

W pracy przedstawiono ogólne informacje o flawonoidach, ze szczególnym uwzględnieniem fitoestrogenów. Fitoestrogeny, podobnie jak flawonoidy mają zróżnicowane właściwości farmakologiczne. Fitoestrogeny zmniejszają zapadalność na raka sutka, prostaty, choroby układu krążenia. Przypisuje się im właściwości promienioochronne.

Celem oceny właściwości promienioochronnych różnych związków chemicznych stworzono model doświadczalny, polegający na hodowli komórek nerki małpy zielonej GMK. Hodowlę prowadzono w środowisku promieniotwórczego technetu 99m.

100 hodowli tkankowych podzielono na 5 grup. Do grup 1–4 dodano promieniotwórczy technet o zróżnicowanych aktywnościach: 10 mCi, 1 mCi, 0,1 mCi, 0,01 mCi. Grupa 5. była grupą kontrolną, bez izotopu. W czwartej dobie badania obliczono liczbę komórek i aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH). W drugiej części badań do hodowli tkankowej dodano technet o aktywności 10 mCi. Do części hodowli dodano roztwór formononetyny, która jako fitoestrogen wykazała właściwości promienioochronne, będąc antidotum na zastosowany czynnik – promieniowanie jonizujące gamma. Przedstawiony model doświadczalny z użyciem hodowli tkankowej GMK prowadzonej w środowisku promieniotwórczego technetu może służyć ocenie innych związków flawonoidowych o właściwościach promienioochronnych. Zachowanie stałych parametrów hodowli pozwoli na ich ocenę porównawczą. Znaczne rozpowszechnienie flawonoidów w przyrodzie pozwoli w przypadku skażenia środowiska naturalnego związkami promieniotwórczymi na dokonanie wyboru surowca łatwo dostępnego, o dobrych właściwościach promienioochronnych, a być może i spożywczych, tak jak jest to w przypadku formononetyny zawartej w Glicine soja.

Słowa kluczowe: promieniowanie jonizujące, flawonoidy, fitoestrogeny, formononetyna, hodowla tkankowa nerki małpy zielonej GMK.

Działanie flawonoidów na hodowlę tkankową prowadzoną w środowisku promieniotwórczego technetu

Effects of flavonoids on the tissue culture in radioactive technetium medium

Grzegorz Andrykowski¹, Paweł Bodera²,
Andrzej Przybycień³, Jerzy Grześków⁴

¹ Zakład Farmakologii, Wojskowa Akademia Medyczna w Łodzi

² Firma Boehringer Ingelheim, Warszawa

³ Poliklinika MSWiA, Zielona Góra

⁴ Zakład Ochrony Zdrowia Wojsk, Wojskowa Akademia Medyczna w Łodzi

WSTĘP

Flawonoidy to bardzo rozpowszechnione w przyrodzie substancje pochodzenia głównie roślinnego o charakterze barwników. Najczęściej mają kolor żółty i są rozpuszczone w soku komórkowym. Obecność między aromatycznymi atomami węgla układu heterocyklicznego γ pironu pozwala zaliczyć te związki do pochodnych benzo- γ pironu, czyli chromonu.

Chemiczna klasyfikacja flawonoidów jest niejednorodna. Zalicza się do nich m.in. flawonole, procyanidyny, flawony, flawononole, flawonony, izoflawony. Do surowców farmakognostycznych, zawierających farmakologicznie czynne flawonoidy zalicza się kwiatostan głogu, liść brzozy, ziele skrzypu polnego, kwiat bzu czarnego, kwiatostan lipy, ziele rdestu ptasiego, ziele fiołka trójbarwnego, kosczynek rumianku, ziele dziurawca i wiele innych. Popularność preparatów zawierających flawonoidy jest zmienna. Od kilku lat renesans przeżywa miłorząb japoński, stosowany od 50 wieków w chiń-

skiej medycynie ludowej [10, 12]. Wyciągi alkoholowe z tej rośliny obfitują w biflawonoidy, mające właściwości rozszerzające naczynia krwionośne. Gotowe preparaty z tej rośliny poprawiają pamięć, zmniejszają chromanie przestankowe, zawroty głowy, szumy w uszach [6]. W wielu pracach klinicznych zanotowano pozytywne wyniki leczenia miłorzębem otępienia w przebiegu choroby Alzheimera lub po udarach mózgu. Procyjanidyny zawarte w wyciągu z winogron nadają im właściwości ochronne na ścianę naczyń krwionośnych, co pozwala na ich stosowanie w różnych chorobach oczu i niewydolności naczyń żylnych [7, 13, 14]. Oprócz wyżej wymienionych działań należy podkreślić znaczenie flawonoidów jako leków o właściwościach diuretycznych, hipotensyjnych, spasmolitycznych, antyagregacyjnych, chelatujących metale ciężkie, poprawiających przepływ wieńcowy. Są naturalnymi antyutleniaczami [4, 9]. Niektóre mają właściwości promienioochronne.

The study presents general information on flavonoids with particular consideration of phytoestrogens.

Phytoestrogens similarly to flavonoids have differentiated pharmacological properties. Phytoestrogens decrease breast carcinoma, prostatic carcinoma and circulatory system diseases. They are thought to have radioprotective properties.

In order to assess radioprotective properties of various chemical compounds, an experimental model has been created based on green monkey kidney cells culture (GMK).

The culture was on radioactive technetium 99m medium. One hundred of tissue cultures were divided into 5 groups. Radioactive technetium of different activities: 10 mCi, 1 mCi, 0.1 mCi, 0.01 mCi was added in groups 1–4. Group 5 was the control group without an isotope. On the day 4 of the study lactate dehydrogenase (LDH) activity and number of cells were calculated. Radioactive technetium added into tissue culture evoked directly proportional to the used activity decrease of the number of cells and increase of their cell disintegration with subsequent LDH release. In the second part of investigations, technetium 10 mCi was added to tissue culture.

The solution of formononetin, which demonstrated radioprotective properties being an antidotum to the applied agent – γ -ionising radiation, was added to part of the culture. The presented experimental model with the use of tissue culture GMK in radioactive technetium medium, what may be helpful in evaluating other flavonoid compounds of radioprotective properties. The behaviour of culture constant parameters will allow for their comparative estimation.

Considerable distribution of flavonoids in nature will enable in case of natural environment contamination with radioactive compounds, to choose easily accessible material of good radioprotective properties and maybe also food as it is in case of formononetin contained in Glycine soya.

Key words: ionization radiation, flavonoids, phytoestrogens, formononetin, green monkey kidney cells culture (GMK).

Celem pracy było przedstawienie prostego modelu doświadczalnego, w którym przy zachowaniu stałych parametrów doświadczalnych hodowli tkankowej można ocenić wpływ flawonoidu na hodowlę tkankową komórek nerki małpy zielonej GMK, prowadzoną w środowisku promieniotwórczego technetu. Przedstawiony model doświadczalny pozwala dokonać analizy porównawczej różnych flawonoidów. Znaczne rozpowszechnienie tej grupy związków w przyrodzie, co bezpośrednio wiąże się z ich łatwą dostępnością, pozwoli w przypadku skażeń środowiska naturalnego związkami promieniotwórczymi na dokonanie wyboru surowca o najlepszych właściwościach promienioochronnych. W przedstawionej pracy zastosowano formononetynę. Związek ten występuje w postaci glikozydów w niektórych gatunkach Leguminose. Do rodziny tej zaliczamy *Glycine soja*. Jako produkt o dobrych właściwościach spożywczych, z dużą zawartością białka mógłby spełniać wymagane zapotrzebowanie na środek odżywczy, mający równocześnie właściwości promienioochronne. Fitoestrogeny, podobnie jak inne flawonoidy mają dość zróżnicowane właściwości farmakologiczne. Głównie podkreśla się ich aktywność estrogenową, zmniejszającą zaburzenia okołomenopauzalne [1, 5, 8, 11]. Wykazano, że dieta bogata w te związki związana jest z obniżeniem zapadalności na schorzenia związane z cywilizacją Zachodu, takie jak rak sutka, prostaty, choroby układu krążenia [3]. Opisywano ich działanie na układ immunologiczny, zmiany przepływu krwi w naczyniach krwionośnych, wpływ na agregację pły-

tek krwi, czynność wątroby, aktywność enzymów oraz na metabolizm kolagenu, fosfolipidów, cholesterolu i histaminy [2]. Obecność grup OH w budowie tych związków warunkuje posiadanie zdolności antyoksydacyjnych. Wielokierunkowe, pozytywne działanie fitoestrogenów przekonuje o zasadności ich badania w aspekcie właściwości promienioochronnych.

MATERIAŁ I METODY

W pracy zastosowano własny model doświadczalny. Badania przeprowadzono na hodowli tkankowej nerki małpy zielonej GMK, zakupionej w Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. Hodowlę prowadzono w środowisku promieniotwórczego technetu 99m uzyskanego z generatora molibdenowego firmy Amersham. Sto hodowli tkankowych podzielono na 5 grup (tab. 1.).

Tab. 1.

Grupa	Aktywność technetu
1	10 mCi
2	1 mCi
3	0,1 mCi
4	0,01 mCi
5	kontrola

W drugiej części badań 60 hodowli tkankowych podzielono na 3 grupy (tab. 2.).

- W 4. dobie hodowli zbadano:
- 1) liczbę komórek hodowli tkankowej,
 - 2) aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w płynie hodowlanym znad hodowli tkankowej.

Tab. 2.

Grupa	Zawartość
I	1 ml Formononetyny 10 mg/dl +10 mCi Tc 99m w 1 ml rozpuszczalnika
II	10 mCi Tc 99m w 1 ml rozpuszczalnika + 1 ml rozpuszczalnika
III	2 ml rozpuszczalnika

Tab. 3.

Grupa	Aktywność technetu	N	Średnia liczba komórek	Odchylenie standardowe	Średnia aktywność LDH	Odchylenie standardowe
1	10 mCi	20	125 833	60115	82,7	12,0
2	1 mCi	20	170 333	70825	83,7	11,2
3	0,1 mCi	20	191 833	43494	75,1	6,3
4	0,01 mCi	20	234 499	62006	65,1	6,0
5	kontrola	20	187 999	35398	68,5	16,6

Liczbę komórek w hodowli liczono w komorze Bürkera. Dehydrogenazę mleczanową określono metodą spektrofotometryczną wykorzystując zestaw firmy ANALCO – GBG.

WYNIKI

Wyniki zostały przedstawione w tab. 3. i 4.

Tab. 4.

Grupa	Liczba komórek	Aktywność LDH U/l
I	116 500 * p<0,001	465,6 * p<0,001
II	76 816 * p<0,001	519,7 * p<0,001
III	95 166	415,6 * p<0,001

WNIOSKI

Aktywność 10 mCi, 1 mCi, 0,1 mCi Tc 99m dodana do hodowli tkankowej GMK wywołała wprost proporcjonalne do użytej aktywności zmniejszenie liczby komórek, zwiększenie ich rozpadu z następowym uwolnieniem LDH.

Dodanie formononetyny o stężeniu 10 mg/dl do hodowli tkankowej prowadzonej w środowisku promieniotwórczego technetu o aktywności wyjściowej 10 mCi znacznie statystycznie zwiększyło liczbę komórek, a zmniejszyło aktywność LDH w płynie hodowlanym w 4. dobie badania w porównaniu do hodowli z technetem, bez formononetyny.

Formononetyna w przedstawionym badaniu wykazała właściwości

promienioochronne, takie jak wykazuje prawdopodobnie wiele związków zaliczanych do flawonoidów.

Przedstawiony model doświadczalny może posłużyć ocenie innych związków o właściwościach promienioochronnych. Wnioski wyciągnięte z doświadczeń prowadzonych z zachowaniem stałych

parametrów hodowli pozwolą na ich ocenę porównawczą.

PIŚMIENNICTWO

- Adlercreutz H, et al. *86th annual Meeting of the American association for cancer Research*. American Association for Cancer research, Toronto, Ontario, Canada 1986; 36: 687.
- Anderson J, Johnstone B, Cook-Newell M. *Meta-analysis of effects of soy protein intake on serum lipids*. N Engl J Med 1996; 333: 276.
- Axelsson M, Sjoval J, Gustafsson BE. *Soya – a dietary source of the nonsteroidal estrogen equol in man and animals*. Endocrinol 1982; 102: 49.
- Bagchi D, et al. *Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed poanthocyanidin extract in vitro*. Mol Pathol Pharm acolcytochr 1997; 95: 179-89.

- Bennets HW, Underwood EJ, Shier FL. *A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Wartern Australia*. Aust Vet J 1946; 22: 2.
- Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, et al. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Austin: American Botanical Council 1998; 136-38.
- Cahn J, Borzeix MG. *Administration of procyanidolic oligomers in rates: observed effects on changes in the permeability of the blood – brain barrier*. Sem Hop 1983; 59: 2031-4.
- Drane Patterson DSP, Roberts BA. *Oestrogenic activity of soya-bean products*. Food Cosmetics Toxicol 1980; 18: 425.
- Dziedzic SZ, Hudson B. *Hydroflavones as antioxidants for edible oils*. Food Chem 1983; 11: 161-6.
- Foster S, Tyler VE. *Tyler's Honest Herbal*. 4th Edition. Binghamton: The Haworth Herbal Press. 1999.
- Price KR, Fenwick GR. *Naturally occurring oestrogens in foods – a review*. Food Addit Contam 1985; 2: 73.
- Robbers JE, Tyler VE. *Tyler's Herbs of Choice*. Binghamton: The Haworth Herbal Press, 1999.
- Robert L, et al. *The effect of procyanidolic oligomers on vascular permeability: a study using quantitative morphology*. Pathol Biol 1990; 38: 608-16.
- Tixier JM, et al. *Evidence by in vivo and in vitro studies that binding of pycnogenols to elastin affects its rate of degradation by elastases*. Biochem Pharmacol 1984; 33: 3933-39.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. **Grzegorz Andrykowski**
Zakład Farmakologii
Wojskowa Akademia Medyczna
plac Hallera 1
90-647 Łódź