

Poškodenie DNA látkami rozpustenými vo vode z propolisu a flavonoidu kvercetínu v prítomnosti Cu^{2+}

JOZEF ŠIMÚTH

Súhrn. Pomocou agarózovej gélovej elektroforézy sa sledoval účinok látok rozpustených vo vode z propolisu (VRP) a rastlinného flavonoidu kvercetínu na chromozómovú a plazmidovú DNA.

Zistilo sa, že k poškodeniu DNA účinkom VRP alebo kvercetínu dochádza až po 72. hodinách. V prítomnosti Cu^{2+} , VRP, ako aj kvercetínu dochádza k rádozo rýchlejšiemu rozkladu DNA. Predpokladá sa, že k rozkladu DNA dochádza účinkom voľných radikálov.

Rastliny, ako zdroj ľudskej výživy sú predmetom výskumu nielen z hľadiska potravinárskeho, ale aj pre svoje farmaceutické vlastnosti využívané v tradičnej ľudovej i modernej alternatívnej medicíne. Takmer vo všetkých vekových kategóriách obyvateľstva zaznamenávame v dennej potrave zvýšenú konzumáciu potravín rastlinného pôvodu. V potravinovom reťazci sa takto začína zvyšovať množstvo rôznych rastlinných zlúčenín. Medzi tieto zlúčeniny patria aj flavonoidy, ktoré majú významnú regulačnú funkciu vo flexibilných ochranných systémoch rastlín.

Flavonoidy sú dôležité pri pigmentácii kvetov a ochrane pred UV žiarením [1], jednoduché flavonoidy ako naringenín a luteolín, sú signálmi indukcie génov hľuzkotvorných baktérií žijúcich v symbióze so strukovinami [2] a niektoré flavonoidy zase regulujú transport auxínov v rastlinách [3]. Človek prijíma denne v rastlinnej potrave okolo 50 mg „kvercetínových ekvivalentov“ [4]. Flavonoidy sa zúčastňujú aj na vytváraní dôležitej organoleptickej vlastnosti potravín — farbe [5]. Rôzne druhy flavonoidov [6, 7] sa hojne vyskytujú v liečivých rastlinách a v lepidovom ochrannom povlaku povrchu púčikov rastlín. Včela v evolučnej symbióze s rastlinami zbiera tieto ochranné materiály rastlín, homogenizuje ich s výlučkami vlastných žliaz, najmä proteínmi [8] a používa ich ako

Ing. Jozef Šimúth, DrSc., Laboratórium génového inžinierstva, Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava.

vnútornú ochrannú vrstvu úľa, známu pod názvom propolis. Človek oddávna využíva v ľudovom liečiteľstve hojivé antimikrobiálne, antivirálne a iné vlastnosti extraktov z propolisu. Otázky spojené s polyfunkčnosťou flavonoidov v rastlinách a podstata ich biologického účinku v rôznych živých systémoch sa stávajú predmetom molekulárno-biologického výskumu, najmä z hľadiska ich mutagénneho účinku [4].

Zatiaľ nie sú k dispozícii údaje, ktoré by indikovali, že orálne prijímané flavonoidy sú spojené s mutagenicitou, karcinogenicitou alebo inou chronickou toxicitou. S cieľom objasniť účinok flavonoidov nachádzajúcich sa v rastlinnej potrave a v extraktoch propolisu sme sledovali pôsobenie modelového flavonoidu kvercetínu a vo vode rozpustnej frakcie propolisu na najuniverzálnejšiu biologickú makromolekulu DNA v prítomnosti Cu^{2+} .

Materiál a metódy

Propolis sa zbieral v mnohých oblastiach Slovenska (rok 1989) a poskytoval ho Medos, Galanta. Quercetín (3,3,4,5,7-pentahydroxyflavón) dodala firma Sigma, St. Louis (USA). Ostatné biochemikálie a chemikálie boli od firmy Serva, Heidelberg (Nemecko).

