

Jadwiga Barbara Brokos, Kazimierz Gąsiorowski

ANTOCYJANY Z JAGÓD ARONII JAKO ZWIĄZKI ANTYGENOTOKSYCZNE W HODOWLACH LUDZKICH LIMFOCYTÓW

Katedra i Zakład Podstaw Nauk Medycznych, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. *K. Gąsiorowski*

Preparat AN, oczyszczona mieszanina czterech cyjanidyn – antocyjanów z jagód aronii czarnoowocowej zmniejszał in vitro efekty działania genotoksycznego benzo[a]pirenu w hodowlach ludzkich limfocytów: zmniejszał odsetek metafaz z dużą liczbą wymian siostrzanych chromatyd, obniżał średnią liczbę SCE w tej grupie komórek oraz zmniejszał liczebność komórek okazujących pęknięcia nici DNA w teście kometkowym

Słowa kluczowe: benzo[a]piren, antocyjany, efekty antygenotoksyczne, limfocyty.
Key words: benzo[a]pyrene, anthocyanins, antigenotoxic effects, lymphocytes.

Benzo[a]piren (B[a]P) działa genotoksycznie na komórki poprzez 1/ kowalencyjne wiązanie się do DNA aktywnych metabolitów B[a]P: epoksydów diolowych (addukty stabilne) oraz rodników kationowych (addukty niestabilne), 2/ indukowanie stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA z udziałem rodników szeregu tlenowego powstających w komórkach podczas przemian *o*-chinonów B[a]P w cyklu reakcji redoks (1).

Ponieważ ekspozycja komórek na B[a]P generuje stres oksydacyjny komórek, dieta bogata w roślinie przeciwutleniacze jest ważnym elementem chemoprewencji w narażeniu na ten promutagen. Jagody aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* Elliot) zawierają znaczną ilość związków polifenolowych, w tym flawonoidów, i spośród owoców/jagód okazują szczególnie wysoką aktywność antyoksydacyjną (2). Preparat AN jest oczyszczoną mieszaniną czterech cyjanidyn – antocyjanów z jagód aronii czarnoowocowej (3). Wcześniejsze badania własne pokazały, że AN wywierał znaczące działanie antyoksydacyjne i antymutagenne w hodowlach komórkowych (4).

W niniejszej pracy do oceny antygenotoksycznego działania AN w hodowlach ludzkich limfocytów eksponowanych na B[a]P zastosowane zostały: 1/ cytogenetyczna metoda uwidaczniania i zliczania wymian siostrzanych chromatyd chromosomowych (SCE, *sister chromatyd exchange*) w wydzielonej grupie metafaz okazujących wysoką liczbę SCE, tzw. metafaz HFC (*high frequency cells*), 2/ test elektroforezy pojedynczych komórek (test kometowy; *comet assay*).

Metafazy HFC, zawierają dużą liczbę wymian chromatyd siostrzanych – powyżej 95 percentyla rozkładu liczebności SCE (5). Grupa metafaz HFC reprezentu-

je komórki szczególnie wrażliwe na działanie badanego czynnika genotoksycznego (6).

Test kometkowy w warunkach alkalicznych (pH = 13) wykrywa nawet niewielką liczbę uszkodzeń DNA, w tym: pęknięć jednoniciowych, miejsc wrażliwych na warunki alkaliczne (*alkali-labile sites*), sieciowania DNA/DNA i DNA/białka, dlatego jest zalecany do wstępnego wykrywania aktywności genotoksycznej mutagenów; wielkość ogona komety koreluje z liczbą uszkodzeń/pęknięć nici DNA (7).

Zastosowane testy wykrywały uszkodzenia DNA w limfocytach ekspozowanych *in vitro* na małe stężenia B[a]P [2,5 µM]. Celem pracy była ocena wpływu preparatu AN na liczbę uszkodzeń genotoksycznych indukowanych w limfocytach przez B[a]P w wybranych testach.

