

STUDY OF QUERCETIN INFLUENCE ON BIOCHEMICAL PARAMETERS AT SEWER RATS

VLIV QUERCETINU NA RŮZNÉ BIOCHEMICKÉ UKAZATELE U POTKANŮ

Hanuštiak P.¹⁾, Adam V.²⁾, Kratochvílová P.³⁾, Mareš P.³⁾, Šupálková V.^{2,4)}, Beklová M.¹⁾, Zehnálek J.²⁾, Zeman L.³⁾, Kizek R.²⁾

¹Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno; ²Ústav chemie a biochemie, ³Ústav výživy zvířat a pícninářství, ⁴Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

E-mail: zabak.pub@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Flavonoids have received considerable attention because of their beneficial effects as antioxidants in the prevention of human diseases such as cancer. Several mechanisms by which flavonoids play an important role in cytotoxicity have been identified. Facts mentioned above and increasing content of flavonoids in the environment demonstrate the necessity of taking into account study of their influence on organisms. Here, we fed sewer rats by quercetin (0, 0.1, 0.25 and 0.5 g per kg of feed) for five days. The intake of the food and the samples of urine and excrements were observed and collected daily. At the very beginning and end of the experiment, the blood was collected. The biochemical parameters (AST, ALT, GMT), level of metallothionein and quercetin concentration were determined in blood.

Key words: quercetin, metallothionein, electrochemical determination, voltammetry.

ABSTRAKT

Flavonoidům je přikládán značný význam, neboť jejich antioxidační aktivita působí příznivě v prevenci lidských chorob jako jsou nádorová onemocnění. Byly popsány některé mechanismy, ve kterých hrají flafovoidy důležitou roli v prevenci cytotoxicity. Výše uvedená fakta a rostoucí obsah flavonoidů v životním prostředí vysvětluje nutnost studia jejich vlivu na organismus. V průběhu našeho experimentu byl pokusným potkanům po dobu 5 dní přidáván do krmiva quercetin, který patří k nejvíce rozšířeným flavonoidům, o různých koncentracích (0, 0,1, 0,25 a 0,5 g / kg krmiva). Příjem potravy byl sledován každý den. Každý den jsme získávali vzorky moči a exkrementů. Před započítím a po ukončení experimentu byly potkanům odebrány vzorky krve. Z krve byly zjištěny hodnoty různých biochemických parametrů (AST, ALT, GMT), obsah metalothioneinu a quercetinu.

Klíčová slova: quercetin, metalothionein, elektrochemická detekce, voltametrie.

ÚVOD

Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou heterocyklických sekundárních rostlinných metabolitů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu. Biochemická aktivita flavonoidů či jejich metabolitů závisí na chemické struktuře a relativní orientaci kruhů v této molekule[1], ale samozřejmě také na substitucích na této molekule. Substituce zahrnují hydroxylace, hydrogenace, metylace, malonylace, sulfatace a glykosylace[2,3].

Kromě přirozeného působení flavonoidů v rostlinách, kde se účastní mnoha důležitých procesů, jako jsou například vývoj a zrání pylu[4] či ochrana rostlin před nadměrným množstvím UV záření[5], je vzhledem ke člověku a zvířatům zmiňována řada pozitivních, ale také negativních účinků. Nejčastěji je uvažována jejich antioxidační aktivita, která se projevuje mimo jiné například schopností „zhášet“ reaktivní kyslíkové radikály nebo ochranou LDL lipidových frakcí před oxidační modifikací[6,7]. Dále mají řadu dalších fyziologicky důležitých vlastností: protisrážlivé působení[8], antiestrogenní účinky[9], protizánětlivé působení v trávicím traktu[10], antimikrobní účinek flavonoidů česneku či skořice[11], spasmolytické působení některých flavonoidů[12]. Na druhou stranu však existují vědci, kteří jsou přesvědčeni o karcinogenním působení některých flavonoidů[13]. Nelze se tedy dívat na tuto skupinu jako na celek a všechny flavonoidy považovat za prospěšné.

