

Antyhepatotoksyczne działanie pyłku kwiatowego

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Grzegorz Spychalski

ANTIHEPATOTOXIC ACTIVITY OF BEE POLLEN

SUMMARY

The presented studies show the high activity of bee pollen used for the regeneration of liver tissue intoxicated by carbon tetrachloride, ethionine, galactosamine and allyl alcohol – substances with a very strong damage activity for all possible structures of this organ. Moreover the activity of bee pollen is not limited only to treatment of damaged liver tissue. The extracts of bee pollen have the ability to protection of liver against intoxications.

KEY WORDS: EXTRACTS OF BEE POLLEN – LIVER TOXINS – ANTIHEPATOTOXIC

Działanie na tkankę wątrobową

W farmakologii doświadczalnej stosuje się cały szereg substancji, których podanie zwierzętom doświadczalnym wywołuje stany patologiczne przypominające symptomy chorób powstałych u człowieka pod wpływem czynników chorobowych. W przypadku wątroby do substancji, które do tego celu stosuje się najczęściej, należą: tetrachlorek węgla, etionina, galaktozamina i alkohol allilowy.

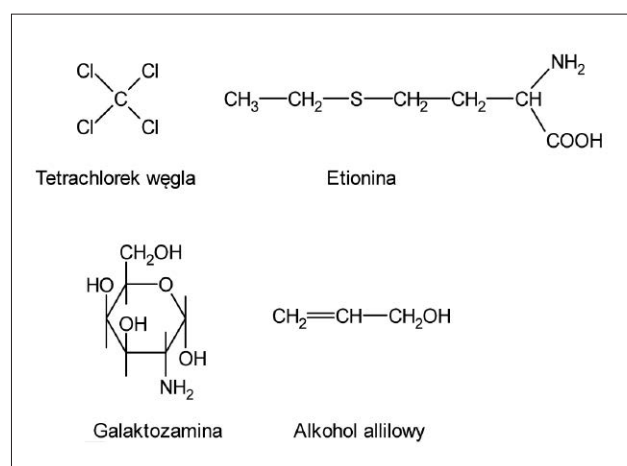
Tetrachlorek węgla

Tetrachlorek węgla (ryc. 1) zaliczany jest do najlepszych modelowych substancji hepatotoksycznych (uszkodzających wątrobę). Nawet pojedyncze dawki tego związku powodują szybkie stłuszczenie i degenerację wątroby. Już w kilka minut po podaniu tetrachlorku węgla obserwuje się uszkodzenie siateczki cytoplazmatycznej, po 56 godz. dochodzi do uszkodzenia lizosomów, a po 12-20 godz. do uszkodzenia mitochondriów. Co istotne, zmiany biochemiczne znajdują swoje odzwierciedlenie w zmianach histopatologicznych (1).

Tetrachlorek węgla metabolizowany jest w hepatocytach z udziałem cytochromu P-450. Większość szkodliwych efektów działania tego związku przypisywana jest wolnemu rodnikowi trichlorometylowemu, który powstaje w trakcie detoksykacji. Powoduje on peroksydację lipidów, oksydację grup tiolowych oraz uszkodzenie struktury białek i kwasów nukleinowych w tkance wątrobowej.

Peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórek siateczki cytoplazmatycznej prowadzi do ich rozpadu i powstania rodników lipidowych. Jest to reakcja łańcuchowa, która powoduje uszkodzenie hepatocytów. Poza tym tetrachlorek działa bezpośrednio na błony cytoplazmatyczne hepatocytów, co prowadzi do zaburzenia transportu jonów metali i białek (1).