MATERIAŁ I METODY

Badany preparat antocyjanowy (AN) był uzyskany w Katedrze Technologii Przetwórstwa Owoców i Warzyw Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (3). Preparat AN zawierał cztery glikozydy cyjanidyny: cyjanidyno-3-O-β-D-galaktozyd, -arabinozyd, -ksylozyd, -glukozyd. Dla całego preparatu AN przyjęto masę cząsteczkową równą 439,10, wyliczoną ze składu wagowego preparatu i mas cząsteczkowych poszczególnych cyjanidyn. AN był dodawany do hodowli komórek w roztworze wodnym i badany w zakresie stężeń: 1,56–25,0 µM. B[a]P był rozpuszczany w dimetylosulfotlenku (DMSO) i dodawany do hodowli do finalnego stężenia 2,5 µM (finalne DMSO w hodowlach: 0,05%).

Limfocyty były izolowane w gradiencie gęstości roztworu Histopaque-1077 z krwi żyłnej pięciu mężczyzn w wieku 45–55 lat, uznanych za zdrowych. Wszyscy badani dawcy przez okres ostatnich 15–20 lat palili papierosy, dziennie 20–30 papierosów typu „light”, nie nadużywali alkoholu, nie przyjmowali leków w okresie 2 tygodni przed pobraniem krwi. Limfocyty palaczy okazują wysoką aktywność endogennych monoooksygenaz mikrosomalnych aktywujących B[a]P do genotoksycznych metabolitów (8), dlatego w pracy nie stosowano egzogennej frakcji mikrosomalnej aktywującej B[a]P.

Limfocyty były preinkubowane z B[a]P [2,5 µM, 37°C, 90 min.] i po odplukaniu, były inkubowane z AN [zakres stężeń: 1,56 µM – 25,0 µM, 37°C, 90 min.]. Następnie komórki były hodowane przez 72 godz., w CO₂-inkubatorze, w 37°C w płynie hodowlanym (DMEM, 10% FBS) w obecności lektyny – PHA-M [10 µg/ml].

Procedura ujawniania wymian siostrzanych chromatyd w metafazach limfocytów inkubowanych z 5-bromodeoksyurydyną (30 µM, 48 godz.) przeprowadzona była zgodnie z rutynową metodą cytogenetyczną (9). Oceniana była liczba SCE w 30 metafazach, losowo napotkanych w obrazie mikroskopowym w każdej hodowli. Hodowle odniesienia stanowiły limfocyty inkubowane z 0,05% DMSO i nie inkubowane z B[a]P i AN. W hodowlach wyliczany był odsetek metafaz HFC oraz średnia liczba SCE w tej grupie metafaz.

Ocena pęknięć jednoniciowych DNA w limfocytach przeprowadzona była w teście elektroforezy pojedynczych komórek w warunkach alkalicznych (test kometkowy), zgodnie z metodyką podaną w piśmiennictwie (7). Oceniana była liczba komórek

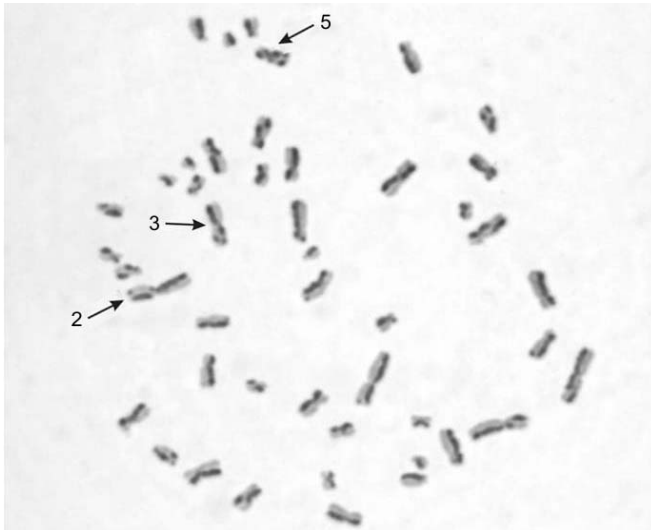
uszkodzonych genotoksycznie (komet) na 1000 losowo napotkanych w każdym preparacie mikroskopowym.

W ocenie istotności statystycznej wyników zastosowano rutynowy test *t*-Studenta, sparowany.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Mikrofotografia na Rycinie 1 pokazuje przykładową metafazę z hodowli ludzkich limfocytów inkubowanych z samym B[a]P [2,5 μ M, 90 min, 37°C] bez inkubacji z preparatem AN.

Metafaza zawiera 37 wymian chromatyd siostrzanych (SCE); strzałki wskazują chromosomy zawierające 2, 3 i 5 SCE.



