Dickdarm hingegen bewirkte GRA eine extrem starke Hoch-Regulierung aller geprüften GSTs.

Unabhängig von der GRA-Supplementierung sank die GSH-Konzentration in der Leber in allen Se-supplementierten Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Se arm ernährten Kontrollgruppen ab. Im Vergleich zu den Se-armen Kontrollen wurde durch die Se-Supplementierung ein leichter Anstieg des Leber HCys beobachtet.

Während Se-supplementierte Ratten (mit oder ohne GRA) rund 2,3-fach höhere Plasma HCys-Konzentrationen aufwiesen als die Se-arm ernährten Kontrollgruppen, war ihre Plasma GSH Konzentration signifikant niedriger. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch eine Herunter-Regulierung des hepatischen GSH-Exporters MRP4 und eine Hoch-Regulierung des HCys-Exporters Slco1a4 bestärkt. Die native hepatische Aktivität der lipogenen und Insulin-antagonistischen PTP1B war unabhängig von der GRA-Zufuhr in den Se-armen Kontrollgruppen signifikant niedriger als in allen Se supplementierten Ratten. Die niedrigste Leber-TG-Konzentration wurde in der Leber Se-arm ernährter Ratten ohne GRA gemessen. Die GRA-Zulage zur Se-armen Diät bewirkte einen deutlichen Anstieg der Leber-Triglyceride (TG, $P=0.14$), ebenso wie die Se-Supplementierung ($P<0.05$). Auch die Leber Cholesteringehalte (Chol) waren bei Se-arm ernährten Ratten ohne GRA am niedrigsten. Interessanterweise waren die Plasma TG- und Chol-Gehalte in den Se-supplementierten Gruppen mit oder ohne GRA niedriger als bei den Se-arm ernährten Ratten. Diese Beobachtung konnte durch eine Hoch-Regulierung des Leber-LDL-Rezeptors durch Se (unabhängig von der GRA-Supplementierung) begründet werden. Der hepatobiliäre Chol-Exporter ABCG 5/8 hingegen wurde durch Se und insbesondere durch GRA deutlich herunterreguliert.

Ergebnisse aus dem Versuch mit dbdb-Mäusen:

Im Versuch mit dbdb-Mäusen wurde die diätetische GRA-Konzentration deutlich höher gewählt als im Versuch 1. Beide Se-arm ernährten Gruppen (mit oder ohne GRA) wiesen am Versuchsende signifikant niedrigere Körpergewichte auf, als die Se-reich ernährten Mäuse.

Bezüglich der Lipidparameter in Leber und Plasma konnten im Versuch mit den dbdb-Mäusen ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie im Rattenversuch. Auch hier wiesen die Se-arm ernährten Mäuse niedrigere Leber-TG- und Chol-Gehalte auf, als die Se-reich ernährten Mäuse. Sowohl in der Se-arm ernährten Gruppe, als auch in der Se-reich ernährten Gruppe senkte die höhere GRA Konzentration in diesem Versuch aber die Leber-TG-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne GRA. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Die Expression von Schlüsselenzymen der Glykolyse und Gluconeogenese der Leber wurde weder durch die Variation der Se-Supplementierung, noch durch die GRA-Zulage beeinflusst. Die finalen Plasma-Glukose-Konzentrationen unterschieden sich nicht zwischen den Versuchsgruppen. Korrespondierend zu den Leber-TG-Gehalten wiesen jedoch die Se-arm ernährten Mäuse unabhängig von der GRA-Supplementierung fast 50% niedrigere Werte für den HOMA-Insulin-Resistenz-Index (HOMA = Homeostatic Model Assessment) auf, als Se-reich ernährte Mäuse. Diese Messung wurde durch rund 50% niedrigere Plasma-Insulin-Werte der Se-arm ernährten Mäuse gestützt.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend kann aus beiden Versuchen geschlossen werden, dass unter den geprüften Bedingungen eine Reduktion des diabetogenen, lipogenen und HCys-erhöhenden Potenzials des Selens durch die Supplementierung des Sulforaphan (SFN)-Prekursors Glucoraphanin (GRA) in Form eines natürlichen Brokkoliextraktes nicht erreicht werden konnte. Während das GRA im Dickdarm eine extrem starke Induktion von Schlüsselenzymen der GSH-Biosynthese, von Glutathion-S-Transferasen und von weiteren Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen bewirkte, waren diese Veränderungen in der Leber als Hauptorgan des Stoffwechsels nicht zu verzeichnen. Aus den Ergebnissen kann daher gefolgert werden, dass die Wirksamkeit des GRA gegen die genannten Stoffwechselerkrankungen, welches entweder durch pflanzeigene Myrosinasen oder durch β -Glucosidasen im Dickdarm zu SFN und Glukose gespalten wird, erneut geprüft werden muss.