Quercetin je jedním z nejlépe prozkoumaných flavonoidů. Není to proto, že by byl tak významně rozšířen, jako aglykon se v rostlinné říši vyskytuje méně často. Ale je základem dalších glykosidů rutinu a quercitrinu, a vzhledem k tomu, že během úpravy rostlin při přípravě potravin či při podmínkách panujících v trávicím traktu dochází k zvyšování koncentrace aglykonů na úkor glykosidů, je jeho význam nesporný. Navíc se prokázalo, že má výborné antioxidační vlastnosti, spasmolytický účinek či může působit protinádorově[14]. Na druhou stranu přijímání vysokých farmakologických dávek quercetinu v množství 2% z celkového množství přijaté stravy způsobovalo u potkanů zhoubné novotvary močového měchýře[15]. Cílem pokusu bylo zjistit, na kolik ovlivňuje příjem nízkých dávek quercetinu (0,1 0,25 a 0,5 g / kg krmné dávky) biochemické ukazatele krevního séra potkanů, jako jsou aktivita enzymů aspartátaminotransferázy (AST), alaninaminotransferázy (ALT) a gamaglutamiltransferázy (GGT), dále pak aktivitu enzymu laktátdehydrogenázy (LDH), koncentrace vápníku (Ca), koncentraci celkového cholesterolu (T-CHO), množství kreatininu (CRE), albuminu (Alb) a celkového proteinu (T-PRO).

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

NaH_2PO_4 , uhlíkový prášek a minerální olej byly dodány firmou Sigma Aldrich Corp. (USA). Na_2HPO_4 byla dodaná firmou Merck, Darmstadt (Ger.). Quercetin dihydrat byl dodán firmou Fluka chemie AG (USA). Standardní roztoky quercetinu byly připraveny pomocí metanolu a skladovány ve tmě při 4 °C.

pH stanovení

Hodnota pH byla naměřena pomocí přístroje WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), který byl řízen osobním počítačem a programem (MultiLab Pilot; Weilheim, Germany). pH-elektroda (SenTix- H, pH 0–14/3M KCl) byla pravidelně kalibrována soupravou WTW pufrů (Weilheim, Německo).

Biologický experiment

Modelový pokus se provádí v experimentálních zařízeních Ústavu výživy zvířat a pícninářství AF MZLU v Brně. Podmínky zařízení jsou v souladu s metodikou dle „Zákona na ochranu zvířat proti týrání“ č. 246/1992 Sb. Z faktorů působících na pokusná zvířata jsou limitovány především teplota (v rozmezí $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), fotoperioda, která je řízena uměle (dle schématu 12 hod. den : 12 hod. noc o max. intenzitě 200 lx.) a stálá vlhkost vzduchu o hladině 60%. Z podmínek chemických to je obsah CO_2 ve stájovém vzduchu – max. 0,25 %, NH_3 max. - 0,0025%. Jako experimentální model pro růstový pokus i bilanční pokus jsou používáni rostoucí samci laboratorního potkana outbredního kmene Wistar albino z konvenčního chovu LF Masarykovy univerzity v Brně, jejichž anatomické a fyziologické parametry jsou velmi blízké člověku a monogastrickým zvířatům.

Potkani byli individuálně ustájeni v bilančních klecích. První den po naskladnění byli ponecháni o hladu, aby byl zajištěn příjem krmné směsi ihned po 1. nakrmení. První den pokusu byla zvířatům podána krmná směs (0.1, 0.25 a 0.5 g quercetinu / kg krmné dávky) a po dvou hodinách odebrána krev. V průběhu celého pokusu byli jednou denně krmeni pokusnou krmnou směsí a napájeni nezávadnou pitnou vodou *ad libitum*. Denně byl sledován příjem krmné směsi a množství vyprodukovaných výkalů. Denně byly odebírány vzorky moči a výkalů. Na konci pokusu byla opět odebrána krev, následně byli potkani usmrceni etherem a byla provedena pitva, při které byly odebrány vzorky k analýzám. Jmenovitě se jednalo o tyto orgány – močový měchýř, ledviny, tenké střevo (první úsek střeva za dvanáctníkem) a játra.