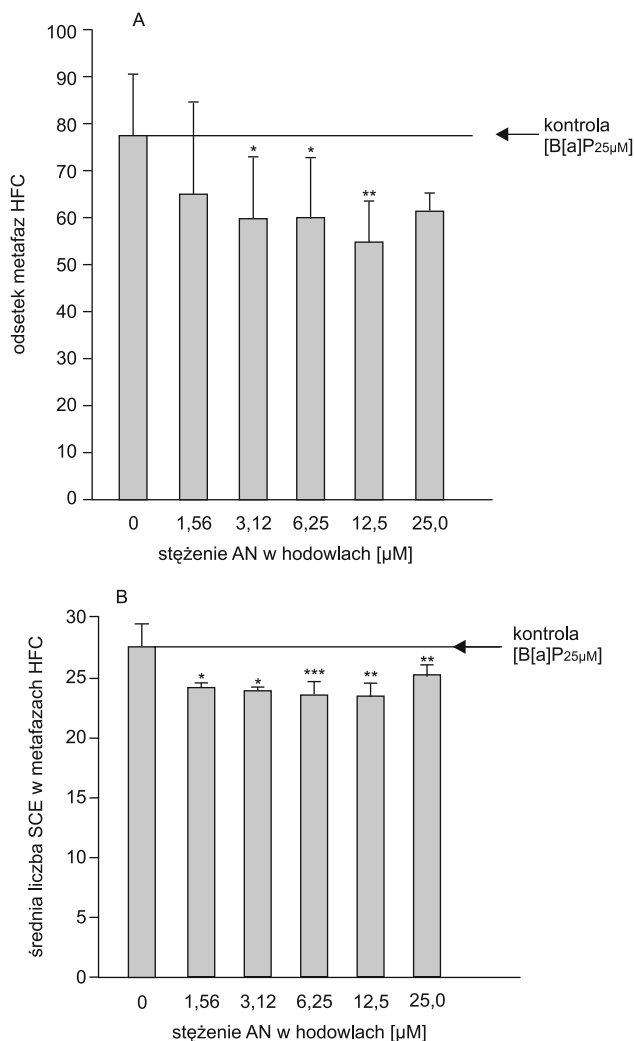
Ryc. 1. Metafaza HFC – zawierająca wysoką liczbę wymian siostrzanych chromatyd (SCE = 37); strzałki wskazują chromosomy zawierające 2, 3 i 5 SCE. Metafaza pochodzi z hodowli kontrolnej limfocytów preinkubowanych z B[a]P [2,5 μ M, 90 min., 37°C], nie inkubowanych z preparatem AN (powiększenie 1000x).

Fig. 1. Metaphase HFC – with high number of sister chromatid exchanges (SCE=37), arrows indicate chromosomes containing 2, 3 and 5 SCEs. Presented metaphase picture is from the control culture of lymphocytes preincubated with B[a]P [2,5 μ M, 90 min., 37°C] and not incubated with the AN preparation (magnification 1000x).

W histogramach na rycinie 2 zebrane zostały wyniki analizy SCE limfocytów ludzkich po preinkubacji z B[a]P i następczej inkubacji w obecności preparatu AN.

Hodowle limfocytów preinkubowane z B[a]P i następnie z AN okazywały znacznie niższy odsetek metafaz HFC w porównaniu do limfocytów hodowli kontrolnych inkubowanych z samym B[a]P bez następczej inkubacji z AN (Rycina 2A). Odsetek metafaz HFC był w tych hodowlach niższy o 17 – 31 % w porównaniu do hodowli z B[a]P. Wpływ AN na obniżenie średniej liczebności SCE w metafazach

grupy HFC (Rycina 2B) był słabszy od wpływu na odsetek metafaz zawierających HFC – obniżenie średniej liczby SCE w metafazach o 13 – 15% w porównaniu do hodowli z B[a]P.