Wójcicki i Samochowiec (3) podawali szczurom karmionym paszą standardową wyciągi Cernitin T60 i Cernitin GBX w ilości 50 mg/kg, a następnie po 4 godz. tetrachlorek węgla w ilości 0,25 ml/100 g m.c. i po dalszych 24 godz. wykonywano badania biochemiczne. Wyniki badań przedstawione w tabeli 1 wykazały, że po podaniu tetrachlorku węgla poziom aminotransferazy alaninowej w surowicy krwi szczurów wzrósł o ok. 260 razy, fosfatazy alkalicznej o 3,8 raza i bilirubiny o ok. 64 razy. Natomiast uprzednie podanie wyciągu wodnego (Cernitin T60) z pyłku kwiatowego, a następnie tetrachlorku węgla, powodowało obniżenie wymienionych wskaźników odpowiednio o 34,1, 24,7 i 41,5%. Podobne obniżenie wskaźników biochemicznych obserwowano w przypadku wyciągu lipidowego (Cernitin GBX) z pyłku kwiatowego, odpowiednio o 17,1, 18,5 i 80,3%.



Ryc. 1. Wzory chemiczne modelowych substancji hepatotoksycznych (wg 2).

W tabeli 2 zamieszczone zostały także wskaźniki fizjologiczne i histopatologiczne odnotowane w trakcie powyższych badań. Stwierdzono, że podanie tetrachlorku węgla powoduje wzrost masy wątroby o 1,8 raza, obniżenie poziomu białka o 10,4%, wzrost zawartości triglicerydów o 3,5 raza i infiltracji tłuszczów w komórkach wątrobowych o 8 razy. Z kolei podawanie wyciągu wodnego (Cernitin T60) i lipidowego (Cernitin GBX) z pyłku kwiatowego wyraźnie zmniejszało skutki toksycznego działania tetrachlorku węgla w granicach 4,4-17,5%, przy czym działanie wyciągu lipidowego było silniejsze w porównaniu do wyciągu wodnego z pyłku kwiatowego.

W innym doświadczeniu Łoniewski i wsp. (1) podawali zapobiegawczo wyciąg wodny (Cernitin T60) i lipidowy (Cernitin GBX) dootrzewnowo szczurom w dawce 200 mg/kg m.c. Następnie po 24 godz. od zwierząt pobierano surowicę krwi do badań. Wyniki zebrane w tabeli 3 wskazują, że tetrachlorek węgla powodował wzrost poziomu wymienionych enzymów wątrobowych, wskazujących na silne uszkodzenie wątroby, odpowiednio o 70,6; 53,4 i 6,9 raza. Podawanie samych wyciągów korzystnie działało na wątrobę, na co wskazują wyniki zawarte w tabeli. Wyciągi te obniżały poziom badanych enzymów wątrobowych w porównaniu do zwierząt nieleczonych w granicach 4,8-50,0%.

Tabela 1. Wpływ wyciągu wodnego (Cernitin T60) i wyciągu lipidowego (Cernitin GBX) z pyłku kwiatowego podawanego doustnie na wskaźniki biochemiczne wątroby szczurów zatrutowanych tetrachlorkiem węgla (wg 2).

Grupa zwierząt	Wskaźniki biochemiczne		
	AIAT (U/l)	AP (U/l)	B (μmol/l)
Kontrolna (nieleczona)	38	100	0,03
CCl4	9,900	380	1,93
CCl4 + Cernitin T60	6,520	286	1,13
CCl4 + Cernitin GBX	8,210	310	0,38

CCl4 – Tetrachlorek węgla, AIAT – aminotransferaza alaninowa, AP – fosfataza alkaliczna, B – bilirubina

Tabela 2. Wpływ wyciągu wodnego (Cernitin T60) i wyciągu lipidowego (Cernitin GBX) z pyłku kwiatowego podawanego doustnie na wskaźniki fizjologiczne i histopatologiczne wątroby szczurów zatrutowanych tetrachlorkiem węgla (wg 3).

