Foto di KRiemer

I glucosinolati sono metaboliti glicosidici contenenti zolfo e azoto, presenti nelle piante appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*.

**** Elisa Sonzogni***
**** Marco Angarano***
**** Giulia Martinelli***
**** Marco Fumagalli***
**** Nicole Maranta***
**** Carola Pozzoli***
**** Corinne Bani***
***** Luigi Alberto Marrari***
**** Chiara Di Lorenzo***
**** Enrico Sangiovanni***
**** Mario Dell'Agli***
**** Stefano Piazza***

Il ruolo dietetico della glucorafanina e del sulforafano nella celiachia:

nuove prospettive da uno studio in vitro

Il sulforafano è un composto attivo che si forma a partire dalla glucorafanina, presente nelle verdure crucifere, dopo il loro taglio o consumo alimentare. Entrambe queste molecole arrivano fino al colon in forma stabile, ma si conosce poco sul loro effetto nella prima parte dell'intestino.
Nella celiachia, il funzionamento dell'intestino tenue è alterato dalla malattia e, nonostante la dieta senza glutine controlli i sintomi più gravi, possono persistere infiammazione e stress ossidativo. Con l'obiettivo di valutare se questi vegetali possano essere razionalmente inclusi nelle diete prive di glutine, questo studio ha confrontato l'attività biologica del sulforafano e del suo precursore glucorafanina in un modello cellulare di infiammazione indotta dalla gliadina, la proteina del glutine a cui è attribuito un ruolo chiave nella celiachia.

La malattia celiaca (MC) è una condizione autoimmune cronica, che colpisce l'intestino tenue ed è scatenata dall'ingestione di glutine in individui geneticamente predisposti. Sebbene l'adozione di rigorosi protocolli dietetici privi di glutine sia fondamentale e solitamente efficace nel controllare le gravi manifestazioni patologiche della MC, studi recenti e osservazioni cliniche suggeriscono che in alcuni pazienti possano persistere segni patologici di infiammazione e stress ossidativo, anche in assenza di glutine nella dieta. Questo aspetto sottolinea la necessità di ulteriori strategie nutrizionali o terapeutiche che possano contribuire a ripristinare l'omeostasi intestinale e mitigare questi processi infiammatori persistenti. In questo contesto, l'interesse verso

Foto di WolfBlur

Studi recenti e osservazioni cliniche suggeriscono che in alcuni pazienti possano persistere segni patologici di infiammazione e stress ossidativo, anche in assenza di glutine nella dieta.

composti naturali con proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, da inserire nella dieta come alimenti o integratori alimentari, è in crescita.

I glucosinolati sono metaboliti glicosidici contenenti zolfo e azoto, presenti nelle piante appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae. Le cultivar commestibili di *Brassica oleracea* sono ben note e consumate in tutto il mondo: cavolo, broccoli e cavolfiore rappresentano quindi per l'uomo una fonte rilevante di glucosinolati [1]. Tra queste verdure, i germogli e i semi di broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Planck) sono considerati tra le fonti più ricche di questi composti, sebbene siano presenti anche nei tessuti maturi della pianta, anche se in quantità minori [2].

Il principale glucosinolato presente nei broccoli è la glucorafanina, che viene biotrasformata nell'isotiocianato sulforafano grazie all'azione della mirosinasi, un enzima presente nelle piante e nei batteri, inclusi quelli del microbiota intestinale [2]. Il sulforafano è considerato un composto biologicamente attivo di grande interesse per la salute umana; infatti, diversi autori hanno raccolto prove sul suo potenziale ruolo nella prevenzione del cancro e delle malattie cardiometaboliche [3-5]. L'effetto protettivo delle cultivar di *Brassica oleracea* contro il cancro al colon è stato suggerito da studi epidemiologici e preclinici [6-9]. Secondo molti autori, infatti, il sulforafano rappresenta il principale composto responsabile dell'effetto antitumorale sul colon, grazie alle sue ben note proprietà antiproliferative, antiossidanti e antinfiammatorie [3,8,9].

L'impatto dei glucosinolati sui disturbi intestinali, con particolare riferimento alle malattie di origine infiammatoria, non è ancora del tutto chiaro. Alcune recenti revisioni della letteratura hanno esaminato l'effetto dei germogli di broccoli in modelli murini di colite [10,11], sottolineando così il ruolo cruciale del contenuto di glucosinolati, suggerendo che sono necessari ulteriori studi sull'infiammazione intestinale di diversa origine per favorire la traduzione in studi clinici [11].

È importante notare che la glucorafanina è frequentemente menzionata come un composto stabile e inattivo, che necessita della sua bioconversione in sul-

forafano per esercitare effetti sia a livello intestinale che sistemico [2]. Coerentemente, la letteratura sugli isotiocianati si concentra sul sulforafano come struttura dotata di particolare efficacia nell'uomo, mentre i confronti biologici con il precursore glucorafanina sono rari [5]. D'altra parte, è importante considerare che la glucorafanina potrebbe rimanere stabile durante il transito nel tratto gastrointestinale fino a raggiungere l'intestino crasso [12], sollevando così l'ipotesi di una sua attività biologica anche a livello gastrico e dell'intestino tenue.

Considerando il destino metabolico dei glucosinolati, il nostro gruppo di ricerca ha ipotizzato un potenziale ruolo della glucorafanina nelle condizioni infiammatorie che colpiscono l'intestino tenue, come la MC. In linea con altri disturbi intestinali, la MC attiva è correlata a una barriera intestinale compromessa e a disbiosi [13,14]. Nella MC, la gliadina, la proteina contenuta nel glutine ritenuta responsabile della risposta immunitaria anomala dell'organismo, agisce sia come aptene immunogenico sia come agente pro-infiammatorio: sono stati descritti gli effettori infiammatori coinvolti nel processo autoimmune, come le citochine dell'immunità innata (come IL-1β) e IFN-γ, che svolgono un ruolo ben documentato [15]; al contrario, i meccanismi infiammatori coinvolti nell'effetto diretto della gliadina sugli enterociti sono ancora poco chiari. Secondo la letteratura, potrebbero includere la via di NF-κB [16], la via di JAK/STAT [17] e l'interazione con i recettori delle chemochine CXC, come CXCR3 [18].
Indipendentemente dal contesto autoimmune della MC, diversi studi hanno anche suggerito che l'omeostasi intestinale possa essere direttamente alterata da peptidi non digeriti della gliadina, i quali possono indurre stress ossidativo in diversi modelli sperimentali: per esempio, la gliadina è stata coinvolta nel danneggiamento del DNA a livello intestinale, come dimostrato dalla fosforilazione di γ-H2AX sia in studi *in vitro* che istologici [19]. Nonostante le gravi conseguenze causate dalla MC, che sono efficacemente prevenute mediante l'eliminazione del glutine dalla dieta, come già affermato, i marcatori di stress ossidativo e infiammazione possono persistere nei pazienti celiaci [15,20,21].
Studi precedenti effettuati dal nostro gruppo di ricerca hanno sostenuto il potenziale valore di composti antiossidanti provenienti da alimenti senza glutine, come i cereali pigmentati, per comporre diete sane dedicate alle persone celiache [22,23].
Di conseguenza, con questo lavoro abbiamo voluto confrontare l'effetto biologico di glucorafanina e sulforafano in un modello di epitelio intestinale umano (cellule CaCo-2), sottoposto a stress da gliadina e citochine pro-infiammatorie coinvolte nelle malattie autoimmuni, con l'obiettivo di valutare se le verdure crucifere possano essere razionalmente incluse nelle diete prive di glutine grazie al loro contenuto di glucosinolati.
La metodologia adottata nello studio è stata progettata per valutare in modo completo l'attività biologica della glucorafanina e del sulforafano su modelli cellulari intestinali, replicando le condizioni infiammatorie e ossidative rilevanti per la celiachia. Tutti i materiali e reagenti sono stati selezionati per garantire la riproducibilità e l'affidabilità degli esperimenti.