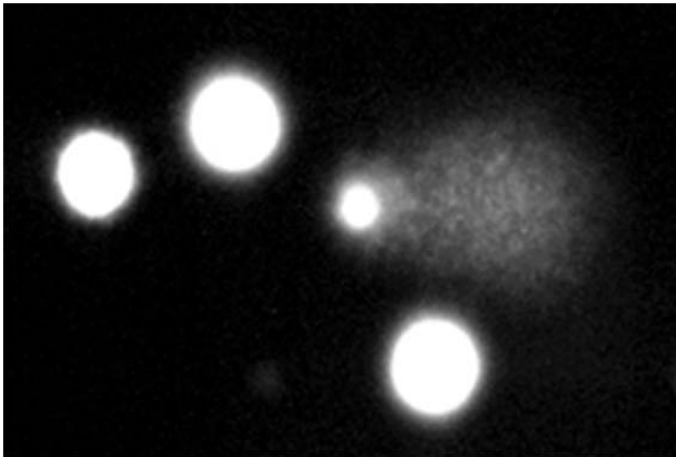
Ryc. 2. Wpływ inkubacji z AN na hodowle ludzkich limfocytów uszkodzonych genotoksycznie *in vitro* przez B[a]P. Histogramy przedstawiają odsetek metafaz HFC w hodowlach (2A) i średnie liczby SCE w tej grupie metafaz (2B). Istotność statystyczną wyników (średnia \pm SD, n = 5) w porównaniu do kontroli (hodowle inkubowane z B[a]P i nie inkubowane z AN) oceniono w teście *t* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Fig. 2. Impact of the AN preparation on lymphocyte cultures damaged genotoksycznie *in vitro* with B[a]P. Histograms show frequency of HFC metaphases in the tested cultures (2A) and mean number of SCE in those group of metaphases (2B). Statistical significance of the results (mean \pm SD, n = 5) compared to relative controls (cultures incubated with B[a]P and not incubated with AN), was calculated with *t* test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Wymiany siostrzanych chromatyd (SCE) powstają w komórkach w wyniku rekombinacyjnej naprawy uszkodzeń DNA, które nie zostały naprawione w mechanizmach naprawy przez wycinanie zasad (BER) i nukleotydów (NER). Według danych piśmiennictwa (10) wysoki odsetek metafaz HFC odzwierciedla obecność znacznej liczby uszkodzeń genotoksycznych w badanych populacjach komórek i świadczy o nasileniu procesów naprawy rekombinacyjnej, a więc wskazuje na większe prawdopodobieństwo błędów rekombinacji, powstania mutacji i transformacji nowotworowej tych komórek.

Preparat AN znacznie zmniejszał odsetek metafaz HFC w populacji limfocytów uszkodzonych genotoksycznie a także zmniejszał średnią liczbę SCE w tej grupie metafaz, wykazywał działanie antygenotoksyczne..

Potwierdzeniem działania AN zmniejszającego liczbę uszkodzeń, pęknięć nici DNA są wyniki uzyskane w teście kometowym. Przykładowy obraz mikroskopowy w teście kometkowym limfocytów eksponowanych na B[a]P przedstawiono na rycinie 3.

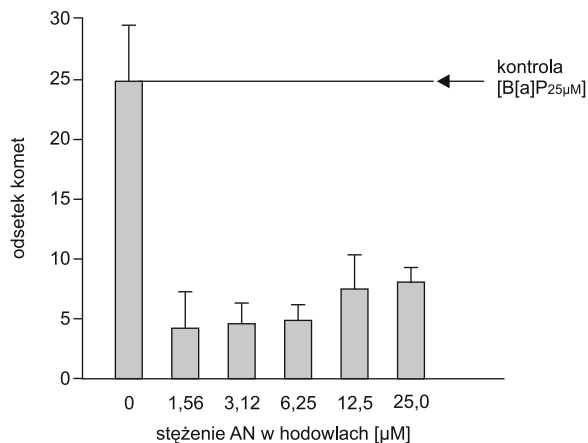


Ryc. 3. Mikrofotografia przykładowego obrazu z testu kometkowego w mikroskopie fluorescencyjnym (powiększenie 1000x). Obok trzech nieuszkodzonych jąder komórkowych (nukleoidów), jedna komórka zawiera liczne pęknięcia nici DNA i formuje obraz komety w elektroforezie żelowej. Mikrofotografia pochodzi z hodowli kontrolnej limfocytów inkubowanych z B[a]P [2,5µM, 37°C, 90 min].

Fig. 3. Exemplary microphotography of the comet test results under a fluorescence microscopy (magnification: 1000x) – Aside to three undamaged cell nuclei (nucleoids), one nucleoid contains multiple strand breaks of the DNA and forms the comet's picture in gel electrophoresis. Microphotography is from the control culture of lymphocytes incubated with B[a]P [2,5µM, 37°C, 90 min].