Príprava látok rozpustných vo vode z propolisu (VRP). 100 g propolisu sa miešalo s 500 ml dvojnásobne destilovanej vody počas 48 h pri laboratórnej teplote. Potom sa suspenzia prefiltrovala cez sklenenú vatu a centrifugovala 15 min pri $10\,000 \times g$. Číry supernatant sa použil na experimenty. Sušina okolo $30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Príprava plazmidu pBR 322. Kovalentne uzavretá kruhová dvojšpirála (cccDNA) plazmidu pBR 322 sa pripravila ako opísal Kupersztoch a kol. [9].

Agarózová gélová elektroforéza. Vzorka obsahujúca okolo $0,1 \mu\text{g}$ DNA sa naniesla na 1 % agarózový gél. Elektroforéza prebiehala pri teplote miestnosti v prítomnosti $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-acetátu, pH 8,2 a $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA, pri napätí 10 V na 1 cm gélu. Po elektroforéze sa gél zafarbil roztokom etídiumbromidu ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Za týchto podmienok putujú k anóde základné topologické formy plazmidovej DNA v tomto poradí: kovalentne uzavretá kruhová dvojšpirála (cccDNA), lineárna plazmidová DNA a najpomalšie sa pohybuje kruhová dvojšpirála DNA (ncDNA).

Interakcia plazmidovej DNA látkami rozpustnými vo vode z propolisu (VRP). $0,15 \mu\text{g}$ DNA plazmidu pBR 322 v 1 ml dvojnásobne destilovanej vody sa umiestnilo do dialyzačného vrecúška a vložilo do 500 ml VRP v $0,3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl a miešalo pri teplote miestnosti. V kontrolnom experimente $0,15 \mu\text{g}$ DNA plazmidu pBR 322 v 1 ml dvojnásobne destilovanej vody sa dialyzovalo oproti 500 ml $0,3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl v dvojnásobne destilovanej vode a miešalo pri teplote

miestnosti. V rôznych časových intervaloch (2, 6, 24 a 72 h) sa z dialyzačného vrecúška pipetovalo 10 μ l a použilo na agarózovú gélovú elektroforézu.

Výsledky a diskusia

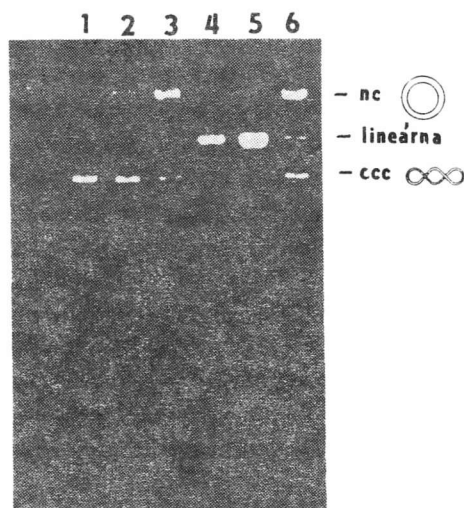
Za veľmi citlivý indikátor poškodenia DNA rôznymi zlúčeninami je prerušenie väzby zlom v jednom alebo v oboch vláknach dvojšpirálovej DNA plazmidu pBR 322. Tieto „zlomy“ v molekule plazmidovej DNA, spôsobené často aj voľnými radikálmi, sa dajú identifikovať pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

Plazmidová DNA vytvára tzv. nadšpirálovú štruktúru, kovalentne uzavretú kruhovú dvojšpirálu (z anglického covalently closed circular duplex — označenie: cccDNA). Táto cccDNA sa po prerušení jedného z vlákien mení na kruhovú dvojšpirálu (z anglického nicked duplex DNA — označenie: ncDNA) a po prerušení v oboch vláknach DNA vzniká lineárna molekula dvojšpirály DNA (z anglického linear duplex DNA).

Účinok VRP na plazmidovú DNA sme sledovali pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Zmeny v molekule plazmidu pBR 322 sme zaznamenali až po 72-hodinovom pôsobení VRP (obr. 1) a prejavili sa v tom, že cccDNA sa prerušuje v jednom zo svojich reťazcov a mení na kruhovú plazmidovú DNA (obr. 1, línia 3). Tento experiment ukazuje, ako pomaly dochádza k poškodeniu DNA látkami rastlinného pôvodu, takže tieto látky by v podmienkach normálneho fyziologického trávenia nemali priamo poškodzovať DNA a teda by nemali pôsobiť ako genotoxíny. Treba však mať na zreteli jednak trvalú záťaž organizmu týmito zlúčeninami, jednak možnosť ochranného účinku iných látok zamedzujúcich poškodenie DNA v organizme.