Effetto della glucorafanina e del sulforafano sui markers infiammatori e ossidativi nelle cellule CaCo-2

Nei precedenti lavori del nostro gruppo di ricerca [22,23], abbiamo osservato che l'aggiunta

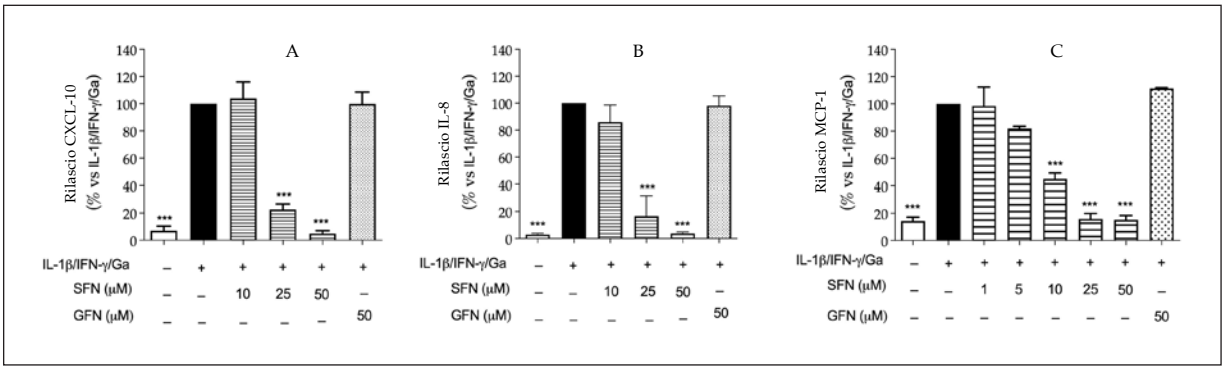

Figura 1. Effetto del sulforafano e della glucorafanina sul rilascio di chemochine da parte delle cellule CaCo-2. Il rilascio di CXCL-10 (**A**), IL-8 (**B**) e MCP-1 (**C**) è stato misurato mediante saggio ELISA. Le cellule sono state trattate con sulforafano (SFN, linee orizzontali) o glucorafanina (GFN, puntini), in aggiunta alla combinazione pro-infiammatoria di IL-1β, IFN-γ (10 ng/mL) e gliadina digerita (Ga, 1 mg/mL) (barra nera), per 24 ore. L'apigenina a 20 μM è stata utilizzata come inibitore di riferimento del rilascio di CXCL-10 (-30%), IL-8 (-16%) e MCP-1 (-30%). I dati provenienti da esperimenti indipendenti (n=3) sono riportati come media del rilascio (% ± SEM) rispetto allo stimolo, al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore del 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. stimolo.

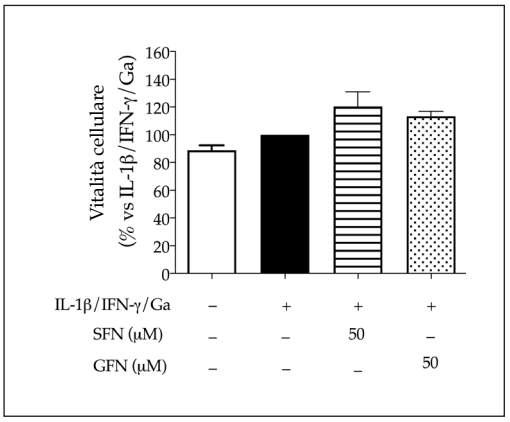

Figura 2. Vitalità cellulare misurata mediante saggio MTT. Le cellule CaCo-2 sono state trattate con sulforafano (SFN, linee orizzontali) o glucorafanina (GFN, punti), in aggiunta alla combinazione pro-infiammatoria di IL-1β, IFN-γ (10 ng/mL) e gliadina digerita (Ga) (barra nera), per 24 ore. I dati provenienti da esperimenti indipendenti (n = 3) sono stati riportati come assorbanza media (% ± SEM) rispetto allo stimolo, al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore del 100%.

di gliadina digerita (1 mg/mL) a IL-1β e IFN-γ (10 ng/mL) aumentava il rilascio delle chemochine IL-8, CXCL-10 e MCP-1 da parte delle cellule CaCo-2. Pertanto, all'inizio di questo studio è stato applicato lo stesso protocollo sperimentale per confrontare l'attività biologica di glucorafanina e sulforafano.
Il sulforafano ha inibito il rilascio di tutte le chemochine selezionate a concentrazioni inferiori a 50 μM (Figura 1A, 1B, 1C). Al contrario, la glucorafanina non ha mostrato alcun effetto inibitorio a 50 μM. L'effetto inibitorio del sulforafano si è dimostrato concentrazione-dipendente, risultando più marcato contro il rilascio di MCP-1 (IC_{50} di 7.81 μM). La vitalità cellulare non è stata significativamente alterata dalle molecole in studio (Figura 2).

Il processo infiammatorio è stato associato a stress ossidativo e danno al DNA in campioni intestinali di pazienti celiaci [15,19-21]. Uno studio ha suggerito che la stessa gliadina digerita (500 μg/mL) possa indurre un lieve aumento della produzione di ROS e della fosforilazione dell'istone γ-H2AX (ser 139) nelle cellule CaCo-2, essendo quest'ultimo un marker ben riconosciuto di genotossicità [19].
Nel nostro modello sperimentale, si possono attribuire solo effetti irrilevanti alla gliadina digerita (1 mg/mL) tramite la valutazione dei markers ossidativi (γ-H2AX, ROS) durante 24 h di trattamento. Per questo motivo, i successivi esperimenti sono stati condotti utilizzando perossido di idrogeno (H_2O_2) per riprodurre un contesto pro-ossidante e genotossico.
La fosforilazione di γ-H2AX è stata quindi selezionata come marker precoce di danno al DNA (1 h), mentre le attività di Nrf-2 e catalasi sono state selezionate come indicatori dello stress ossidativo (6 h). Nrf-2 è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di numerosi geni coinvolti nella risposta antiossidante e citoprotettiva, mentre la catalasi è un enzima che svolge un ruolo basilare nella protezione dai ROS, in particolare da H_2O_2. In parallelo, la capacità scavenger diretta dei composti è stata valutata tramite sistemi *cell-free*, come i saggi DPPH e FRAP.
Né il sulforafano né la glucorafanina (25 μM) hanno alterato la fosforilazione di γ-H2AX indotta da H_2O_2, che ha causato un chiaro aumento del numero di foci nucleari (accumuli visibili di proteine o complessi proteina-DNA all'interno del nucleo), come atteso. Il resveratrolo 20 μM, selezionato come composto antiossidante di riferimento per tutti gli esperimenti relativi allo stress ossidativo, ha causato un ulteriore aumento della fosforilazione di γ-H2AX: questa osservazione probabilmente riflette un potenziamento dei sistemi di riparazione del DNA e dei segnali apoptotici, considerato un fattore positivo contro la progressione tumorale [30]. Un'indicazione ulteriore è stata ottenuta utilizzando uno scavenger diretto come l'ascorbato (100 μM), che ha mostrato risultati identici al resveratrolo nei nostri set sperimentali.
In linea con questi dati, i composti solforati non hanno mostrato potere scavenger nei saggi di valutazione dell'attività antiossidante DPPH e FRAP alla concentrazione di 200 μM, in confronto al resveratrolo 100 μM (Tabella 1).