In diesen künftigen Studien muss das GRA in einem Präparat verabreicht werden, welches zusätzlich eine mikroverkapselte Myrosinase enthält, sodass seine Spaltung zum SFN schon im Dünndarm erfolgen kann und in der Folge wirksame SFN-Konzentrationen auch die Leber erreichen.

Can sulforaphane reduce possible critical effects of selenium regarding insulin resistance and lipogenesis via the induction of glutathione-S-transferases?

Background and purpose:

In recent years a high selenium (Se)-status or taking Se supplements regularly has been associated with an increased risk for the early development of insulin resistance, type II diabetes, hyperlipidemia, and hyperhomocysteinemia. These undesired properties of Se are assumed to be based on the down-regulation of key enzymes of glutathione (GSH) biosynthesis, of a number of glutathione-S-transferases (GSTs), and of further diabetes-protective xenobiotic metabolising enzymes (XEs) due to a high Se status. In contrast the isothiocyanate sulforaphane (SFN) has been shown to act as a cancer preventive substance by up-regulating GSH biosynthesis enzymes, GSTs and XEs. Consequently the aim of project 2009/6 was to study in different animal models if feeding of the SFN glucosinolate precursor glucoraphanin (GRA) in form of a natural broccoli extract can antagonize the above mentioned undesired metabolic Se effects via the up-regulation of GSH biosynthesis enzymes, of GSTs and of XEs.

Animal experiments:

In the first trial 96 weaned healthy male albino rats (8 groups of 12 rats) were fed 4 diets with graded Se concentrations, ranging from Se deficient (15 µg Se/kg diet) to supranutritive (450 µg Se/kg diet). The diets of 4 further groups contained the same Se concentrations, but were supplemented additionally with 300 mg GRA/kg diet (700 µmol/kg) in form of a natural broccoli extract (Jarrow-Formulas®). After 8 weeks on the diets the rats were killed for organ sampling.

In the second trial with 36 leptin receptor deficient, type II diabetes developing dbdb mice (4 groups of 9 mice), 2 groups received diets varying in their Se concentration (1/3 of the recommended dietary amount, 50 µg Se/kg; 3-fold the recommended dietary amount, 450 µg Se/kg). The diets of the 2 further groups contained the same Se concentrations, but were additionally supplemented with a higher GRA dose of 2400 mg GRA/kg diet (5600 µmol/kg) than that used in the rat trial. Again GRA was supplemented in form of a natural broccoli extract (Jarrow-Formulas®) with a standardised GRA content of 10% (w/w).

Results of the trial with rats:

Independent of GRA supply Se deficient rats had significantly lower final body weights than their Se supplemented companions. The activities of the seleno-enzymes of GPx1 (liver and colon) and of GPx3 plasma sensitively reflected dietary Se supply. Despite some small differences the differential regulation profile of several cytosolic and mitochondrial GSTs in the liver was very similar. Whereas all GSTs had the highest mRNA expression in Se deficiency, Se supplementation down-regulated GSTs mRNA levels by 30 to 60%. In contrast to our expectations, GRA supply reduced GSTs mRNA levels already in the Se deficient group by 20 to 55%. In Se supplemented rats with GRA addition to the diets GSTs mRNA levels were down-regulated in some cases to a larger extent than in the Se groups without GRA. The results of the mRNA expression data could be confirmed by enzyme activity assays of GST alpha and GST pi. In the liver the key enzymes of GSH biosynthesis were regulated in an analogous manner as observed for GSTs. However, in the colon GRA supply led to a very strong increase in the mRNA expression of all GSTs investigated. Independent of dietary GRA supply, liver GSH concentration decreased in all Se supplemented groups compared to the respective Se deficient groups. Compared with the Se deficient control groups Se supplementation effected a slight increase in liver HCys concentration. Independent of dietary GRA supply rats with Se supplementation had about 2.3-fold higher plasma HCys levels than Se deficient rats. In contrast plasma GSH was significantly higher in Se deficient rats than in their Se supplemented companions. These particular results were confirmed by a distinct down-regulation of the hepatic GSH exporter MRP4 and an up-regulation of the HCys exporter Slco1a4 in Se supplemented rats. Independent of

GRA supply the native hepatic activity of the insulin-antagonistic and lipogenic enzyme PTP1B was significantly lower in Se deficient rats than in their companions with Se supply. The lowest triglyceride (TG) concentration was measured in the liver of Se deficient rats without GRA supply. GRA addition to the Se deficient diet effected a distinct increase in liver TG concentration ($P=0.14$) as well as Se supplementation ($P<0.05$). Liver cholesterol (Chol) concentration also was the lowest in Se deficient rats without GRA supply. Interestingly plasma TG- and Chol-concentrations were lower in Se supplemented rats compared to their Se deficient companions. These particular results could be explained by the up-regulation of the liver LDL-receptor and a down-regulation of the hepatobiliar Chol exporter ABCG5/8 by Se supplementation, independent of GRA supply.

Results of the trial with dbdb mice:

In the dbdb mouse trial a distinctly higher dietary GRA concentration than in the rat trial was fed to the mice. Independent of dietary GRA supply the mice with the low dietary Se concentration had significantly a lower final body than their companions receiving diets with supranutritional Se. Changes in liver and plasma lipid parameters in the mouse trial were similar to those observed in the rat trial. Also in the mouse trial mice fed the low Se diets had lower liver TG and Chol concentrations than mice fed Se at the supranutritional level. In contrast to the rat trial the higher dietary GRA supply reduced liver TG concentration, both in mice with the low and the high dietary Se concentration. However, this effect was not significant. The mRNA expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes was neither affected by the dietary Se concentration nor by GRA. The final plasma glucose concentration did not differ between groups. However, corresponding to the liver TG values, mice receiving the low Se diets (without or with GRA) had a nearly 50% lower HOMA-insulin-resistance-index (HOMA = Homeostatic Model Assessment) than mice with supranutritional Se supply. This particular result was confirmed by about 50% lower plasma insulin values in mice receiving the low Se diet.

Conclusion:

In summary the results of both trials have shown that under the conditions tested the pro-diabetogenic, hyperlipidemic and hyperhomocysteinemic effects of Se could not be antagonised by dietary supplementation of the sulfuraphane (SFN) precursor glucoraphanin (GRA) in form of a natural broccoli extract. Whereas GRA feeding effected a strong up-regulation key enzymes of GSH biosynthesis, of glutathione-S-transferases, and of several xenobiotic metabolising enzymes in the colon, these changes could not be detected in the liver as the main organ of intermediary metabolism. It can be concluded that the impact of GRA supplementation against the above mentioned metabolic disorders must be re-evaluated under changed experimental conditions. GRA is cleaved to SFN and glucose either by plant-derived myrosinase or by bacterial β -glucosidases in the large intestine. This implies that in future studies GRA should be applied in form of a preparation containing additional microencapsulated myrosinase which enables its efficient cleavage already in the small intestine, leading to effective SFN concentrations also in the liver.

Autor: Jun. Prof. Dr. oec. troph. habil. Andreas S. Müller