

Aneta Kościółek, Ewa Kurzeja, Katarzyna Pawłowska–Góral

OCENA WPŁYWU DIHYDROCHALKONÓW OBECNYCH W JABŁKACH NA AKTYWNOŚĆ METABOLICZNĄ KOMÓREK

Katedra i Zakład Żywności i Żywnienia Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik: dr hab. n. med. *K. Pawłowska - Góral*

Z uwagi na fakt, że jabłka stanowią bogate źródło substancji biologicznie czynnych celem pracy była ocena wpływu floretyny i florydżyny na aktywność metaboliczną komórek. Badania przeprowadzono na fibroblastach mysich hodowanych z dodatkiem floretyny lub florydżyny poddanych stresowi oksydacyjnemu. Stwierdzono, że obecność floretyny i florydżyny zwiększa tolerancję na stres oksydacyjny u badanych fibroblastów.

Hasła kluczowe: jabłka, dihydrochalkony, stres oksydacyjny
Key words: apple, dihydrochalcones, oxidative stress

W ciągu ostatnich kilku lat spożycie owoców i warzyw systematycznie wzrasta. Owoce są bogatym źródłem witamin, soli mineralnych oraz błonnika. Ze względu na cenę oraz dostępność przez cały rok, jabłka są najczęściej spożywanymi owocami (1). W Polsce w 2009 roku ich spożycie wynosiło 16,20 kg/osobę i było wyższe w porównaniu do roku 2008 o 8% (2).

Jabłka i produkty z nich otrzymywane stanowią w diecie bogate źródło związków polifenolowych (3). Zawartość oraz profil związków fenolowych w tych owocach jest zróżnicowana i zależy od odmiany jabłoni, miejsca uprawy, warunków pogodowych oraz czasu i warunków przechowywania owoców. Do głównych związków polifenolowych występujących w jabłkach należą: kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, kwas 4'p kumarylochininowy), flawon-3-ole (katechina, epikatechina), procyanidyny B2 i C1, flawanole (kwercetyna i jej pochodne), antocyjaniny, dihydrochalkony (floretyna, florydżyna, ksyloglukozyd florydżyny) (4, 5).

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań mających na celu poznanie właściwości biologicznych floretyny i florydżyny. Na ich podstawie stwierdzono, iż związki te wykazują aktywność antyoksydacyjną, działają przeciwnowotworowo oraz wpływają na transport glukozy (6). Wyniki badań epidemiologicznych wykazały, że regularne spożywanie jabłek, jako głównego źródła floretyny i florydżyny istotnie zmniejsza ryzyko zapadania na choroby układu krążenia i cukrzycę (7, 8).

Dlatego też, celem pracy była ocena wpływu dihydrochalkonów (floretyny i florydzyiny) na aktywność metaboliczną komórek poddanych działaniu stresu oksydacyjnego.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na fibroblastach izolowanych metodą eksplantów tkanki ze skóry myszy, szczepu Balb c. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej przez Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Na przeprowadzenie badań otrzymano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego.

Hodowlę komórek prowadzono na płynnej pożywce Dulbecco'a MEM w kolbach do hodowli komórkowych o objętości 50 ml i powierzchni hodowlanej 25 cm². Do kolby hodowlanej wlewano 10 ml pożywki wzbogaconej inaktywowaną płodową surowicą bydlęcą do stężenia końcowego 10% oraz 1% dodatkiem antybiotyków: penicyliny (1000 j.m/ml), streptomycyny (10 mg/ml), amfoterycyny B (25 µg/ml). Hodowlę fibroblastów prowadzono w inkubatorze firmy Heraeus w atmosferze powietrza zawierającego 5% (v/v) CO₂, w temperaturze 37°C. W dniu zakładania hodowli do każdej kolby wprowadzano zawiesinę fibroblastów w ilości 500 tys./ml pożywki. Hodowlę prowadzono zgodnie z układem zamieszczonym w Tabeli I. Fibroblasty stanowiące próby badane hodowano w pożywce z dodatkiem floretyny lub florydzyiny oraz siarczaniu (VI) żelaza (II) i kwasu askorbinowego przy użyciu, których wywoływano stres oksydacyjny. Floretynę i florydzyinę rozpuszczano w DMSO, którego stężenie w pożywce nie przekraczało 0,1%.

Czas inkubacji hodowli fibroblastów z dodatkiem badanych flawonoidów wynosił 4 godziny. Po tym czasie wywoływano stres oksydacyjny za pomocą jonów żelaza (II) oraz kwasu askorbinowego. Najpierw przez 15 minut komórki inkubowano z roztworem siarczaniu żelaza (II), a następnie przez 2 godziny z roztworem kwasu askorbinowego. W celu związania jonów żelaza dodawano roztwór deferoksaminy o stężeniu 2 mmol/dm³. Po upływie 5 minut pożywkę wymieniano. Hodowlę likwidowano po upływie 24 godzin od momentu dodania badanych roztworów flawonoidów lub wywołania stresu oksydacyjnego.

W celu oceny żywotności oraz liczby fibroblastów wykonano ich barwienie 0,4% roztworem błękitu trypanu i liczone pod mikroskopem w komorze Bürkera.

Stężenia ATP prób badanych i kontrolnych oznaczano przy pomocy zestawu testów ATPlite 1 step firmy Perkin-Elmer. Zasada oznaczenia polega na reakcji ATP z D-lucyferyną w obecności lucyferazy, której towarzyszy emisja światła. Pomiary chemiluminescencji dokonywano przy pomocy wielofunkcyjnego czytnika mikroplitek. Stężenie ATP w komórkach dla prób badanych i kontrolnych odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej z roztworu wzorcowego ATP, w zakresie stężeń 1÷10 nmol/l i przeliczano na 1mln komórek.

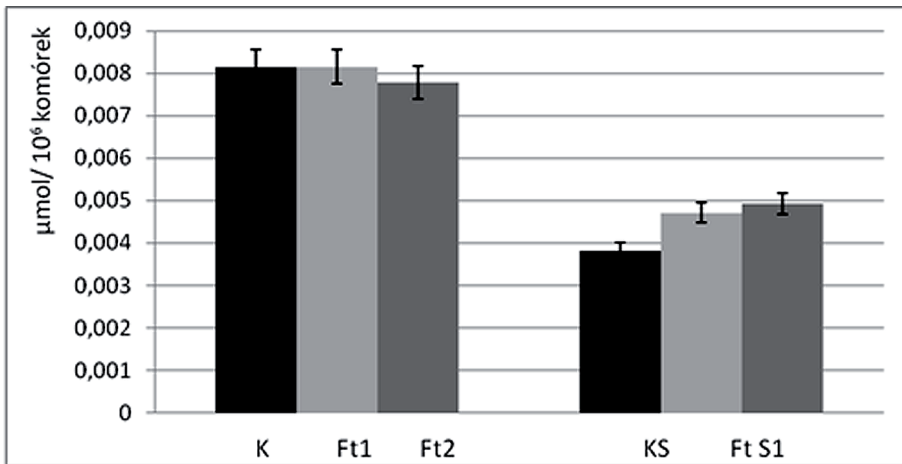
Tabela 1. Symbol układu, skład pożywki

Symbol układu	Skład pożywki
K	pożywka
KS	pożywka, siarczan(VI) żelaza(II) ($2\mu\text{mol}$), , kwas askorbinowy ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),
Ft1	pożywka, floretyna (10^{-5} mol/l),
Ft 2	pożywka, floretyna(10^{-4} mol/l)
Ft 3	pożywka, floretyna(10^{-3} mol/l)
Fdz 1	pożywka, florydzyzna (10^{-5} mol/l)
Fdz 2	pożywka, florydzyzna (10^{-4} mol/l),
Fdz 3	pożywka, florydzyzna (10^{-3} mol/l),
Ft S1	pożywka, floretyna (10^{-5} mol/l), siarczan (VI) żelaza (II) ($2\mu\text{mol}/\text{l}$), kwas askorbinowy ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),
Ft S2	pożywka, floretyna (10^{-4} mol/l), siarczan (VI) żelaza (II) ($2\mu\text{mol}/\text{l}$), kwas askorbinowy ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),
Ft S3	pożywka, floretyna (10^{-3} mol/l), siarczan (VI) żelaza (II) ($2\mu\text{mol}/\text{l}$), kwas askorbinowy ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),
Fdz S1	pożywka, florydzyzna (10^{-5} mol/l), siarczan żelaza (II) ($2\mu\text{mol}/\text{l}$), kwas askorbinowy ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),
Fdz S2	pożywka, florydzyzna (10^{-4} mol/l), siarczan żelaza (II) ($2\mu\text{mol}/\text{l}$), kwas askorbinowy ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),
Fdz S3	pożywka, florydzyzna (10^{-3} mol/l), siarczan żelaza (II) ($2\mu\text{mol}/\text{l}$), kwas askorbinowy ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Ocenę wpływu floretyny i jej glukozydu florydzyzny na aktywność metaboliczną komórki dokonano na podstawie pomiaru stężenia ATP w badanych komórkach zarówno w obecności jak i braku stresu oksydacyjnego. Substancje chemiczne w zależności od stężenia mogą wykazywać zróżnicowany wpływ na metabolizm żywej komórki. Zaburzenie szeregu szlaków metabolicznych w tym produkcji związków wysokoenergetycznych jak adenosynotrifosforan może indukować apoptozę lub nekrozę komórek (9). W wyniku inkubacji komórek z floretyną (Ryc. 1) o stężeniu 10^{-4} mmol/l (układ Ft 2) stwierdzono obniżenie stężenia ATP w odniesieniu do stężenia oznaczonego w komórkach kontrolnych (układ K).

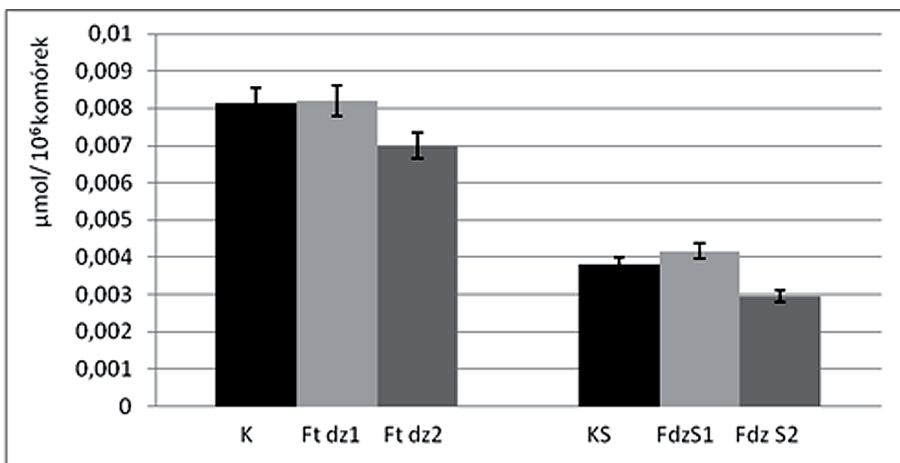
Wywołanie stresu oksydacyjnego w hodowlach kontrolnych (układ KS) spowodowało obniżenie stężenia ATP o około 53% w porównaniu do komórek kontrolnych (układ K). Z kolei w hodowli komórkowych inkubowanych floretyną (10^{-5} , 10^{-4} mmol/dm³) oraz poddanych działaniu stresu oksydacyjnego zaobserwowano wzrost stężenia ATP o odpowiednio 23% i 29% w porównaniu do stężenia oznaczonego w komórkach kontrolnych (układ KS).



Ryc. 1. Średnie stężenia ATP w komórkach inkubowanych z floretyną
Ryc.1. Average concentrations of ATP in the cells incubated with phloretin

W hodowlach komórkowych inkubowanych z florydżyną o stężeniu 10^{-4} (układ Fdz 1) (Ryc. 2) zaobserwowano obniżenie stężenia ATP o około 14% w odniesieniu do kontroli (układ K). Natomiast w komórkach inkubowanych z florydżyną o niższym stężeniu (10^{-5} mmol/l) następnie poddanych stresowi oksydacyjnemu zaobserwowano wzrost stężenia ATP o około 9% w odniesieniu do KS. Jednakże w przypadku stężenia 10^{-5} mol/l stwierdzono obniżenie stężenia ATP o około 23% w porównaniu do stężenia oznaczonego w komórkach kontrolnych (układ KS).

Florydżyna i floretyna dodawane w stężeniu 10^{-3} mol/l wykazywały cytotoksyczny wpływ na badane komórki.



Ryc. 2. Średnie stężenia ATP komórkach inkubowanych z florydżyną
Ryc.2. Average concentrations of ATP in the cells incubated with phloridzin

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują, że w obecności florydżyny i floretyny rośnie tolerancja na stres oksydacyjny u badanych fibroblastów.

A. Kościółek, E. Kurzeja, K. Pawłowska –Góral

THE EVALUATION OF IMPACT DIHYDROCHALCONES PRESENT IN APPLES ON THE METABOLIC ACTIVITY OF CELLS

Summary

Apples are a rich source of biologically active substances. The aim of this study was to evaluate the effect of phloretin, and phloridzin on the metabolic activity of cells. The study was conducted on cultured mouse fibroblasts with the addition of phloretin or phlorizin treated with oxidative stress. Phloretin and phlorizin affects on the biosynthesis of ATP in the examined cells.

PIŚMIENNICTWO

1. *Brzozowski P.* Zagospodarowanie jabłek w Polsce w ostatnim 40-leciu. Zesz Nauk Inst Sadow Kwac. 2009; 17: 41-52.- 2. Zespół Monitoringu Zagranicznych Rynków Rolnych FAMMU/FAPA. Raport rynkowy z lat 2003-2009.- 3. *Gerhauser C.*: Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med* 2008; 74: 1608–1624.– 4. *Sieliwanowicz B., Halasińska A.G., Trzcńska M., Jakubowska A., Lipowski J., Skapska S.*: Zmiany zawartości związków fenolowych, parametrów barwy i aktywności przeciwutleniającej w czasie przechowywania skoków z wybranych odmian jabłek. *Acta Sci Pol, Technol Aliment* 2005; 4(1): 83-91.- 5. *Wojdyło A., Oszmiański J., Laskowski P.*: Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J. Agric Food Chem.* 2008; 56: 6520–6530.- 6. *Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J.*: Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005; 21(1): 31-38.- 7. *Raskin I., Ripoll C.* Can an apple a day keep the doctor away? *Curr Pharm Des.* 2004; 10(27): 3419 - 3429.- 8. *Boyer J, Liu RH.*: Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J.* 2004; 12: 3-5.- 9. *Kulbacka J., Saczko J., Chwilkowska A.*: Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol Merk Lek.* 2009; XXVII. 157: 44-47.

Adres: 41-200 Sosnowiec, ul. Jedności 8