

*Ewa Kurzeja, Katarzyna Pawłowska-Góral*

## INTERAKCJE AZOTANÓW I KWERCETYNY – BADANIA IN VITRO\*

Katedra i Zakład Żywności i Żywienia  
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu,  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
Kierownik: dr hab. *K. Pawłowska-Góral*

*Pomimo udowodnionej korzystnej roli kwercetyny dla zdrowia człowieka, niektóre doniesienia wskazują na jej działanie apoptyczne, mutagenne i prooksydacyjne. Również wyniki badań dotyczących wpływu azotanów III i V na organizm człowieka są rozbieżne. Zwiększone spożycie zarówno azotanów, jak i antyoksydantów we współczesnej diecie skłoniło nas do podjęcia badań nad wpływem obu tych substancji na organizmy żywe. Celem pracy była próba ustalenia, czy i w jakim stopniu równoczesna obecność kwercetyny i azotanów wpływa na aktywność metaboliczną komórek. Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że obecność kwercetyny i azotanu sodu zmienia aktywność metaboliczną komórek, a zmiany te są zależne od stężenia kwercetyny.*

Hasła kluczowe: kwercetyna, azotany, adenozyntrifosforan (ATP), wskaźnik wzrostu hodowli ( $N/N_0$ ).

Key words: quercetin, nitrates, adenosine triphosphate (ATP), values of cell growth ( $N/N_0$ ).

Zainteresowanie badaniami nad wpływem azotanów na organizm człowieka wynika z ich powszechnego stosowania w rolnictwie oraz przetwórstwie żywności. Głównym źródłem związków azotowych w żywności są warzywa i produkty roślinne, produkty mięsne, woda pitna i ser. Wyniki badań dotyczących ich wpływu na organizm człowieka są rozbieżne. Jedne wskazują, że nadmierne spożycie azotanów wiąże się ze zwiększonym ryzykiem raka układu pokarmowego oraz wystąpienia methemoglobinemii, inne wykazują korzystne efekty działania azotanów, dzięki którym związki te mogą okazać się użyteczne w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób (1, 2, 3). Oprócz zwiększonego spożycia azotanów, coraz częściej spożywana jest żywność bogata w związki o właściwościach antyoksydacyjnych. Jedną z takich substancji jest kwercetyna, należąca do związków flawonoidowych. W licznych badaniach wykazano jej wielokierunkowe działanie: antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, detoksykacyjne i przeciwmiażdżycowe (4). Działanie antyoksydacyjne kwercetyny wynika z możliwości jej bezpośrednich reakcji z wolnymi rodnikami oraz działania modyfikującego przemiany prowadzące do ich powstawa-

---

\* Praca finansowana z Umowy Statutowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach KNW-1-015/P/2/0.

nia (5). Właściwości antyoksydacyjne kwercetyny związane są również z możliwością chelatowania jonów metali przejściowych (żelaza, miedzi), które uczestniczą w wielu reakcjach utleniania i redukcji (6). Kwercetyna posiada również właściwości neutralizujące toksyczność niektórych związków (7). Jednak niektóre doniesienia wskazują na jej działanie apoptyczne, mutagenne i prooksydacyjne (8).

Obserwowane zwiększone spożycie produktów zawierających zarówno azotany, jak i aktywne związki o właściwościach przeciwutleniających nasuwa pytanie dotyczące możliwości ich wzajemnych oddziaływań na organizmy żywe. W związku z tym, celem pracy było czy i w jakim stopniu równoczesna obecność kwercetyny i azotanów wpływa na aktywność metaboliczną komórek.

## MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na fibroblastach izolowanych metodą eksplantów tkanki ze skóry pobranej z ogona i brzucha myszy, szczepu BALB/c. Zwierzęta pochodziły z hodowli w Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, a zgodę na badania wydała Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach SUM. Wybór fibroblastów, jako modelu badawczego, był spowodowany m.in. łatwością ich izolacji, możliwością namnożenia dużej liczby komórek oraz wysoką jednorodnością komórek, dzięki czemu uzyskuje się dużą powtarzalność wyników. Fibroblasty hodowano w pożywce Dulbecco'a DMEM z  $\text{NaNO}_3$  ( $10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) i/lub kwercetyną. Stężenie kwercetyny Q1, Q2 i Q3 wynosiło odpowiednio:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  i  $10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ . Stężenia zostały ustalone w efekcie przeprowadzenia badań pilotowych. Wybrano stężenia, przy których nie obserwowano działania cytotoksycznego, czyli dodane substancje nie powodowały wyższej niż w hodowlach kontrolnych śmiertelności komórek. Hodowle prowadzono przez 1, 4 i 6 dni, w inkubatorze firmy Heraeus, w temp.  $37^\circ\text{C}$ , atmosferze zawierającej 5%  $\text{CO}_2$ . Komórki wybarwiano 0,4% błękitem trypanu (9), zliczano za pomocą licznika komórek Countess<sup>TM</sup> firmy Invitrogen. Wskaźnik wzrostu hodowli ( $N/N_0$ ) wyznaczono jako iloraz liczby fibroblastów w  $1 \text{ cm}^3$  pożywki w dniu zakończenia (N) i w dniu założenia ( $N_0$ ) hodowli. Stężenie ATP oznaczano w komórkach za pomocą zestawu testów firmy Perkin-Elmer. Zasada oznaczenia polega na reakcji ATP z D-lucyferyną w obecności lucyferazy, której towarzyszy emisja światła (10). Uzyskane wyniki przeliczono na 1 mg białka komórkowego. Białko oznaczono z wykorzystaniem metody Lowry (11). Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach, a otrzymane wyniki poddano opracowaniu statystycznemu. Obliczono wartości podstawowych parametrów opisowych: średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Grupy kontrolne i badane porównano testem t-; wariancje prób były jednorodne (STATISTICA 10.0).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Interakcje zachodzące pomiędzy składnikami żywności są coraz częściej tematem prac badawczych (12,13). Jednak mało jest badań *in vitro*, w których oceniany jest bezpośredni wpływ oddziaływań składników żywności na komórki.

W ocenie hodowli komórkowej duże znaczenie ma cytofizjologiczna charakterystyka komórek, która może być oparta na wyznaczeniu ich żywotności. Żywotność fibroblastów, określona na podstawie testu integralności błon (wybarwienie komórek błękitem trypanu) w preparatach wynosiła powyżej 95%. W badaniach *in vitro* interesująca jest też szybkość namnażania i zagęszczenia komórek pod wpływem substancji egzogennych. Hamowanie lub zwiększenie wzrostu komórek jest parametrem ich odpowiedzi biologicznej na rodzaj i stężenie związków dodanych do hodowli komórkowej. Obliczone wartości wskaźnika wzrostu komórek ( $N/N_0$ ) przedstawiono w tab. I. Dodanie azotanu (V) sodu do hodowli spowodowało zmniejszenie wzrostu fibroblastów o 25–47% w zależności od czasu trwania hodowli. Obecność kwercetyny wraz ze wzrostem jej stężenia i wydłużaniem czasu hodowli powodowała niewielkie, nieistotne statystycznie hamowanie wzrostu komórek. Równoczesna obecność w podłożu azotanu i kwercetyny hamowała wzrost komórek w sposób zależny od czasu hodowli oraz stężenia kwercetyny. Niższe stężenia kwercetyny dodanej łącznie z azotanem (V) sodu (Q1+NaNO<sub>3</sub>), w mniejszym stopniu hamowały wzrost komórek niż stężenia wyższe (Q2+NaNO<sub>3</sub> i Q3+NaNO<sub>3</sub>). Fakt ten może wskazywać na ochronne działanie kwercetyny w małych dawkach.