Grupa zwierząt	Wskaźniki fizjologiczne i histopatologiczne			
	A	B	C	D
Kontrolna (nieleczona)	2,83	6,7	0,20	0,5
CCl4	5,01	6,0	0,69	4,0
CCl4 + Cernitin T60	4,50	6,3	0,66	3,8
CCl4 + Cernitin GBX	4,15	6,4	0,60	3,3

CCl4 – Tetrachlorek węgla
A – Masa wątroby (g/100 g m.c.), B – ogólna zawartość białka w wątrobie (g/100 g m.c.), C – zawartość triglicerydów (mmol/g homogenatu wątrobowego), D – stopień infiltracji tłuszczów w komórkach wątroby (punkty)

Tabela 3. Wpływ wyciągu wodnego (Cernitin T60) i lipidowego (Cernitin GBX) na aktywność enzymów wątrobowych po zatruciu szczurów tetrachlorkiem węgla (wg 1).

Grupa zwierząt	Aktywność enzymów wątrobowych		
	AIAT (μg/l)	AspAT (μg/l)	γ-GT (μg/l)
Kontrolna (nieleczona)	32	124	0,40
CCl4	2,258	6,620	2,75
Cernitin T60	16	118	0,25
CCl4 + Cernitin T60	1,700	5,000	2,00
Cernitin GBX	22	87	0,30
CCl4 + Cernitin GBX	56	252	0,25

CCl4 – Tetrachlorek węgla
AIAT – Aminotransferaza alaninowa, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, γ-GT – s-glutamylotransferaza

W przypadku uprzedniego podawania obu wyciągów, zatrucie zwierząt tetrachlorkiem węgla ujawniało wyraźną ochronę wątroby przed działaniem tego związku. W przypadku wyciągu wodnego (Cernitin T60) działanie ochronne było słabsze niż w przypadku wyciągu lipidowego (Cernitin GBX). Wodny wyciąg z pyłku kwiatowego obniżał aktywność aminotransferazy alaninowej o 24,7%, aminotransferazy asparaginianowej o 24,5%, a γ -glutamylotransferazy o 27,3% w porównaniu do tetrachlorku węgla. Natomiast lipidowy wyciąg z pyłku kwiatowego obniżał poziom wymienionych enzymów odpowiednio o 97,5, 96,2 i 89,1% (tab. 3).

Etionina

Etionina (ryc. 1) jest analogiem etylowym aminokwasu metioniny. Powoduje ona m.in. wytwarzanie tłuszczu w tkance wątrobowej, hamuje syntezę białka, a także obniża aktywność fosforylasy wątrobowej i stężenie AMP. Etionina zmniejsza liczbę połączeń SH. W efekcie powstają zmiany procesu oksydoredukcyjnego i zaburzona zostaje aktywność wielu enzymów (4).

W badaniach uczestniczyły 4 grupy szczurów: grupa kontrolna (nieleczona), grupa otrzymująca etioninę (25 mg/100 g m.c.), grupa otrzymująca etioninę, wyciąg wodny z pyłku kwiatowego (Cernitin T60) w dawce 200 mg/kg m.c., a także grupa zwierząt otrzymująca etioninę i wyciąg lipidowy z pyłku kwiatowego (Cernitin GBX) w dawce 200 mg/kg m.c. Zarówno etioninę, jak i wyciągi z pyłku kwiatowego podawano zwierzętom drogą doustną. Doświadczenie prowadzono przez 14 dni. Następnie zwierzęta usypiano i badano histopatologicznie ich wątroby.

Wyniki badań histopatologicznych wykazały, że po podawaniu samej etioniny komórki wątrobowe miały cechy zwyrodnienia, szczególnie w obwodowych częściach zrazików wątrobowych. Obserwowano rozwój nukleolizy i cytolizy hepatocytów, jak również wzrost liczby komórek Browicza-Kupffera oraz rozszerzenie naczyń zatokowych w całym zraziku wątrobowym. Stwierdzono obecność dużej ilości substancji tłuszczowych w postaci małych kropelek międzykomórkowych. U zwierząt otrzymujących etioninę obserwowano także uszkodzenie hepatocytów, charakteryzujące się wakouolizacją oraz liczną liczbą hepatocytów (ryc. 2A).

Dla odmiany u szczurów otrzymujących oprócz etioniny wodny wyciąg z pyłku kwiatowego (Cernitin T60) w wątrobie nie obserwowano żadnych zmian morfologicznych, za wyjątkiem sporadycznie namnażających się komórek Browicza-Kupffera (ryc. 2B).