Durante il danno ossidativo, la fosforilazione di γ-H2AX è necessaria per attivare non solo le vie responsabili della riparazione del DNA, ma anche le difese antiossidanti in cui è coinvolto Nrf-2 [31]. Pertanto, l'attività trascrizionale di Nrf-2 è stata misurata in correlazione ai livelli di catalasi, per delineare un quadro più completo delle potenziali proprietà antiossidanti dei composti solforati.
H_2O_2 (1 mM) ha causato una diminuzione, anche se contenuta, sia dell'attività di Nrf-2 sia di quella della catalasi, sebbene significativa solo per la prima. Dati simili sono stati ottenuti da altri autori in cellule HepG2 (linea cellulare di carcinoma epatico) trattate con H_2O_2 1 mM [32]. Sorprendentemente, il sulforafano ha ulteriormente ridotto l'attività di Nrf-2 in maniera concentrazione-dipendente, mentre la glucorafanina ha mostrato un effetto opposto (Figura 3A). Anche in questo caso, il resveratrolo, usato come antiossidante di riferimento a concentrazione comparabile (20 μM), ha aumentato

Tabella 1. Capacità antiossidante del sulforafano e della glucorafanina, misurata tramite i test DPPH e FRAP.

	DPPH (μM GAE ± S.D.)	FRAP (μM $FeSO_4$ ± S.D.)
SFN (200 μM)	n.d.	n.d.
GFN (200 μM)	n.d.	n.d.
Resv. (100 μM)	26.63 ± 2.37	333.98 ± 9.67

l'attività di Nrf-2 di oltre due volte rispetto a H_2O_2.
Questa osservazione non si è riflessa in una modulazione rilevante della catalasi, poiché né l'attività enzimatica (Figura 3B), né l'espressione genica (Figura 4) sono state significativamente alterate da H_2O_2 o dai composti solforati. Da notare che lo stesso effetto è stato osservato dopo trattamento delle cellule con resveratrolo.
Per comprendere meglio questi risultati, l'interferenza con la vitalità cellulare è stata esclusa tramite test MTT a 24 h, supportando così l'ipotesi che H_2O_2 e le molecole pure possano modulare l'attività di Nrf-2 tramite meccanismi indipendenti da effetti citotossici o antiproliferativi.
La via di Nrf-2 è ampiamente considerata uno dei principali target del sulforafano, anche in studi sperimentali dedicati alla colite [10,11]. È noto che segnali dipendenti da Nrf-2 possono spiegare l'attività antinfiammatoria del sulforafano tramite l'inibizione di NF-κB, sebbene i meccanismi precisi d'azione siano ancora poco chiari. Tuttavia,

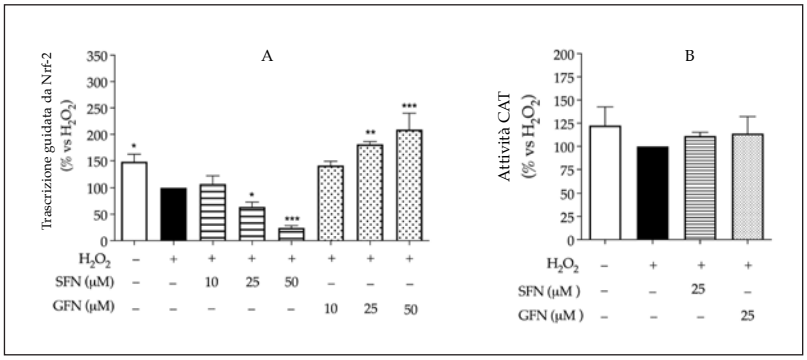

Figura 3. Effetto del sulforafano e della glucorafanina sulla trascrizione mediata da Nrf-2 e sull'attività della catalasi nelle cellule CaCo-2. L'attività di Nrf-2 è stata misurata dopo la trasfezione del plasmide tramite saggio con luciferasi (**A**), mentre l'attività della catalasi è stata misurata tramite saggio enzimatico (**B**). Le cellule sono state trattate con sulforafano (SFN, linee orizzontali) o glucorafanina (GFN, puntini) per 6 ore, in aggiunta allo stimolo pro-ossidante H_2O_2 1 mM. Il resveratrolo 20 μM è stato utilizzato come induttore di riferimento di Nrf-2 (+220%). I dati di esperimenti indipendenti (n=3) sono riportati come attività media (% ± SEM) rispetto allo stimolo (barra nera), al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore di 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. stimolo.

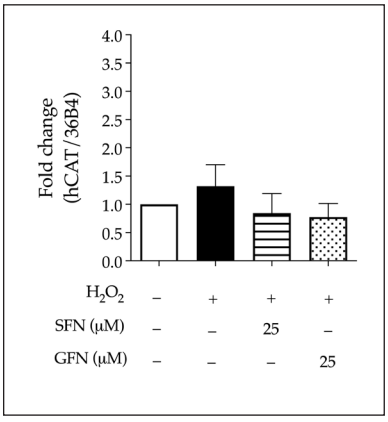

Figura 4. Espressione genica del gene della catalasi (hCAT) misurata tramite RT-PCR nelle cellule CaCo-2. Le cellule sono state trattate con sulforafano (SFN, linee orizzontali) o glucorafanina (GFN, puntini), in aggiunta allo stimolo pro-ossidante H_2O_2 (1 mM) (barra nera), per 6 ore. I dati provenienti da esperimenti indipendenti (n=3) sono stati riportati come variazione relativa di espressione (fold change, % ± SEM) rispetto al controllo non trattato (barra bianca), al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore di 1.