Elektrochemické stanovení quercetinu

Square-wave voltametrie byla prováděna pomocí elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Nizozemí) v zapojení s tříelektrodovou celou VA–Stand 663 (Metrohm, Switzerland). Byla použita pracovní uhlíková pastová elektroda, referentní (Ag/AgCl, 3 M KCl) elektroda, a jako pomocná elektroda byla použita uhlíková tyčka. Získaná data byla upravena matematickou korekcí podle algoritmů navržených Savitzkym a Golayem implementovaných do GPES softwaru (EcoChemie). Experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od $-0,1$ V do $1,2$ V s těmito parametry: potenciálový krok $1,95$ mV, pulzní amplituda $49,85$ mV. Jako základní elektrolyt jsme použili fosfátový pufr o $\text{pH} = 7,0$.

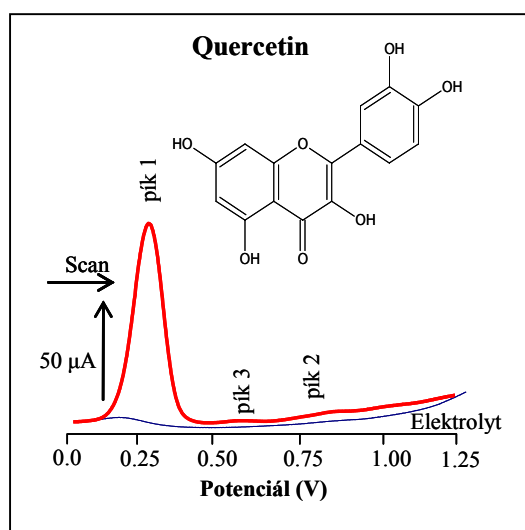
Uhlíková pasta (asi $0,5$ g) byla vyrobena z uhlíkového prášku a minerálního oleje (bez DNáz, RNáz, a proteáz). Poměr uhlíkového prášku a minerálního oleje byl $70/30$ (m/m). Pasta byla vložena do teflonového těla elektrody s průměrem plochy elektrody $2,5$ mm. Před

každým měřením byl povrch elektrody vždy obnoven, tedy očištěn od nečistot pomocí filtračního papíru.

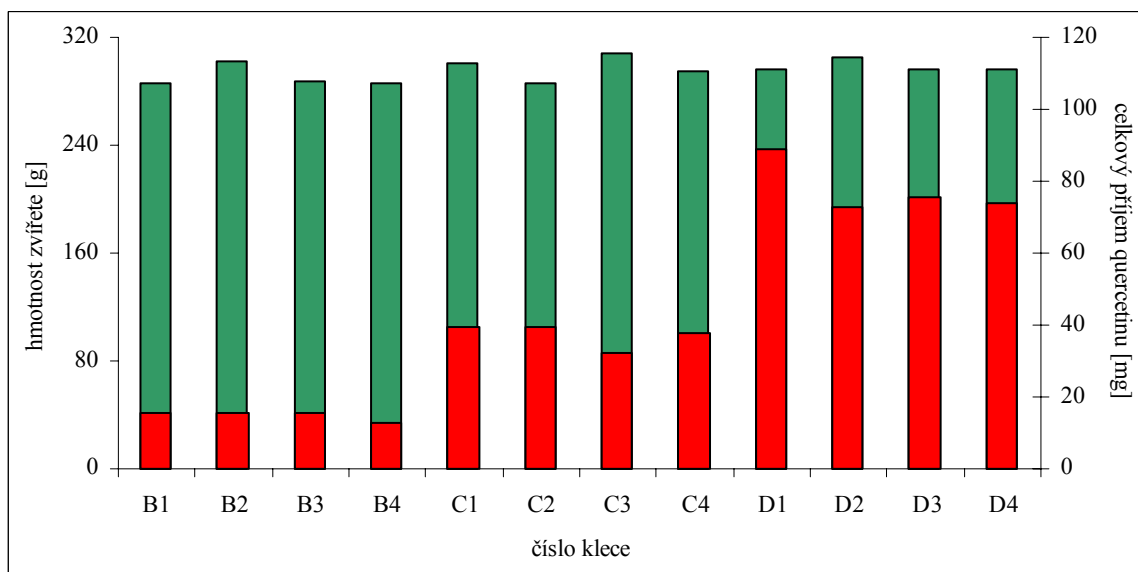
VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejdříve jsme se v našich experimentech zaměřili na optimalizaci stanovení quercetinu pomocí square wave voltammetrie. Za nejvhodnějších podmínek jsme získali signál zobrazený na Obr. 1. Z obrázku je jasně patrné, že elektrochemické chování studované látky je složité. Poskytuje tři signály, které pravděpodobně souvisejí se substitucemi heterocyklu flavanu. Detekční limit byl okolo 1 nM.

Obr. 1 Typický SW voltamogram quercetinu.



Obr. 2 Vliv celkového příjmu quercetinu na hmotnost potkana.



Po optimalizaci vhodné detekční metody jsme pokračovali studium vlivu vybraného flavonoidu na potkany. Potkanům byla podávána krmná směs obsahující 0.1, 0.25 a 0.5 g quercetinu na kg krmné dávky, přičemž na začátku a na konci experimentu byla odebrána krev, která byla následně analyzována. Kromě základních biochemických parametrů jako hladiny ALT a AST, jsme se také zaměřili na detekci metalothioneinu. Z výsledků vyplývá, že dávky quercetinu výrazně ovlivňovaly hladiny studovaných enzymů a proteinů. Kromě toho jsme se také zaměřili na pozorování příjmu potravy a s tím spjaté váhy potkanů (Obr. 2). Zde jsme získali velmi zajímavý výsledek, že se vzrůstající dávkou quercetinu klesala hmotnost zvířete.

ZÁVĚR

Studium vlivu nutraceutik na živočišné organismy je v dnešní době velmi důležité. V této práci jsme ukázali komplexní pohled na vliv jednoho z flavonoidů, quercetinu, na potkany.

LITERATURA

- [1] V. Cody Crystal and molecular structure of flavonoids, New York, NY USA, 1988.
- [2] J.B. Harborne Nature, distribution and function of plant flavonoids, New York, NY USA, 1986.
- [3] J.B. Harborne Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships, New York, NY USA, 1988.
- [4] I.M. van der Meer, M.E. Stam, A.J. van Tunen, J.N. Mol and A.R. Stuitje Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility, *Plant Cell* 4 (1992) 253-262.
- [5] J. Li, T.M. Ou-Lee, R. Amundson and R.L. Last Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation, *Plant Cell* 5 (1993) 171-179.
- [6] N. Kaul, N. Siveski-Iliskovic, M. Hill, J. Slezak and P.K. Singal Free radicals and the heart, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 30 (1993) 55-67.
- [7] A. Mora, M. Paya, J.L. Rios and M.J. Alcaraz Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.* 40 (1990) 793-797.
- [8] A.J. Elliott, S.A. Scheiber, C. Thomas and R.S. Padini Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study., *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 1603-1608.
- [9] A. Cassidy, B. Hanley and R.M. Lamuela-Raventos Review: Isoflavones, lignans a stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1044-1062.

- [10] G.M. Raso, R. Meli, G. Di Carlo, M. Pacilio and R. Di Carlo Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1, *Life Sci.* 68 (2001) 921-931.
- [11] K. Chow and I. Kramer, China Books and Period, Inc., San Francisco, USA, 1990.
- [12] E. Middleton, C. Kandaswami and T.C. Theoharides The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 673-751.
- [13] P. Hodek, P. Trefil and M. Stiborová Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chem. Biol. Interact.* 139 (2002) 1-21.
- [14] Y.J. Moon, X.D. Wang and M.E. Morris Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, *Toxicology in vitro* 20 (2006) 187-210.
- [15] M.H. Criqui and B.L. Ringel Does diet or alcohol explain the French paradox?, *Lancet* 344 (1994) 1719-1723.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována granty GAČR 525/04/P132 a MSMT 6215712402.