Tab e l a I. Wartości wskaźnika wzrostu komórek ( $N/N_0$ ) w hodowlach fibroblastów

Tab l e I. Values of cell growth ( $N/N_0$ ) in cultured fibroblasts

| Hodowla              | 1 dzień    | 4 dzień    | 6 dzień    |
|----------------------|------------|------------|------------|
| Kontrola             | 2,10±0,20  | 4,01±0,32  | 5,99±0,45  |
| NaNO <sub>3</sub>    | 1,49±0,12* | 3,01±0,29* | 3,20±0,38* |
| Q1                   | 2,10±0,22  | 3,97±0,31  | 5,84±0,39  |
| Q2                   | 2,10±0,21  | 3,91±0,28  | 5,59±0,39  |
| Q3                   | 1,90±0,19  | 3,60±0,35  | 5,30±0,36  |
| Q1+NaNO <sub>3</sub> | 1,70±0,10* | 3,40±0,27* | 4,37±0,38* |
| Q2+NaNO <sub>3</sub> | 1,67±0,16* | 3,18±0,20* | 4,02±0,27* |
| Q3+NaNO <sub>3</sub> | 1,60±0,09* | 2,93±0,14* | 3,73±0,35* |

NaNO<sub>3</sub> – hodowla z azotanem (V) sodu; Q1 – hodowla z kwercetyną o stężeniu: 10<sup>-7</sup> mol/dm<sup>3</sup>; Q2: 10<sup>-6</sup> mol/dm<sup>3</sup>; Q3: 10<sup>-5</sup> mol/dm<sup>3</sup>; Q1+NaNO<sub>3</sub> – hodowla z azotanem i kwercetyną (o stężeniach Q1, Q2 i Q3). Wyniki są przedstawione jako wartość średnia (n=3); \* p<0,05 wobec kontroli.

Źródłem ATP w komórce jest zarówno fosforylacja substratowa, jak i fosforylacja oksydacyjna. Jednym z następstw stresu oksydacyjnego w komórkach może być zmniejszenie wytwarzania ATP, które jest efektem inaktywacji enzymów zawierających grupy –SH, przez reaktywne formy tlenu (14). Aktywność biochemiczną hodowanych fibroblastów oceniono poprzez określenie w nich zmian stężenia ATP, a uzyskane wyniki przedstawiono w tab. II. Zaobserwowany ok. 10% spadek ATP w fibroblastach dłużej hodowanych w obecności azotanu (V) sodu, wskazuje na zaburzenie metabolizmu komórek. Obecność w pożywce kwercetyny o najwyższym zastosowanym stężeniu Q3 i hodowli trwającej 6 dni, również powodowała spadek stężenia ATP (ok. 15%), co może wskazywać na ingerencję kwercetyny w reakcje redoks podczas tworzenia ATP. W fibroblastach hodowa-

Tabela II. Stężenie ATP ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  białka) w hodowanych fibroblastachTable II. ATP concentration ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein) in cultured fibroblasts

| Hodowla              | 1 dzień     | 4 dzień      | 6 dzień      |
|----------------------|-------------|--------------|--------------|
| Kontrola             | 0,122±0,008 | 0,128±0,006  | 0,125±0,008  |
| NaNO <sub>3</sub>    | 0,125±0,011 | 0,123±0,010  | 0,113±0,007* |
| Q1                   | 0,130±0,010 | 0,131±0,008  | 0,119±0,010  |
| Q2                   | 0,131±0,011 | 0,129±0,011  | 0,117±0,010  |
| Q3                   | 0,131±0,011 | 0,121±0,008* | 0,108±0,008* |
| Q1+NaNO <sub>3</sub> | 0,133±0,009 | 0,124±0,004  | 0,117±0,010  |
| Q2+NaNO <sub>3</sub> | 0,131±0,009 | 0,128±0,007  | 0,117±0,007  |
| Q3+NaNO <sub>3</sub> | 0,125±0,010 | 0,116±0,004* | 0,108±0,003* |

NaNO<sub>3</sub> – hodowla z azotanem (V) sodu / cell culture with sodium nitrate (V); Q – hodowla z kwercetyną o stężeniu: Q1:  $10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>, Q2:  $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>, Q3:  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>; Q+NaNO<sub>3</sub> – hodowla z azotanem i kwercetyną (o stężeniach Q1, Q2 i Q3); Wyniki są przedstawione jako wartość średnia (n=3); \* p<0,05 wobec kontroli.

nych równocześnie z azotanem i kwercetyną o największym stężeniu (Q3+NaNO<sub>3</sub>), wystąpiło zmniejszenie ATP wraz z wydłużaniem czasu hodowli. Istotne statystycznie zmiany stwierdzono, dla tego układu, w 4 i 6 dniu hodowli. W prowadzonych wcześniej badaniach zaobserwowaliśmy, iż równoczesna obecność azotanu (V) sodu i kwercetyny w podłożu hodowlanym, powodowała wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych fibroblastów, czyli następowała ingerencja w homeostazę redoks komórek (15). Największe zmiany aktywności enzymów odnotowano w obecności największego stężenia kwercetyny. Wzrost aktywności enzymów, przy jednoczesnym spadku stężenia ATP w komórkach, wskazuje na udział kwercetyny w metabolizmie fibroblastów, narażonych na azotan. Istotną rolę w metabolizmie komórkowym i produkcji energii ATP ma układ fosforylacji oksydacyjnej. *De Paeppe* i współpr. (16) wykazali, że resweratrol (potencjalny antyoksydant) w stężeniu  $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$  nie normalizował fosforylacji oksydacyjnej w hodowlach ludzkich fibroblastów, poddanych stresowi oksydacyjnemu. Odnotowany przez nas wzrost stężenia ATP w fibroblastach krótko hodowanych z azotanem (V) i równocześnie z kwercetyną w małych stężeniach ( $0,1$  i  $1,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ), mógł być wynikiem stabilizacji fosforylacji oksydacyjnej przez kwercetynę. Natomiast podczas długotrwałego narażenia fibroblastów na azotan (V) kwercetyna, zwłaszcza w największym stężeniu ( $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ), nie normalizowała stężenia ATP w komórkach.

## WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują, że równoczesna obecność kwercetyny i azotanu (V) sodu w hodowli fibroblastów miała wpływ na wskaźnik wzrostu komórek oraz ich aktywność metaboliczną. Wielkość zmian zależała zarówno od stężenia kwercetyny, jak i od czasu ekspozycji na badane związki. Można przypuszczać, że spożywanie dużej ilości kwercetyny, zwłaszcza długotrwałe, przy jednoczesnym spożyciu produktów zawierających azotany (V), może mieć wpływ na funkcjonowanie or-

ganizmu. W związku z tym należałoby przeprowadzić dalsze badania dotyczące potencjalnych interakcji azotanów z kwercetyną oraz innymi substancjami o właściwościach przeciwutleniających.

E. Kurzeja, K. Pawłowska-Góral

#### NITRATES AND QUERCETIN INTERACTIONS – IN VITRO MODEL

##### Summary

Despite the beneficial role of quercetin for human health, some reports suggest its apoptotic, mutagenic and prooxidative activity. Also, research results concerning the influence of nitrates on human body are divergent. Increased amounts of both nitrates and antioxidants in contemporary diet prompted our research on the effects of both these types of substances on living organisms. The aim of the study was to establish whether, and if so, to what degree, the simultaneous presence of quercetin and sodium nitrate influenced cell metabolism. The research was conducted on mouse fibroblasts cultivated in a medium with  $\text{NaNO}_3$  (1 mM) and/or quercetin (0.1, 1.0 and 10  $\mu\text{M}$ ). The viability of the cells was established by staining with 0.4% trypan blue. Cell culture growth index was calculated after counting the cells with Invitrogen Countess™ counter. The ATP concentration in the cells was measured using a Perkin-Elmer test set. The simultaneous exposure of the cells to nitrate and quercetin inhibited their growth less than nitrate alone. Longer exposure of fibroblasts to nitrate or quercetin at 10  $\mu\text{M}$ , as well as to both these compounds together, caused a decrease in ATP concentration, indicating disturbed cell metabolism. An increase in ATP concentration in a short-term culture with nitrate and quercetin at lower concentrations (0.1 and 1.0  $\mu\text{M}$ ) could result from the stabilization of oxidative phosphorylation by quercetin. Prolonged exposure to quercetin at 10  $\mu\text{M}$  did not result in the normalization of ATP concentration in the cells.

The results indicate that the simultaneous presence of quercetin and sodium nitrate in a fibroblast culture influenced the cell growth indicator and changed the metabolic activity of fibroblasts. The magnitude of changes depended both on quercetin concentration and the time of exposure to the compounds tested. It may be assumed that the ingestion of large amounts of quercetin, especially over an extended period of time, accompanied by the ingestion of products containing nitrates may affect the functioning of the body.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Hord N.G., Tang Y., Bryan N.S.*: Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009; 90: 1-10.
2. *Lundberg J.O., Feelisch M., Bjorne H., Jansson E.A., Weitzberg E.*: Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer? *Nitric Oxide*, 2006; 15(4): 359-362.
3. *Gilchrist M., Winyard P.G., Benjamin N.*: Dietary nitrate – good or bad? *Nitric Oxide*, 2010; 22(2): 104-109.
4. *Harwood M., Danielewska-Nikiel B., Borzelleca J.F., Flamm G.W., Williams G.M., Lines T.C.*: A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.*, 2007; 45(11): 2179-2205.
5. *Lakhanpal P., Rai D.K.*: Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update* 2007; 2(2): 22-37.
6. *Sun S., Chen W., Cao W., Zhang F., Song J., Tian C.*: Research on the chelation between quercetin and Cr(III) ion by Density Functional Theory (DFT) method. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2008; 860: 40-44.
7. *Yousef M.I., Omar S.A., El-Guendi M.I., Abdelmegid L.A.*: Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem. Toxicol.* 2010; 48(11): 3246-3261.
8. *Gliszczyńska-Świgło A., van der Woude H., de Haan L., Tyrakowska B., Aarts J.M., Rietjens I.M.*: The role of quinone reductase (NQO1) and quinone chemistry on quercetin cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*, 2003; 17(4): 423-431.
9. *Philips D.J.*: Dye exclusion test for cell viability, in: tissue, culture, methods and application. *Acad. Press.*, 1978; 406-408.
10. *Kangas L., Gronroos M., Nieminen A.L.*: Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *Med. Biol.*, 1984; 62: 338-343.

11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275. – 12. Bartoń H., Folta M., Chlopicka J., Kulawik A.: Badanie (*in vitro*) wpływu interakcji pomiędzy ekstraktami kawy a kwasem askorbinowym i wybranymi polifenolami na ich właściwości antyoksydacyjne. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2014; 47(3): 264-269. – 13. Gliszczyńska-Świgło A., Szymusiak H.: Interakcje między składnikami suplementów diety na przykładzie kwercetyny i witaminy C. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 2009; 4(65): 278-285. – 14. Oláh J., Klivényi P., Gardian G., Vécsei L., Orosz F., Kovacs G.G., Westerhoff H.V., Ovádi J.: Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice. *FEBS J*, 2008; 275(19): 4740-55. – 15. Kurzeja E., Stec M., Synowiec-Wojtarowicz A., Jowska A., Pawłowska-Góral K.: Studies on the effect of quercetin and nitrates on the redox homeostasis using *in vitro* model. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2014; 38(1): 24-30. – 16. De Paepe B., Vandemeulebroecke K., Smet J., Vanlander A., Seneca S., Lissens W., Van Hove J.L., Deschepper E., Briones P., Van Coster R.: Effect of resveratrol on cultured skin fibroblasts from patients with oxidative phosphorylation defects. *Phytother Res.*, 2014; 28(2): 312-316.

Adres: 41-200 Sosnowiec, ul. Jedności 8