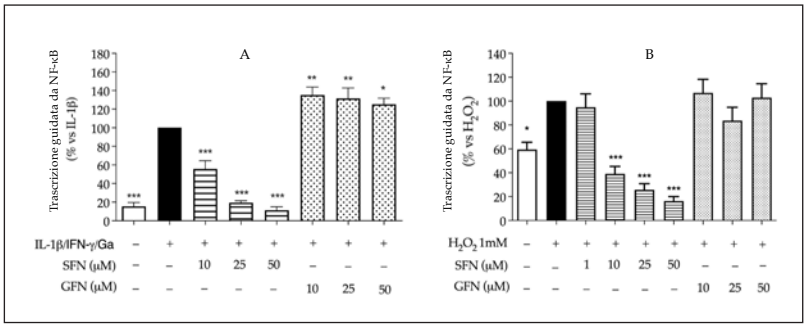

Figura 5. Effetto del sulforafano e della glucorafanina sulla trascrizione mediata da NF-κB nelle cellule CaCo-2. L'attività di NF-κB è stata misurata dopo trasfezione del plasmide mediante saggio della luciferasi. Le cellule sono state trattate con sulforafano (SFN, linee orizzontali) o glucorafanina (GFN, puntini) per 6 ore, in aggiunta alla combinazione pro-infiammatoria di IL-1β, IFN-γ (10 ng/mL) e gliadina digerita (Ga, 1 mg/mL) (**A**), oppure con uno stimolo pro-ossidante H_2O_2 1 mM (**B**). Apigenina 20 μM e resveratrolo 20 μM sono stati utilizzati come inibitori di riferimento (-97% e -90%, rispettivamente). I dati provenienti da esperimenti indipendenti (n=3) sono riportati come luminescenza media (% ± SEM) rispetto allo stimolo (barra nera), al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore del 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. stimolo.

il ruolo della glucorafanina è generalmente considerato trascurabile.

L'osservazione che entrambe le molecole modulassero l'attività di Nrf-2 nel nostro modello ha spinto a ulteriori indagini sulle potenziali conseguenze sulla via di NF-κB. Con questo obiettivo, l'attività di NF-κB è stata misurata tramite il saggio della luciferasi, una tecnica che permette appunto di misurare l'attività trascrizionale, in condizioni infiammatorie e ossidative.

Come previsto, il sulforafano ha mostrato un'attività inibitoria sulla trascrizione guidata da NF-κB, con effetto concentrazione-dipendente. Infatti, la trascrizione guidata da NF-κB indotta dalla combinazione pro-infiammatoria è stata inibita con una IC_{50} di 9.75 μM; la glucorafanina ha mostrato effetto opposto rispetto al sulforafano, aumentando leggermente l'attività di NF-κB a tutte le concentrazioni testate (Figura 5A). Questo dato è coerente con i risultati relativi al rilascio delle chemochine, descritti in Figura 1.

Il sulforafano ha mostrato inoltre effetto inibitorio quando NF-κB è stato stimolato da H_2O_2 (Figura 5B); tuttavia, l'attività trascrizionale è risultata ridotta al di sotto del livello basa-

Markers infiammatori	IC_{50} (μM) del sulforafano
CXCL-10	23.55
IL-8	15.74
MCP-1	7.81
NF-κB	9.75
Ga, gliadina digerita *in vitro* (1 mg/mL)	

Tabella 2. Riepilogo dell'IC_{50} del sulforafano sui markers infiammatori misurati nelle cellule CaCo-2 stimolate con un cocktail pro-infiammatorio contenente gliadina digerita (IL-1β, IFN-γ, Ga).

Foto di Renee Grayson

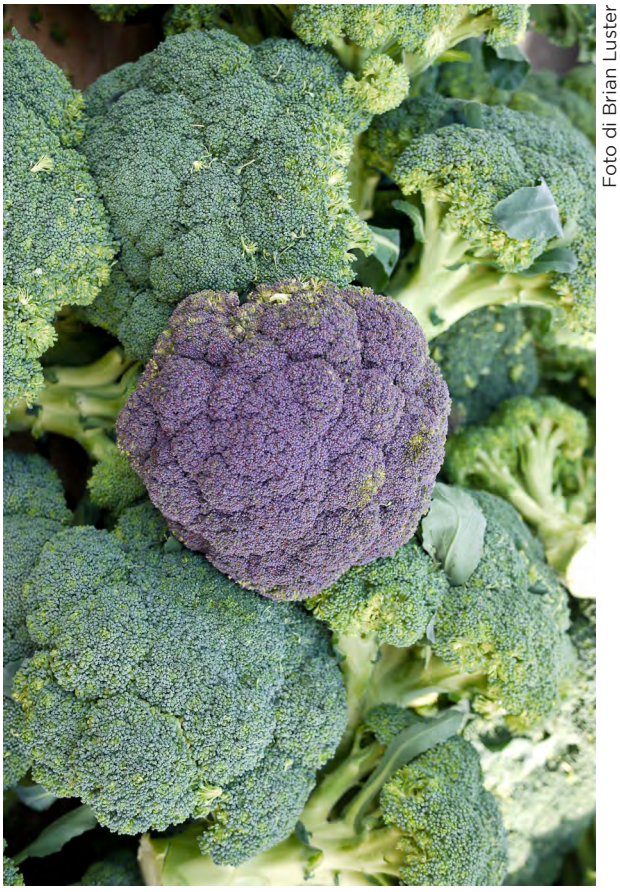

Foto di Brian Luster

Le cultivar commestibili di *Brassica oleacea* sono ben note e consumate in tutto il mondo: cavolo, broccoli e cavolfiore rappresentano quindi per l'uomo una fonte rilevante di glucosinolati.

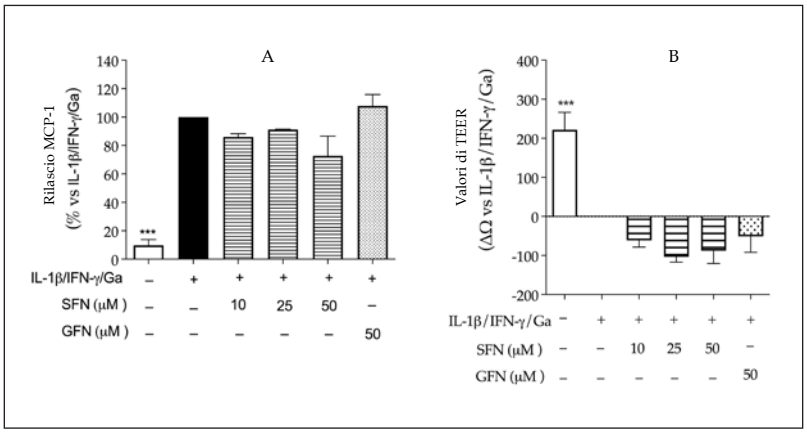

Figura 6. Effetto del sulforafano e della glucorafanina sulla barriera epiteliale CaCo-2 (modello Transwell®). Le cellule sono state trattate con sulforafano (SFN, linee orizzontali) o glucorafanina (GFN, puntini) per 24 ore, in aggiunta alla combinazione pro-infiammatoria di IL-1β, IFN-γ (10 ng/mL) e gliadina digerita (Ga, 1 mg/mL). (**A**) Il rilascio di MCP-1 è stato misurato tramite saggio ELISA. I dati provenienti da esperimenti indipendenti (n=3) sono riportati come rilascio medio (%) ± SEM rispetto allo stimolo (barra nera), al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore del 100%. (**B**) L'integrità epiteliale è stata misurata come variazione normalizzata della TEER (ΔΩ = Ωt24h - Ωt0). I dati di esperimenti indipendenti (n=4) sono riportati come ΔΩ normalizzata ± SEM rispetto allo stimolo, al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore di 0. Il butirrato di sodio a 2 mM è stato utilizzato come inibitore di riferimento per il rilascio di MCP-1 (-40%) e come fattore trofico per la barriera epiteliale (+40 Ω). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ rispetto allo stimolo.

le del controllo non stimolato, mostrando un parallelismo con i dati precedenti su Nrf-2. Al contrario, la glucorafanina non è stata in grado di modulare l'attività di NF-κB in questo contesto. Per un miglior confronto delle concentrazioni inibitorie misurate per diversi markers infiammatori, quando possibile, sono stati calcolati i valori di IC_{50} e riassunti nella Tabella 2.

A questo punto del nostro lavoro, ci siamo chiesti se l'attività biologica potesse implicare un effetto protettivo sull'integrità della barriera intestinale, che risulta compromessa nella celiachia [13,14]. A tale scopo, sulforafano e glucorafanina sono stati studiati in cellule CaCo-2 differenziate a enterociti, coltivate su supporti Transwell®.
Con l'obiettivo di distinguere un'azione diretta sulla barriera epiteliale rispetto a un effetto indiretto mediato dalle cellule immunitarie, gli esperimenti sono stati condotti secondo due diversi setting sperimentali:
a) stimolazione delle CaCo-2 con la combinazione pro-infiammatoria di IL-1β, IFN-γ e gliadina digerita;
b) co-coltura di CaCo-2 con macrofagi THP-1, stimolati con LPS e IFN-γ.
Esperimenti dedicati ai setting sperimentali hanno escluso che la sola gliadina, o la combinazione di LPS con IFN-γ in assenza di macrofagi, potessero compromettere l'integrità epiteliale.
Per quanto riguarda il primo setting sperimentale, né il sulforafano (10, 25, 50 μM) né la glucorafanina (50 μM) sono stati in grado di ridurre il rilascio della chemochina MCP-1 (Figura 6A), selezionato come marker infiammatorio dato che svolge un ruolo chiave nel fenomeno infiammatorio, né di ripristinare l'integrità epiteliale (valori TEER, resistenza elettrica trans-epiteliale, che forniscono informazioni sulla funzionalità di barriera dello strato epiteliale, correlata alla sua struttura e spessore), compromessa dalla combinazione pro-infiammatoria di IL-1β, IFN-γ e gliadina digerita (Figura 6B).
Per quanto riguarda il secondo setting sperimentale, il sulforafano è stato in grado di ridurre il rilascio di MCP-1 e IL-1β, con una IC_{50} rispettivamente di 20.60 μM e 1.50 μM (Figura 7A, Figura 7B). Ha inoltre ripristinato l'integrità epiteliale a concentrazioni comprese tra 10 e 50 μM, con un effetto paragonabile a quello del composto di riferimento butirrato di sodio, utilizzato però a concentrazioni più elevate (2 mM) (Figura 7C).
Da notare che la glucorafanina, selezionata alla concentrazione di 50 μM, ha mostrato effetti protettivi simili sulla barriera epite-

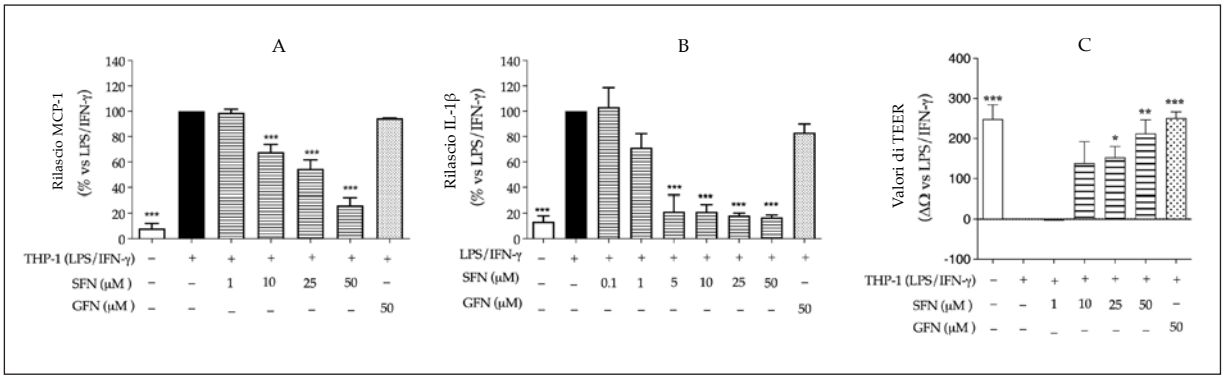

Figura 7. Effetto del sulforafano e della glucorafanina sulla barriera epiteliale nelle co-colture di cellule Ca-Co-2 e macrofagi THP-1 (modello Transwell®). Le cellule sono state trattate con sulforafano (SFN, linee orizzontali) o glucorafanina (GFN, puntini) per 24 ore, in aggiunta alla combinazione pro-infiammatoria di LPS (100 ng/mL) e IFN-γ (10 ng/mL). (**A**, **B**) Il rilascio di MCP-1 e IL-1β è stato misurato mediante saggio ELISA su terreni raccolti rispettivamente dalle co-colture o da THP-1. I dati derivanti da esperimenti indipendenti (n=3) sono riportati come rilascio medio (%) ± SEM rispetto allo stimolo (barra nera), al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore del 100%. (**C**) L'integrità epiteliale è stata misurata come variazione normalizzata della TEER (ΔΩ = Ωt24h - Ωt0). I dati derivanti da esperimenti indipendenti (n=4) sono riportati come ΔΩ normalizzato ± SEM rispetto allo stimolo, al quale è stato arbitrariamente attribuito il valore di 0. Il butirrato di sodio a 2 mM è stato utilizzato come inibitore di riferimento del rilascio di MCP-1 (-17%) e come fattore trofico per la barriera epiteliale (+220 Ω). L'apigenina a 20 μM è stata utilizzata come inibitore di riferimento dell'IL-1β (-72%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ rispetto allo stimolo.

liale, senza tuttavia evidenziare proprietà antinfiammatorie.

Quantificazione del sulforafano prima e dopo la digestione gastrointestinale *in vitro* dell'estratto

Poiché il sulforafano ha mostrato l'attività biologica più interessante, abbiamo deciso di verificarne la possibile stabilità a livello dell'intestino tenue, con una stima a partire da un estratto complesso derivato da una fonte alimentare di sulforafano, *Brassica oleracea*. I germogli di broccolo sono stati processati ed estratti con l'obiettivo di ottenere la completa conversione della glucorafanina in sulforafano. Successivamente, l'estratto è stato sottoposto a digestione gastrointestinale simulata come descritto in un precedente studio [22] e analizzato quantitativamente tramite HPLC-MS.

L'HPLC-MS ha mostrato che il sulforafano era presente nell'estratto, mentre la glucorafanina era assente. La quantità di sul-

Foto di HQ Flower Guide

Brassica oleracea. Il sulforafano è un composto attivo che si forma a partire dalla glucorafanina, presente nelle verdure crucifere, dopo il loro taglio o consumo alimentare.

forafano è risultata leggermente aumentata dopo la digestione, passando da 385 μg/g di materiale vegetale prima della digestione gastrointestinale *in vitro* a 503 μg/g dopo il processo digestivo. Questo dato suggerisce che il sulforafano eventualmente presente nella matrice vegetale possa rimanere stabile nel lume intestinale, in linea con quanto riportato in letteratura a riguardo [11].

Discussione

La glucorafanina, un glucosinolato presente nelle verdure crucifere è considerata un precursore inerte del sulforafano, il quale esercita numerose attività biologiche in modelli animali e studi sull'uomo, incluse quelle antiossidanti e antinfiammatorie [2-5]. Nonostante sia stato riportato che la glucorafanina attraversi il lume intestinale in forma stabile fino a raggiungere il microbiota del colon [2], la sua attività biologica, così come quella del sulforafano, è stata scarsamente indagata in riferimento al primo tratto del sistema digerente. Di conseguenza, l'obiettivo di questo studio è stato quello di confrontare l'attività biologica del sulforafano con quella del suo precursore glucorafanina in un modello cellulare di infiammazione indotta dalla gliadina, al fine di suggerire un possibile ruolo dietetico nel contesto della celiachia. A tale scopo, sono state selezionate concentrazioni raggiungibili dopo il consumo di verdure, ossia da 1 a 50 μM [2].
Il sulforafano ha inibito il rilascio di tutte le chemochine selezionate (IL-8, CXCL-10 e MCP-1), le quali rivestono un ruolo cruciale nel reclutamento dei leucociti; in particolare, è stato osservato un effetto più marcato sull'attrattore dei monociti MCP-1 (IC_{50} di 7.81 μM), anche rispetto all'inibitore di riferimento apigenina (Figura 1). Al contrario, la glucorafanina non è stata in grado di ridurre il rilascio di chemochine. Il meccanismo inibitorio del sulforafano è stato attribuito alla sua modulazione della via di NF-κB, la quale è risultata compromessa a concentrazioni comparabili (IC_{50} di 9.75 μM) (Figura 4A).
Per quanto riguarda i markers di stress ossidativo, le molecole non hanno mostrato effetto sulla fosforilazione di γ-H2AX

A. MINARDI & FIGLI S.R.L.

Via Boncellino 32 - 48012 Bagnacavallo (Ra)

90 anni di esperienza nella lavorazione e nel commercio all'ingrosso delle piante officinali

Tel. (0545) 61460 – Fax (0545) 60686 – http: www.minardierbe.it – e-mail: info@minardierbe.it

Foto di Forest and Kim Starr

L'effetto protettivo delle cultivar di *Brassica oleracea* contro il cancro al colon è stato suggerito da studi epidemiologici e preclinici.

alla concentrazione di 25 μM (Figura 2), contrariamente al resveratrolo, il cui effetto è stato interpretato come antiproliferativo in accordo con precedenti lavori [30]. Il risultato potrebbe essere spiegato, almeno in parte, dalla mancanza di capacità scavenger diretta osservata nei saggi DPPH e FRAP, ancora una volta in contrasto con le proprietà del resveratrolo (Tabella 2). Tuttavia, conclusioni simili riguardo l'attività antiossidante del sulforafano sono state precedentemente riportate da altri autori, i quali hanno suggerito che siano coinvolti meccanismi biologici piuttosto che attività scavenger [33]. Infatti, eventi successivi tipici dello stress ossidativo, come l'attivazione di Nrf-2 e NF-κB, sono stati modulati dai composti, inclusa la glucorafanina, supportando così il concetto che le molecole possano modulare attività biologiche a livello cellulare. Più precisamente, le due molecole hanno mostrato effetti divergenti sui due fattori di trascrizione, generalmente inibiti dal sulforafano, mentre la glucorafanina ha mostrato effetti trascurabili su NF-κB e ha indotto l'attività di Nrf-2 senza influenzare i livelli di catalasi (Figura 3A, Figura 4A, Figura 4B).

È evidente che l'effetto antiossidante esercitato dal glucosinolato puro e dal suo metabolita sia più complesso da spiegare rispetto al solo effetto antinfiammatorio. Una possibile limitazione potrebbe riguardare l'utilizzo di cellule tumorali, come nel caso delle CaCo-2, poiché il danno al DNA e la modulazione di Nrf-2 sono meccanismi condivisi da composti antiproliferativi, quali resveratrolo e sulforafano [34,35]. Inoltre, è noto che il sulforafano induce Nrf-2 e inibisce NF-κB tramite vie complesse, tra cui, fra le altre, l'aumentata produzione di H_2S e l'inibizione delle HDAC, una famiglia di enzimi che svolge un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica e della struttura della cromatina e che sono implicati nello sviluppo e nella crescita di diversi tipi di tumore [36,37]. Al contrario, il meccanismo d'azione della glucorafanina è meno caratterizzato, rappresentando dunque un elemento di novità.

A questo proposito, riteniamo che l'impostazione sperimentale adottata per studiare lo

stress ossidativo, basata sull'uso di H_2O_2 (1 mM) in confronto al resveratrolo (20 μM), abbia permesso di formulare diverse ipotesi sui composti studiati. Nei limiti dei nostri setting, il resveratrolo ha aumentato la fosforilazione di γ-H2AX, incrementato l'attività di Nrf-2 e ridotto l'attività di NF-κB, riflettendo così il quadro della riparazione del DNA e della difesa antiossidante [31]. La bioattività della glucorafanina e del sulforafano non è risultata né comparabile a quella del resveratrolo né sovrapponibile tra loro. Infatti, le molecole hanno mostrato effetti divergenti su markers infiammatori e ossidativi.

Nelle cellule CaCo-2 differenziate, coltivate su supporto Transwell®, l'attività antinfiammatoria del sulforafano è stata ancora osservabile durante la co-coltura con macrofagi attivati (THP-1). Infatti, il rilascio di MCP-1 e IL-1β è stato ridotto a basse concentrazioni μM (Figura 6). Di conseguenza, la glucorafanina non è risultata attiva in questo contesto infiammatorio. Tuttavia, entrambe le molecole hanno permesso un recupero della resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER), suggerendo così un ruolo per la glucorafanina nella protezione dell'integrità della barriera epiteliale. A questo proposito, NF-κB e HDAC sono riconosciuti come target del sulforafano, ma sono anche influenzati da fattori trofici per la mucosa intestinale, come il butirrato, utilizzato come composto di riferimento nei nostri esperimenti [26]. A nostra conoscenza, la relazione struttura-attività della glucorafanina rispetto alle isoforme HDAC è ancora inesplorata.

Al contrario, l'effetto sulla funzione di barriera era assente quando il modello Transwell® veniva stimolato dal cocktail pro-infiammatorio contenente gliadina, sottolineando che diversi meccanismi alla base del danno epiteliale si sono verificati nelle nostre condizioni sperimentali. Nel primo caso, mediatori provenienti dai macrofagi, che plausibilmente includono proteasi, insulti ossidativi e segnali infiammatori, erano necessari per indurre il danno epiteliale. Infatti, LPS e

La glucorafanina, un glucosinolato presente nelle verdure crucifere, è considerata un precursore inerte del sulforafano, il quale esercita numerose attività biologiche in modelli animali e studi sull'uomo.

Nella celiachia, il funzionamento dell'intestino tenue è alterato dalla malattia e, nonostante la dieta senza glutine controlli i sintomi più gravi, possono persistere infiammazione e stress ossidativo.

IFN-γ, ossia i trigger dell'attivazione macrofagica, erano incapaci di causare alterazioni del TEER quando usati singolarmente. Nel secondo caso, un danno diretto è stato causato da citochine (IL-1β, IFN-γ) e gliadina sulla barriera epiteliale.

Pertanto, è plausibile che l'attività di sulforafano e glucorafanina nella protezione della barriera possa derivare da un effetto antinfiammatorio sui macrofagi; in linea con la nostra ipotesi, questo meccanismo è stato già riportato per il sulforafano da altri autori [38].

A tal proposito, ulteriori esperimenti dovrebbero essere dedicati a una comprensione approfondita dei meccanismi riconducibili alla struttura molecolare della glucorafanina rispetto al sulforafano.

Conclusione

Per quanto a nostra conoscenza, questo è uno dei primi studi in cui sulforafano e glucorafanina sono stati considerati come composti dietetici di potenziale interesse per regimi alimentari salutari dedicati a persone celiache [39]. L'indagine sull'attività biologica del sulforafano nelle cellule epiteliali intestinali, con particolare attenzione all'infiammazione indotta dalla gliadina, rappresenta un elemento di novità; inoltre, pochi autori in precedenza hanno preso in considerazione il confronto con i suoi precursori [37] che, a nostro avviso, non dovrebbero essere considerati esclusivamente come composti pro-attivi.

L'attività antinfiammatoria e antiossidante del sulforafano è stata dimostrata a concentrazioni vicine a quelle disponibili dopo somministrazione orale *in vivo* [2,38]. Inoltre, questo lavoro fornisce ulteriori approfondimenti sugli effetti biologici della glucorafanina nel primo tratto del lume intestinale, con ripercussioni su aspetti legati alla qualità dei prodotti a base di piante crucifere presenti negli alimenti e nei preparati farmaceutici.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
**** Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti"***
***** Naturalsalus S.r.l.***

Bibliografia

1. Prieto, M.A.; Lopez, C.J.; Simal-Gandara, J. Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Adv Food Nutr Res* **2019**, *90*, 305-350, doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.008.
2. Yagishita, Y.; Fahey, J.W.; Dinkova-Kostova, A.T.; Kensler, T.W. Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/molecules24193593.
3. Traka, M.; Gasper, A.V.; Melchini, A.; Bacon, J.R.; Needs, P.W.; Frost, V.; Chantry, A.; Jones, A.M.; Ortori, C.A.; Barrett, D.A.; et al. Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate. *PLoS One* **2008**, *3*, e2568, doi:10.1371/journal.pone.0002568.
4. Gasmi, A.; Gasmi Benahmed, A.; Shanaida, M.; Chirumbolo, S.; Menzel, A.; Anzar, W.; Arshad, M.; Cruz-Martins, N.; Lysiuk, R.; Beley, N.; et al. Anticancer activity of broccoli, its organosulfur and polyphenolic compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2023**, 1-19, doi:10.1080/10408398.2023.2195493.
5. Mthembu, S.X.H.; Mazibuko-Mbeje, S.E.; Moetlediwa, M.T.; Muvhulawa, N.; Silvestri, S.; Orlando, P.; Nkambule, B.B.; Muller, C.J.F.; Ndwandwe, D.; Basson, A.K.; et al. Sulforaphane: A nutraceutical against diabetes-related complications. *Pharmacol Res* **2023**, *196*, 106918, doi:10.1016/j.phrs.2023.106918.
6. Graham, S.; Dayal, H.; Swanson, M.; Mittelman, A.; Wilkinson, G. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* **1978**, *61*, 709-714.
7. Tse, G.; Eslick, G.D. Cruciferous vegetables and risk of colorectal neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Cancer* **2014**, *66*, 128-139, doi:10.1080/01635581.2014.852686.
8. Lippmann, D.; Lehmann, C.; Florian, S.; Barknowitz, G.; Haack, M.; Mewis, I.; Wiesner, M.; Schreiner, M.; Glatt, H.; Brigelius-Flohe, R.; et al. Glucosinolates from pak choi and broccoli induce enzymes and inhibit inflammation and colon cancer differently. *Food Funct* **2014**, *5*, 1073-1081, doi:10.1039/c3fo60676g.
9. Bessler, H.; Djaldetti, M. Broccoli and human health: immunomodulatory effect of sulforaphane in a model of colon cancer. *Int J Food Sci Nutr* **2018**, *69*, 946-953, doi:10.1080/09637486.2018.1439901.
10. Holman, J.; Hurd, M.; Moses, P.L.; Mawe, G.M.; Zhang, T.; Ishaq, S.L.; Li, Y. Interplay of broccoli/broccoli sprout bioactives with gut microbiota in reducing inflammation in inflammatory bowel diseases. *J Nutr Biochem* **2023**, *113*, 109238, doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109238.
11. Wei, L.Y.; Zhang, J.K.; Zheng, L.; Chen,

Y. The functional role of sulforaphane in intestinal inflammation: a review. *Food Funct* **2022**, *13*, 514-529, doi:10.1039/d1fo03398k.
12. Lai, R.H.; Miller, M.J.; Jeffery, E. Glucoraphanin hydrolysis by microbiota in the rat cecum results in sulforaphane absorption. *Food Funct* **2010**, *1*, 161-166, doi:10.1039/c0fo00110d.
13. Vancamelbeke, M.; Vermeire, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *11*, 821-834, doi:10.1080/17474124.2017.1343143.
14. Caio, G.; Lungaro, L.; Segata, N.; Guarino, M.; Zoli, G.; Volta, U.; De Giorgio, R. Effect of Gluten-Free Diet on Gut Microbiota Composition in Patients with Celiac Disease and Non-Celiac Gluten/Wheat Sensitivity. *Nutrients* **2020**, *12*, doi:10.3390/nu12061832.
15. Ramirez-Sanchez, A.D.; Tan, I.L.; Gonera-de Jong, B.C.; Visschedijk, M.C.; Jonkers, I.; Withoff, S. Molecular Biomarkers for Celiac Disease: Past, Present and Future. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21228528.
16. Capozzi, A.; Vincentini, O.; Gizzi, P.; Porzia, A.; Longo, A.; Felli, C.; Mattei, V.; Mainiero, F.; Silano, M.; Sorice, M.; et al. Modulatory Effect of Gliadin Peptide 10-mer on Epithelial Intestinal CACO-2 Cell Inflammatory Response. *PLoS One* **2013**, *8*, e66561, doi:10.1371/journal.pone.0066561.
17. De Stefano, D.; Maiuri, M.C.; Iovine, B.; Ialenti, A.; Bevilacqua, M.A.; Carnuccio, R. The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med (Berl)* **2006**, *84*, 65-74, doi:10.1007/s00109-005-0713-x.
18. Lammers, K.M.; Lu, R.; Brownley, J.; Lu, B.; Gerard, C.; Thomas, K.; Rallabhandi, P.; Shea-Donohue, T.; Tamiz, A.; Alkan, S.; et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 194-204 e193, doi:10.1053/j.gastro.2008.03.023.
19. Monguzzi, E.; Marabini, L.; Elli, L.; Vaira, V.; Ferrero, S.; Ferretti, F.; Branchi, F.; Gaudioso, G.; Scricciolo, A.; Lombardo, V.; et al. Gliadin effect on the oxidative balance and DNA damage: An in-vitro, ex-vivo study. *Dig Liver Dis* **2019**, *51*, 47-54, doi:10.1016/j.dld.2018.06.020.
20. Odetti, P.; Valentini, S.; Aragno, I.; Garibaldi, S.; Pronzato, M.A.; Rolandi, E.; Barreca, T. Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. *Free Radic Res* **1998**, *29*, 17-24, doi:10.1080/10715769800300031.
21. Szaflarska-Poplawska, A.; Siomek, A.; Czerwionka-Szaflarska, M.; Gackowski, D.; Rozalski, R.; Guz, J.; Szpila, A.; Zarakowska, E.; Olinski, R. Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2010**, *19*, 1960-1965, doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0295.
22. Piazza, S.; Colombo, F.; Bani, C.; Fumagalli, M.; Vincentini, O.; Sangiovanni, E.; Martinelli, G.; Biella, S.; Silano, M.; Restani, P.; et al. Evaluation of the Potential Anti-Inflammatory Activity of Black Rice in the Framework of Celiac Disease. *Foods* **2022**, *12*, doi:10.3390/foods12010063.
23. Piazza, S.; Bani, C.; Colombo, F.; Mercogliano, F.; Pozzoli, C.; Martinelli, G.; Petroni, K.; Roberto Pilu, S.; Sonzogni, E.; Fumagalli, M.; et al. Pigmented corn as a gluten-free source of polyphenols with anti-inflammatory and antioxidant properties in CaCo-2 cells. *Food Research International* **2024**, *191*, doi:10.1016/j.foodres.2024.114640.
24. Le, N.P.K.; Altenburger, M.J.; Lamy, E. Development of an Inflammation-Triggered In Vitro "Leaky Gut" Model Using Caco-2/HT29-MTX-E12 Combined with Macrophage-like THP-1 Cells or Primary Human-Derived Macrophages. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24087427.
25. Hoensch, H.P.; Weigmann, B. Regulation of the intestinal immune system by flavonoids and its utility in chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2018**, *24*, 877-881, doi:10.3748/wjg.v24.i8.877.
26. Huang, X.; Oshima, T.; Tomita, T.; Fukui, H.; Miwa, H. Butyrate Alleviates Cytokine-Induced Barrier Dysfunction by Modifying Claudin-2 Levels. *Biology (Basel)* **2021**, *10*, doi:10.3390/biology10030205.
27. O'Connell, D.J.; Kolde, R.; Sooknah, M.; Graham, D.B.; Sundberg, T.B.; Latorre, I.; Mikkelsen, T.S.; Xavier, R.J. Simultaneous Pathway Activity Inference and Gene Expression Analysis Using RNA Sequencing. *Cell Syst* **2016**, *2*, 323-334, doi:10.1016/j.cels.2016.04.011.
28. Piazza, S.; Martinelli, G.; Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Fumagalli, M.; Magnavacca, A.; Pozzoli, C.; Canilli, L.; Terno, M.; Angarano, M.; et al. Anti-Inflammatory and Anti-Acne Effects of Hamamelis virginiana Bark in Human Keratinocytes. *Antioxidants (Basel)* **2022**, *11*, doi:10.3390/antiox11061119.
29. Roca, P.; Di Lorenzo, C.; Bani, C.; Mercogliano, F.; Bosso, A.; Restani, P. Valorization of wine industry by-products: Characterization of phenolic profile and investigation of potential healthy properties. *BIO Web of Conferences* **2023**, *68*, doi:10.1051/bioconf/20236804016.
30. Sjakste, N.; Djelic, N.; Dzintare, M.; Zivkovic, L. DNA-BINDING and DNA-protecting activities of small natural organic molecules and food extracts. *Chem Biol Interact* **2020**, *323*, 109030, doi:10.1016/j.cbi.2020.109030.
31. Navrkalova, V.; Kafkova, L.R.; Divoky, V.; Pospisilova, S. Oxidative stress as a therapeutic perspective for ATM-deficient chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica* **2015**, *100*, 994-996, doi:10.3324/haematol.2015.130260.
32. Bollati, C.; Cruz-Chamorro, I.; Aiello, G.; Li, J.; Bartolomei, M.; Santos-Sanchez, G.; Ranaldi, G.; Ferruzza, S.; Sambuy, Y.; Arnoldi, A.; et al. Investigation of the intestinal trans-epithelial transport and antioxidant activity of two hempseed peptides WVSPLAGRT (H2) and IGFLIIWV (H3). *Food Res Int* **2022**, *152*, 110720, doi:10.1016/j.foodres.2021.110720.
33. Fahey, J.W.; Talalay, P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* **1999**, *37*, 973-979, doi:10.1016/s0278-6915(99)00082-4.
34. Demoulin, B.; Hermant, M.; Castrogiovanni, C.; Staudt, C.; Dumont, P. Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis. *Toxicol In Vitro* **2015**, *29*, 1156-1165, doi:10.1016/j.tiv.2015.04.015.
35. Traka, M.; Gasper, A.V.; Smith, J.A.; Hawkey, C.J.; Bao, Y.; Mithen, R.F. Transcriptome analysis of human colon Caco-2 cells exposed to sulforaphane. *J Nutr* **2005**, *135*, 1865-1872, doi:10.1093/jn/135.8.1865.
36. Qu, X.; Proll, M.; Neuhoff, C.; Zhang, R.; Cinar, M.U.; Hossain, M.M.; Tesfaye, D.; Grosse-Brinkhaus, C.; Salilew-Wondim, D.; Tholen, E.; et al. Sulforaphane epigenetically regulates innate immune responses of porcine monocyte-derived dendritic cells induced with lipopolysaccharide. *PLoS One* **2015**, *10*, e0121574, doi:10.1371/journal.pone.0121574.
37. Lucarini, E.; Micheli, L.; Trallori, E.; Citi, V.; Martelli, A.; Testai, L.; De Nicola, G.R.; Iori, R.; Calderone, V.; Ghelardini, C.; et al. Effect of glucoraphanin and sulforaphane against chemotherapy-induced neuropathic pain: Kv7 potassium channels modulation by H_2S release in vivo. *Phytother Res* **2018**, *32*, 2226-2234, doi:10.1002/ptr.6159.
38. Folkard, D.L.; Melchini, A.; Traka, M.H.; Al-Bakheit, A.; Saha, S.; Mulholland, F.; Watson, A.; Mithen, R.F. Suppression of LPS-induced transcription and cytokine secretion by the dietary isothiocyanate sulforaphane. *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58*, 2286-2296, doi:10.1002/mnfr.201400550.
39. Krupa-Kozak, U.; Drabinska, N.; Baczek, N.; Simkova, K.; Starowicz, M.; Jelinski, T. Application of Broccoli Leaf Powder in Gluten-Free Bread: An Innovative Approach to Improve Its Bioactive Potential and Technological Quality. *Foods* **2021**, *10*, doi:10.3390/foods10040819.