Látky rozpustné vo vode z propolisu ovplyvňuje po dlhodobom pôsobení aj biologickú funkciu DNA. Restrikčná endonukleáza Eco RI (obr. 1, línia 6) nie je schopná rozštiepiť molekulu DNA plazmidu pBR 322, ktorá bola vystavená 72-hodinovému pôsobeniu VRP v porovnaní s kontrolnými experimentmi (obr. 1, línia 4 a 5). Plazmidová DNA po 72-hodinovom pôsobení látkami rozpustnými vo vode z propolisu stráca až 50 % svojej templátovej aktivity v transkripcii in vitro (experiment sa neuvádza). Poškodenie molekuly plazmidovej DNA a zníženie jej biologickej aktivity v dôsledku dlhodobého pôsobenia látkami rozpustnými vo vode z propolisu má istú analógiu s účinkom iných, biologicky účinných látok rastlinného pôvodu na DNA v dôsledku vzniku voľných radikálov, ktorých produkcia sa rádovo zvyšuje v prítomnosti niektorých dvojmocných kovov, najmä však Cu^{2+} [10].

Na obr. 2 vidieť účinok látok rozpustných vo vode z propolisu a kvercetínu na chromozómovú DNA v prítomnosti 0,1 mmol \cdot l⁻¹ CuCl_2 po 24-hodinovom



Obr. 1. Účinok VRP na DNA plazmidu pBR 322. Reakčné podmienky sú uvedené v kap. Materiál a metódy. Po 72-hodinovom pôsobení VRP na cccDNA sa vzorky analyzovali agarózovou gélovou elektroforézou priamo (linie 1—3) alebo po inkubácii s restriktčnou endonukleázou Eco RI (linie 4—6).

Linia 1 a 4: pBR 322 po 72-hodinovom státi v dest. H_2O pri teplote miestnosti.

Linia 2 a 5: pBR 322 cccDNA po 72-hodinovej dialýze oproti $0,3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ v H_2O .

Linia 3 a 6: pBR 322 cccDNA po 72-hodinovej dialýze oproti VRP v $0,3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$.

Fig. 1. Effect of VRP on DNA of plasmid pBR 322. Reaction conditions are stated in chapter Material and methods. After a 72-hour action of VRP on cccDNA, the samples were analysed by agarose gel electrophoresis directly (lines 1—3) or after incubation using restriction endonuclease EcoRI (lines 4—6).

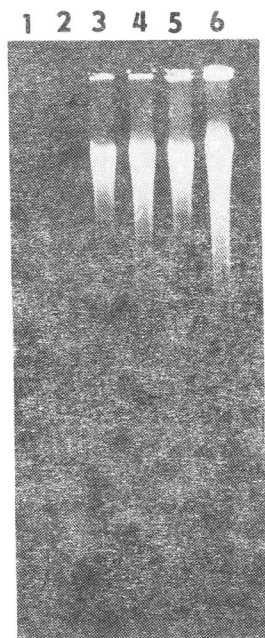
Lines 1 and 4: pBR 322 cccDNA after 72 hours in distilled water at room temperature.

Lines 2 and 5: pBR 322 cccDNA after 72 hours dialysis against $0.3 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$ in H_2O .

Lines 3 and 6: pBR 322 cccDNA after 72 hours dialysis against VRP in $0.3 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$.

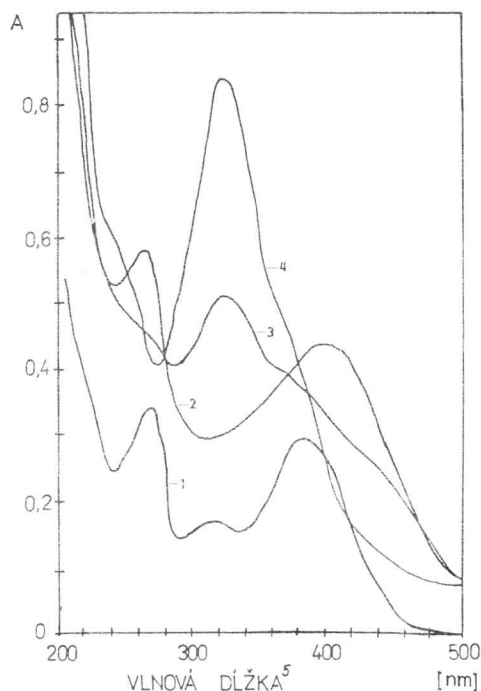
pôsobení pri teplote miestnosti. Dochádza k rozkladu vysokopolymérnej DNA telacieho týmusu až na nízkomolekulové fragmenty (obr. 2, linia 1). Výsledok tejto reakcie je podobný enzýmovému rozkladu DNA účinkom dezoxynukleáz, preto sa zlúčeniny podobných vlastností označujú ako chemické nukleázy [11]. V prítomnosti Cu^{2+} nastávajú výrazné zmeny v molekule kvercetínu (obr. 3) ako dôsledok oxidačno-redukčných reakcií s následnou generáciou voľných radikálov, ktoré sa zúčastňujú rozkladu DNA. Súčasne s našimi experimentmi [12] potvrdil poškodenie DNA flavan-3-olmi v prítomnosti Cu^{2+} iónov aj Shirahata a kol. [13].

Získané výsledky poukazujú na to, že flavonoidy a látky rozpustné vo vode z propolisu môžu v prítomnosti vyššej koncentrácie tranzitných kovov spôsobiť



Obr. 2. Účinok VRP a kvercetínu na DNA teľacieho týmusu h v prítomnosti Cu^{2+} .
 Reakčné podmienky: Reakčná zmes (1 ml) obsahuje 0,16 mg DNA teľacieho týmusu, $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 , $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.2.
 VRP (115 optických jednotiek pri 285 nm) alebo 50 μg kvercetínu. Kontrolné experimenty sa robili za rovnakých podmienok s tým, že sa nepoužili ióny Cu^{2+} .
 Po 24-hodinovej inkubácii pri 25°C sa odpipetovalo z reakčnej zmesi 10 μl a použilo pre gélovú elektroforézu v 1 % agarózovom géli.
 Línia 1: Účinok kvercetínu na DNA v prítomnosti $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 .
 Línia 2: Účinok VRP na DNA v prítomnosti $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 .
 Línia 3: Účinok kvercetínu na DNA.
 Línia 4: Účinok VRP na DNA.
 Línia 5: Účinok $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 na DNA.
 Línia 6: DNA teľacieho týmusu (2 $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$).

Fig. 2. VRP and quercetin effect on DNA of calf thymus in the presence of Cu^{2+} .
 Reaction conditions: Reaction mixture (1 ml) contains 0.16 mg DNA of calf thymus' thymus. $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 , $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.2.
 WSP (115 optical units at 285 nm) or 50 μg quercetine. Checking experiments were carried out under the same conditions, but without the use of Cu^{2+} ions. After 24-hour incubation at 25°C , 10 μl from reaction mixture was withdrawn and used for gel electrophoresis in 1% agarose gel.
 Line 1: Quercetin effect on DNA in the presence of $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 .
 Line 2: VRP effect on DNA in the presence of $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 .
 Line 3: Quercetin effect on DNA.
 Line 4: VRP effect on DNA.
 Line 5: Effect of $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 on DNA.
 Line 6: DNA of calf thymus thymus (2 $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$).



Obr. 3. Zmeny spektrofotometrických vlastností kvercetínu v prítomnosti Cu^{2+} . Reakčná zmes obsahuje $0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,2, $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuCl_2 a $150 \mu\text{g}$ kvercetínu v 1 ml. Ihneď po zmiešaní komponentov sa reakčná zmes zriedila 1 : 10 s $0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,2. Reakcia prebiehala pri teplote miestnosti a meralo sa na spektrofotometri PYE UNICAM, Model 600.

1 — kvercetín v neprítomnosti Cu^{2+} , 2 — kvercetín v prítomnosti CuCl_2 po 4-min inkubácii, 3 — kvercetín v prítomnosti CuCl_2 po 10-min inkubácii, 4 — kvercetín v prítomnosti CuCl_2 po 20-min inkubácii. A — absorbancia.

Fig. 3. Alteration of spectrophotometric properties of quercetin in the presence of Cu^{2+} . Reaction mixture contains 0.01 mol l^{-1} Tris-HCl, pH 8.2, 0.25 mmol l^{-1} CuCl_2 plus $150 \mu\text{g}$ quercetin in 1 ml. Immediately after the blending of components, reaction mixture was diluted (1 : 10) with 0.01 mol l^{-1} Tris-HCl, pH 8.2. Reaction ran at room temperature and measurements were carried out using spectrophotometric device PYE UNICAM, Model 600.

1 — Quercetin without Cu^{2+} , 2 — Quercetin in the presence of CuCl_2 after 4-min incubation, 3 — Quercetin in the presence of CuCl_2 after 10-min incubation, 4 — Quercetin in the presence of CuCl_2 after 20-min incubation, 5 — Wavelength. A — Absorbance.

poškodenie DNA. To potvrdzuje dávno známu zásadu v potravinárskej technológii — zamedziť počas spracovania, uskladnenia a konzumácie potravy kontakt s voľnými iónmi kovov, ako aj látkami schopnými produkovať voľné radikály.

Literatúra

1. HAHLBROCK, K. — SCHEEL, D., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 1989, s. 347.
2. LONG, S. R., *Cell*, 56, 1989, s. 203.
3. JACOBS, M.—RUBERY, P. H., *Science*, 241, 1988, s. 346.
4. BROWN, J. P., *Mutation Res.*, 25, 1980, s. 243.
5. PRÍBELA, A.—MÁRIASSYOVÁ, M., *Bull. potr. Výsk.*, 28, 1989, s. 1.
6. SUCHÝ, V. a kol., *Farm. Obzor*, 50, 1981, s. 543.
7. GREENAWAY, W. a kol., *Proc. R. Soc. Lond. B*, 232, 1987, s. 242.
8. TUHÁ, M.—ŠIMÚTH, J., *Farm. Obzor* (v tlači).
9. KUPERSZTOCH a kol., *Biochemistry*, 13, 1974, s. 5484.
10. WATANABE, K. a kol., *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1986, s. 1459.
11. SIGMAN, D. S.—CHEN, Ch. B., *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 1989, s. 207.
12. ŠIMÚTH, J., *Proc. Symp. Medicines of Plant Origin in Modern Therapy*, Eds. J. Hubik and Novotný Prague, Videopress Tokyo, Sumura Co. 1990, s. 117.
13. SHIRAHATA, S. a kol., *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1989, s. 299.

Do redakcie došlo: 11. 9. 1991.

Повреждение ДНК веществами растворимых в воде из прополиса и флавоноида кверцетина в присутствии Cu^{2+}

Резюме

С помощью агарозного гелевого электрофореза наблюдалось влияние веществ растворимых в воде из прополиса (VRP) и растительного флавоноида кверцетина на хромосомальную и плазмидную ДНК.

Установлено, что к повреждению ДНК действием VRP или кверцетина происходит после 72 часов. В присутствии Cu^{2+} VRP но и кверцетина доходит к порядкогo ускоренному разложению ДНК. Предполагается, что к разложению ДНК приходит действием свободных радикалов.

DNA damage by water-soluble substances from propolis and flavonoide quercetin in the presence of Cu^{2+}

Summary

Effect of water-soluble substances from propolis (VRP) and from plant flavonoide quercetin on chromosome and plasmid DNA were investigated by help of agarose gel electrophoresis.

It has been found out, that DNA damage occurs, involving into action VRP or quercetin, after 72 hours. In the presence of Cu^{2+} VRP as well as quercetin, more rapid in order DNA degradation appears. It has been supposed, that DNA decay is caused by free radicals.