Mikrofotografia pokazuje jądra (nukleoidy) trzech limfocytów nieuszkodzonych i jednej komórki znacznie uszkodzonej – z dużą liczbą pęknięć nici DNA (kometka)

Histogramy na rycinie 4 obrazują częstość występowania w hodowlach komórek uszkodzonych genotoksycznie przez inkubację z B[a]P, ujawniających ogony komet.



Ryc. 4. Wpływ preparatu AN na odsetek komet w hodowlach limfocytów genotoksycznie uszkodzonych *in vitro* przez z B[a]P. Istotność statystyczną wyników (średnia \pm SD, n = 5) w porównaniu do kontroli (hodowle inkubowane z B[a]P, nie inkubowane z AN) oceniono w teście t (wszystkie $p < 0.01$).

Fig. 4. Impact of the AN preparation on frequency of comets in lymphocyte cultures genotoxically damaged *in vitro* with B[a]P. Statistical significance of the results (mean \pm SD, n = 5), compared to relative controls (cultures incubated with B[a]P and not incubated with AN) was calculated with *t* test (all $p < 0.001$).

Wyniki przedstawione w histogramach pokazują, że inkubacja z preparatem AN limfocytów uszkodzonych genotoksycznie przez B[a]P prowadziła do znacznego (4–6 –krotnego) zmniejszenia odsetka komet.

WNIOSKI

1. Inkubacja z preparatem AN hodowli limfocytów uszkodzonych genotoksycznie *in vitro* przez B[a]P prowadziła do zmniejszenia odsetka komórek HFC, obniżenia średniej liczby SCE w tej grupie komórek i zmniejszenia odsetka komórek zawierających pęknięcia nici DNA w teście kometkowym.
2. Preparat AN zmniejsza efekty działania genotoksycznego B[a]P na ludzkie limfocyty.

J.B. Brokos, K. Gąsiorowski

ANTOCYANINS FROM CHOKEBERRY FRUITS AS ANTIGENOTOXIC COMPOUNDS
IN HUMAN LYMPHOCYTE CULTURES

Summary

A purified extract of four cyanidins – anthocyanins from chokeberry fruits (the AN preparation), decreased *in vitro* the genotoxic effects of B[a]P on human lymphocyte cultures: it diminished the frequency of metaphases HFC (with a high number of sister chromatid exchange), lowered the mean number of SCE in this group of cells and markedly decreased the frequency of cells with DNA strand breaks. The results suggest that AN could be a potent antigenotoxic agent.

PIŚMIENICTWO

1. Penning T.M., Ohnishi S.T., Ohnishi T., Harvey R.G.: Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon *trans*-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.*, 1996; 9: 84-92. - 2. Slimestad R., Torskangerpoll K., Nateland H.S., Johannessen T., Giske N.H.: Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J. Food Compos. Anal.* 2005; (18): 61-68. - 3. Oszmiański J., Sabis J.C.: Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (Chokeberry). *J. Food Sci.*, 1988; 53 (4): 1241-1242. - 4. Gąsiorowski K., Szyba K., Brokos B., Kolaczyńska B., Jankowiak-Włodarczyk M., Oszmiański J.: Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Lett.*, 1997; 119 (1): 37-46. - 5. Ponzanelli I., Landi S., Bernacchi F., Barale R.: The nature of high frequency sister chromatid exchange cells (HFC). *Mutagenesis*, 1997; 12 (5): 329-333. - 6. Bonnassi S., Fontana V., Ceppi M., Barale R., Biggeri A.: Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of high sister chromatid frequency cells. *Mutat. Res.*, 1999; 438 (1): 13-21. - 7. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F.: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35 (3): 206-221. - 8. Ichiba M., Wang Y., Ahang J., Iyadomi M., Enoki M., Tomokuni K.: Inter-individual variation of smoking-related DNA adducts in lymphocytes-relationship to mRNA levels for CYP1A1 and DNA repair enzymes. *Biomarkers*, 2000; 5 (1): 235-239. - 9. Perry P.E., Wolff S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 1974; 251 (5471): 156-159. - 10. Bishop A.J.R., Schiestl R.H.: Homologous recombination and its role in carcinogenesis. *J. Biomed. Biotech.*, 2002; 2 (2): 75-85.

Adres: ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław