

Ewa Sawicka, Anna Długosz, Anna Roszkowska

SYNERGISTYCZNE DZIAŁANIE WYCIĄGU Z TARCZYCY BAJKALSKIEJ I KOENZYMU Q₁₀

Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. A. Długosz

Celem pracy było zbadanie łącznego działania wyciągu z Tarczycy bajkalskiej (Antoxyd) i koenzymu Q₁₀ (CoQ₁₀) w stresie oksydacyjnym. Oceniono stopień peroksydacji lipidowej przez pomiar stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w krwinkach czerwonych izolowanych z krwi ludzkiej. W badaniach wykazano działanie synergistyczne Antoxydu i koenzymu Q₁₀, objawiające się hamowaniem peroksydacji i spadkiem stężenia MDA w erytrocytach.

Hasła kluczowe: Antoxyd, *Scutellaria baicalensis*, koenzym Q₁₀, peroksydacja lipidowa, wolne rodniki, interakcje.

Key words: Antoxid, *Scutellaria baicalensis*, coenzyme Q₁₀, lipid peroxidation, free radicals, interactions.

Coraz powszechniejsze stosowanie antyoksydantów jako suplementów diety i łączne przyjmowanie różnych typów antyoksydantów zmusza do oceny skutków ich działania łącznego. Szczególna popularność preparatów ziołowych, w tym chińskich ziół, czyni problem interakcji bardzo aktualnym. Tarczycza bajkalska (*Scutellaria baicalensis*) znajduje coraz szersze zastosowanie w medycynie m.in. z powodu właściwości antyoksydacyjnych. Również koenzym Q₁₀ (CoQ₁₀) jest znanym endogennym zmiataczem wolnych rodników, zalecanym m.in. jako suplement diety w stanach wyczerpania. Zawarte w Tarczycy bajkalskiej flawonoidy, takie jak bajkalina czy bajkaleina są skutecznymi zmiataczami wolnych rodników, gdyż m.in. łatwo uwalniają proton z grupy fenolowej. Z kolei koenzym Q₁₀ pełni ważną funkcję w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, przenosząc elektrony z flawoprotein na cytochrom. Proces ten ma kluczowe znaczenie dla sprawnego wytwarzania wysokoenergetycznych związków w procesie oksydatywnej fosforylacji. Brak jest danych na temat działania łącznego bajkaliny i koenzymu Q₁₀. Interesującym wydaje się ocena, czy oba te preparaty podane razem wspomagają swoje działanie, czy działają antagonistycznie i czy dochodzi do interakcji. Celem pracy była ocena działania łącznego wyciągu z Tarczycy bajkalskiej, standaryzowanego na bajkalinę (Antoxyd-Ax) i koenzymu Q₁₀ w stresie oksydacyjnym wywołanym czynnikiem chemicznym. Badania wykonano na modelu *in vitro* – ludzkich erytrocytach. Mierzono peroksydację lipidową w krwinkach czerwonych izolowanych z krwi zdrowych ochotników i stymulowanych nadtlenkiem kumenu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła świeża krew pobrana na cytrynian sodu od zdrowych ochotników. Krew odwirowano, osocze odrzucono. Po trzykrotnym przemyciu roztworem soli fizjologicznej (0,9% NaCl) krwinek czerwonych, sporządzono 10% zawiesinę krwinek w buforze PBS (pH = 7,4). Poziom hemoglobiny (Hb) w zawieszynie oznaczono metodą *Drabkina* z zastosowaniem komercyjnego zestawu.

Do badań użyto Antoxyd (Ax), substancję uzyskaną po krystalizacji wodno-alkoholowego wyciągu z korzenia Tarczycy bajkalskiej Georgi (1) oraz koenzym Q₁₀ (Q₁₀ 904944, JEMO PHARM).

Antoxyd rozpuszczono w buforze TRIS-HCl (pH = 7,4) i zastosowano w następujących stęż.: 1, 2, 4, 8, 20, 40, 60, 80, 100, 120 µg/cm³. Roztwory CoQ₁₀ użyto w takich samych stężeniach, jak Antoxyd, które uzyskano przez rozpuszczenie CoQ₁₀ w DMSO, a następnie rozcieńczenie.

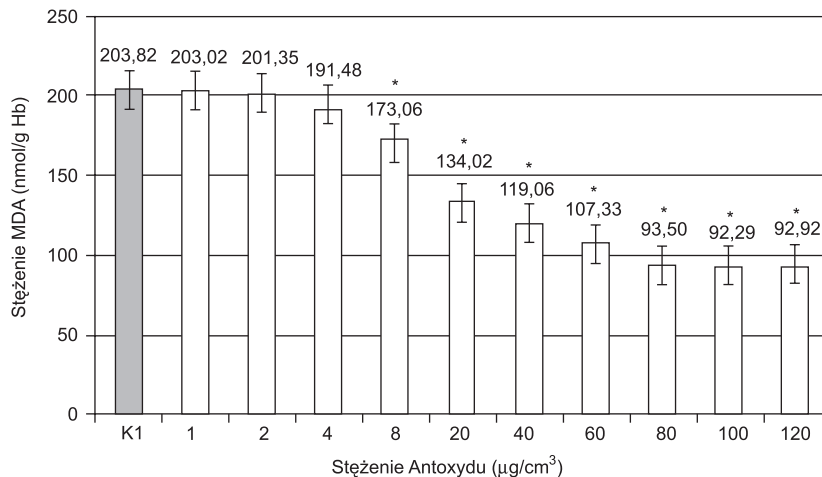
Peroksydację lipidową mierzono spektrofotometrycznie oznaczając stężenie dialdehydu malonowego (MDA) metodą *Stocks'a* (2) i wyrażono w nmol/g hemoglobiny. Dla każdego ze stężeń wykonano co najmniej 10 oznaczeń.

Metoda oznaczenia MDA. Do 2 cm³ zawiesiny krwinek w PBS o określonym stężeniu hemoglobiny dodano 25 µg/dm³ 66 mmol/dm³ roztworu nadtlenku kumenu w mieszaninie etanolu i soli fizjologicznej (1:3) oraz 40 µg/dm³ roztworu Ax lub CoQ₁₀ w odpowiednim stężeniu lub w przypadku badania wpływu mieszaniny po 40 µg/dm³ roztworu Ax oraz CoQ₁₀ w tych samych stężeniach. Po inkubacji 25°C/godz. dodano 1,5 cm³ wodnego roztworu zawierającego kwas trichlorooctowy i arsenin sodowy. Próby odwirowano, do 2 cm³ supernatantu dodano 1cm³ roztworu kwasu tiobarbiturowego i inkubowano 95°C/15 min. Absorbancję prób badanych mierzono przy λ = 535 nm. Stężenia MDA w badanej zawieszynie odczytano z krzywej wzorcowej (wzorec – 1,1,3,3-tetrametoksypropan) i przeliczono na gram hemoglobiny. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina krwinek z nadtlenkiem kumenu bez Ax i CoQ₁₀.

Analiza statystyczna. Wyniki oceniono statystycznie za pomocą programu Statistica PL 7.1. Zmiennność rozkładu sprawdzono testem *Shapiro-Wilka*. Wyniki oceniano statystycznie przy wykorzystaniu analizy jednoczynnikowej ANOVA testem post-hoc RIR *Tukeya*. Różnice uznawano za istotne statystycznie przy p<0,05.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wykazano, że Ax w stęż. 8 µg/cm³ i wyższym istotnie (p<0,0002) obniża poziom MDA w erytrocytach w stosunku do kontroli K1. Najsilniejsze hamowanie uzyskiwano dla stężenia 100 µg/cm³ Ax (ryc. 1). Koenzym Q₁₀ wykazywał słabsze działanie antyoksydacyjne od wyciągu z Tarczycy bajkalskiej, gdyż istotny statystycznie spadek poziomu MDA uzyskiwano dla stężeń powyżej 80 µg/cm³ (ryc. 2). W działaniu łącznym wykazano synergizm, gdyż CoQ₁₀ już w stężeniu 2 µg/cm³ z takim samym stężeniem Ax istotnie statystycznie hamował peroksydację w erytrocytach w porównaniu do kontroli K1 (ryc. 3), podczas gdy oba składniki podane osobno w tych stężeniach nie dawały efektu (spadek z 203,82±16,16 do 185,27±8,22 nmol/g Hb).

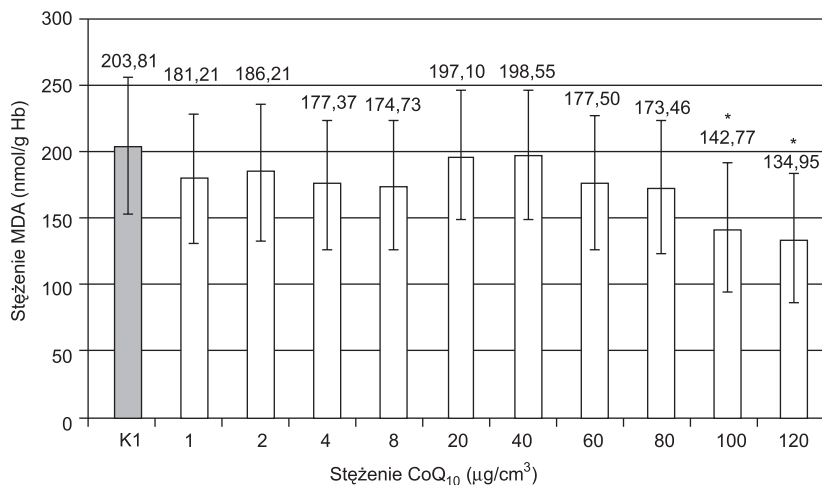


Ryc. 1. Wpływ Antoxydu na poziom MDA w erytrocytach.

* wyniki istotnie statystycznie różne względem kontroli K1 (p<0,0002).

Fig. 1. Effect of Antoxid on erythrocyte MDA levels.

* statistically significant difference when compared to control K1 (p<0,0002).



Ryc. 2. Wpływ koenzymu Q₁₀ na poziom MDA w erytrocytach.

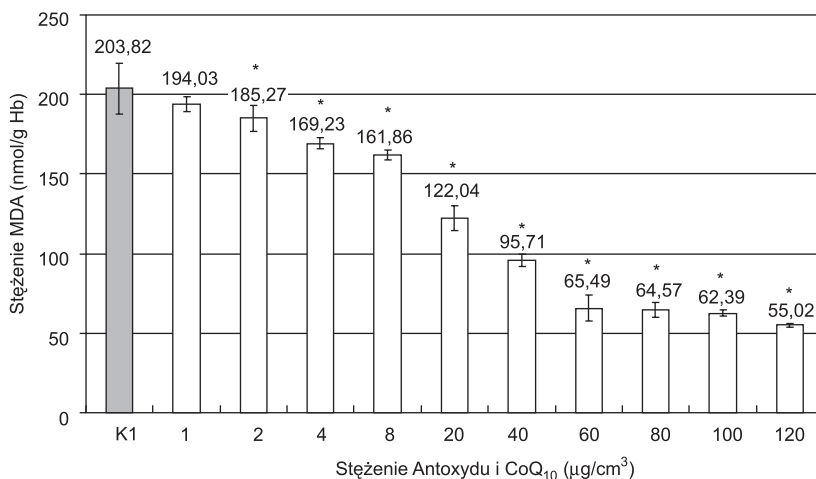
* wyniki istotnie statystycznie różne względem kontroli K1 (p<0,0002).

Fig. 2. Effect of coenzyme Q₁₀ on erythrocyte MDA level.

* statistically significant difference when compared to the control K1 (p<0,0002).

Krwinka czerwona jest często stosowanym modelem *in vitro* do oceny właściwości antyoksydacyjnych. Obecne w błonie erythrocytarnej nienasycone kwasy tłuszczowe mogą ulegać peroksydacji w warunkach stresu oksydacyjnego. Krwinka czerwona podobnie jak inne komórki organizmu zawiera enzymatyczny (dysmu-

taza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, katalaza) i nieenzymatyczny (wit. E, C, *beta*-karoten, kwas moczowy) system obronny. Erytrocyty wykazują jednak znaczną oporność na stres oksydacyjny, dlatego do wywołania efektu potrzebna jest silna prowokacja. W badaniach własnych zastosowano nadtlenek kumenu. Niekiedy używa się 4-butylo-hydroksy nadtlenuku lub nadtlenuku wodoru, jednak ten ostatni działa również utleniająco na hemoglobinę. Piśmiennictwo wskazujące na właściwości antyoksydacyjne *Scutellarii baicalensis* jest bardzo bogate (3, 4, 5, 6, 7, 8), jednak dane na temat działania łącznego z innymi antyoksydantami są nieliczne. Opisano wzmacnianie działania Tarczycy zmiatającego wolne rodniki przez proantocyjany z pestek winogron (GSPE) na modelu $H_2O_2/FeSO_4$ (9). Inne badania wykazały synergizm bajkaleiny z tetracyklinami wobec metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (10).



Ryc. 3. Wpływ łącznego działania Antoxydu i koenzymu Q₁₀ na poziom MDA w erytrocytach. * wyniki istotnie statystycznie różne względem kontroli K1 (p<0,0002).

Fig. 3. Effect of combined exposure to Antoxid and coenzyme Q₁₀ on erythrocyte MDA levels. * statistically significant difference when compared to the control K1 (p<0,0002).

Badania własne pokazują, że łączne stosowanie Antoxydu i koenzymu Q₁₀ znacząco obniża dawkę efektywną i pozwala uzyskać efekt hamowania peroksydacji lipidów. W stężeniach, które stosowane oddzielnie nie są skuteczne. Mechanizm działania antyoksydacyjnego flawonoidów związany jest ze zdolnością do odrywania protonu z grupy fenolowej i wygaszania innych rodników oraz oddziaływania protonu na reaktywne formy tlenu (RFT) (11, 12). Działanie antyoksydacyjne koenzymu Q₁₀ wynika w dużej mierze z łatwego przekształcania ubiquinolu w rodnik ubisemichinonowy, skutecznie wygaszający bardziej toksyczne rodniki (13). Można przypuszczać, że szlaki przemian wzajemnie się uzupełniają, co skutkuje wzmocnieniem działania Ax i CoQ₁₀. Bajkaleina wpływa także na naturalną barierę antyoksydacyjną, tj. aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), hamuje nadprodukcję anionów ponadtlenkowych i tlenu azotu w infekcjach bakteryjnych (14), hamuje czynnik transkrypcji jądrowej NF-κB, a tym samym transkrypcję ponad 100

genów indukowanych w stanach zapalnych m.in. cytokin, COX-2, syntazy tlenu azotu – iNOS (14, 15). Bajkalina w niektórych testach wykazuje silniejsze działanie zmiatające rodniki niż jej aglikon bajkaleina (np. w teście zmiatania rodnika DPPH) (16). Oba związki mają zdolność do chelatowania jonów żelaza i miedzi (11, 17). Aktywność antyoksydacyjna bajkaliny wydaje się być bardziej związana ze zmiataniem rodników ponadtlenkowych, natomiast bajkaleiny z hamowaniem enzymów katalizujących generowanie wolnych rodników, np. oksydazy ksantynowej, 12-lipoksygenazy czy syntazy tlenu azotu (6, 8, 18). Bajkaleina indukuje także ekspresję genów białek protekcyjnych, np. białka szoku termicznego HSP32, co zwiększa jej aktywność antyoksydacyjną. Flawony Tarczycy bajkalskiej, jak i sam koenzym Q₁₀ mogą także działać prooksydacyjnie. Semichinonowy rodnik bajkaleiny może być utleniony do orto-chinono-6,7-dehydrobajkaleiny, który ulega częściowej antyoksydacji i redukcji ze wzmoczoną generacją RFT. Podobnie rodnik ubisemichinonowy, jak i anionorodnik ubisemichinonowy są zdolne do wytwarzania RFT w reakcji z tlenem (13).

Uzyskane wyniki wskazują na synergistyczny efekt Antoxydu i koenzymu Q₁₀ objawiający się hamowaniem indukowanej przez nadtlenek kumenu peroksydacji lipidowej i obniżaniem poziomu MDA w erytrocytach. Łączne stosowanie tych preparatów może prowadzić do zwiększenia antyoksydacyjnej skuteczności leczenia, jak również do zminimalizowania efektów ubocznych przez zastosowanie mniejszych dawek.

WNIOSKI

1. Ekstrakt z Tarczycy bajkalskiej (Antoxyd) w stęż. 8–120 µg/cm³ wykazuje własności antyoksydacyjne, obniżając istotnie peroksydację lipidową w erytrocytach.

2. Koenzym Q₁₀ w badanym modelu wykazywał słabsze działanie, hamując peroksydację w erytrocytach w stęż. 100 µg/cm³ i 120 µg/cm³.

3. Antoxyd i CoQ₁₀ podane łącznie działają synergistycznie, gdyż już w stęż. 2 µg/cm³ istotnie statystycznie hamują peroksydację lipidową w erytrocytach krwi ludzkiej.

E. Sawicka, A. Długosz, A. Roszkowska

SYNERGISTIC EFFECT OF *Scutellaria baicalensis* EXTRACT AND Q₁₀ COENZYME

Summary

This paper reports results of a study on the effects of Antoxid (Ax) and coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) on lipid peroxidation induced by cumene peroxide in suspension of red blood cells. It was found that Antoxid at 8–120 µg/cm³ significantly decreased lipid peroxidation in comparison to the control and showed stronger antioxidant effect than coenzyme Q₁₀. Coenzyme Q₁₀ significantly decreased erythrocyte MDA levels only at 100 µg/cm and 120 µg/cm³. Data from this study point to a synergistic effect of the mixture of Ax and CoQ₁₀ on free radical processes, while the components used separately at these concentrations did not show a significant effect. When combined, the Ax and CoQ₁₀ already at 2 µg/cm³ significantly inhibited lipid pero-

oxidation in human erythrocytes. Co-administration of these specimens could increase the effectiveness of the antioxidant treatment and minimize possible side effects that may result from the necessary higher doses of the single antioxidants.

PIŚMIENICTWO

1. *Stawiany P., Gwardys P., Lamer-Zarawska E., Oszmiański J.*: Patent no. A1 (21) 319737 (22) 97 04 29 6(51) A61K 35/78, Biuletyn Urzędu Patentowego Nr 23 (649) 1998. – 2. *Stocks J., Offerman E.L., Model C.B., Dormandy T.L.*: The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease. *Br. J. Haematol.*, 1972; 23: 713-724. – 3. *Ciesielska E., Gwardys A., Metodiewa D.*: Anticancer, antiradical and antioxidative actions of novel Antoksyd S and its major components, baicalin and baicalein. *Anticancer Res.*, 2002; 22(5): 2885-2891. – 4. *Ciesielska E., Wolszczak M., Gulanowski B., Szulawska A., Kochman A., Metodiewa D.*: In vitro antileukemic, antioxidant and prooxidant activities of Antoksyd S (C/E/XXI): a comparison with baicalin and baicalein. *In Vivo*, 2004; 18(4): 497-503. – 5. *Regulska-Ilow B., Biernat J., Grajeta H., Ilow R., Drzewicka M.*: Influence of bioflavonoids from the radix extract of *Scutellaria baicalensis* on the level of serum lipids, and the development of laboratory rats fed with fresh and oxidized fats. *Nahrung*, 2004; 48(2): 123-8. – 6. *Shieh D.E., Liu L.T., Lin C.C.*: Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 2861-2865. – 7. *Wozniak D., Lamer-Zarawska E., Matkowski A.*: Antimutagenic and antiradical properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Nahrung*, 2004; 48: 9-12. – 8. *Zhao Y., Li H., Gao Z., Gong Y., Xu H.*: Effects of flavonoids extracted from *Scutellaria baicalensis* Georgi on hemin-nitrite-H(2)O(2) induced liver injury. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006; 536: 192-199. – 9. *Shao Z.H., Hoek T.L., Li C.Q., Schumacker P.T., Becker L.B., Chan K.C., Qin Y.M., Yin J.J., Yuan C.S.*: Synergistic effect of *Scutellaria baicalensis* and grape seed proanthocyanidins on scavenging reactive oxygen species *in vitro*. *Am. J. Chin. Med.*, 2004; 32: 89-95. – 10. *Fujita M., Shiota S., Kuroda T., Hatano T., Yoshida T., Mizushima T., Tsuchiya T.*: Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.*, 2005; 49: 391-396.
11. *Gao Z., Huang K., Yang X., Xu H.*: Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1472: 643-650. – 12. *Oszmiański J.*: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze żywności. *Przemysł Spożywczy*, 1995; 3: 94-96. – 13. *Bentinger M., Brismar K., Dallner G.*: The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 2007; 7S: S41-S50. – 14. *Cheng P.Y., Lee Y.M., Wu Y.S., Chang T.W., Jin J.S., Yen M.H.*: Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 2007; 73: 793-804. – 15. *Woo K.J., Lim J.H., Suh S.I., Kwon Y.K., Shin S.W., Kim S.C., Choi Y.H., Park J.W., Kwon T.K.*: Differential inhibitory effects of baicalein and baicalin on LPS-induced cyclooxygenase-2 expression through inhibition of C/EBP β DNA-binding activity. *Immunobiology*, 2006; 211: 359-368. – 16. *Bochorakova H., Paulova H., Slanina J., Musil P., Taborska E.*: Main Flavonoids in the Root of *Scutellaria baicalensis* Cultivated in Europe and Their Comparative Antiradical Properties. *Phytother. Res.*, 2003; 17: 640-644. – 17. *Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishna D.R.*: Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.*, 2001; 33: 2-16. – 18. *Deshamps J.D., Kenyon V.A., Holman T.R.*: Baicalein is a potent *in vitro* inhibitor against both reticulocyte 15-human and ptalet 12-human lipooxygenases. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006; 14: 4295-4301.

Adres: 50-417 Wrocław, ul. Traugutta 57/59.