Podobną sytuację odnotowano w przypadku zwierząt otrzymujących etioninę i wyciąg lipidowy z pyłku kwiatowego. W preparatach histopatologicznych nie stwierdzono żadnych zmian morfologicznych.

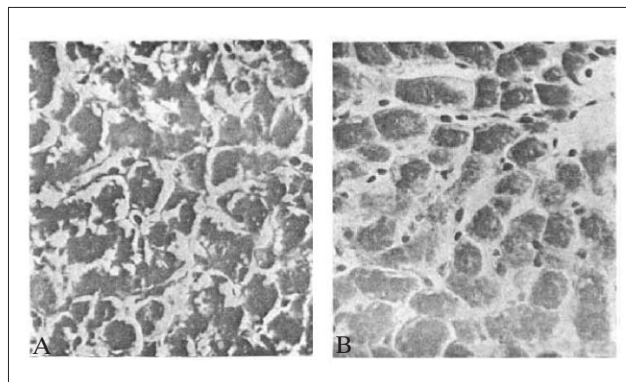
Galaktozamina

Galaktozamina (ryc. 1) powoduje stan zapalny wątroby, który w obrazie histopatologicznym przypomina stan kliniczny występujący u chorych na przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby (5).

Wójcicki i wsp. (5) w badaniach użyli szczurów, które podzielono na cztery grupy: kontrolną (nieleczoną), zatrwaną galaktozaminą w dawce 400 mg/kg m.c., otrzymujące równocześnie galaktozaminę i wodny wyciąg z pyłku kwiatowego (Cernitin T60) w dawce 50 mg/kg m.c., a także otrzymujące równocześnie galaktozaminę i lipidowy wyciąg z pyłku kwiatowego (Cernitin GBX) w dawce 50 mg/kg m.c. Galaktozaminę i wyciągi z pyłku kwiatowego podawano drogą doustną. Doświadczenie trwało 7 dni.

Wyniki badań biochemicznych zebrano w tabeli 4. Wynika z nich, że po podaniu galaktozaminy poziom aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej, fosfatazy alkalicznej i bilirubiny w surowicy krwi wzrósł odpowiednio o 47,6; 17,4; 1,4 i 7,0 razy. Po leczeniu wodnym wyciągiem z pyłku kwiatowego obniżył się w porównaniu do samej galaktozaminy odpowiednio o 17,6; 13,7; 1,7 i 6,0 razy, a w przypadku lipidowego wyciągu z pyłku kwiatowego odpowiednio o 1,6; 2,0; 1,9 i 5,5 raza. Jak widać, leczenie zatrucia wątroby szczurów galaktozaminą za pomocą wodnego wyciągu z pyłku kwiatowego było bardziej efektywne.

Z badań histopatologicznych wynika, że zatrucie szczurów galaktozaminą spowodowało rozległe zmiany morfologiczne w wątrobie, przypominające wirusowe zapalenie wątroby (ryc. 3A). Obserwowano



Ryc. 2. Obraz histopatologiczny tkanki wątrobowej szczura po zatruciu etioniną (25 mg/kg m.c.) (A) i po leczeniu wodnym wyciągiem z pyłku kwiatowego (Cernitin T60, 200 mg/kg m.c.) (B).

liczne, duże nacieczenia hepatocytów, lizę komórek mięsaszowych oraz zwyrodnienie wodniczek. Natomiast ochronne działanie wodnego wyciągu z pyłku kwiatowego było ewidentne (ryc. 3B). W tkance wątrobowej zwierząt otrzymujących galaktozaminę i wymieniony wyciąg nie stwierdzono żadnych zmian zwyrodnieniowych ani martwiczych. W przypadku wyciągu lipidowego z pyłku kwiatowego odnotowano niecałkowitą ochronę tkanki wątrobowej. Dokładne dane przedstawia tabela 5.

Alkohol allilowy

Alkohol allilowy (ryc. 1) powoduje nekrozę tkanki wątrobowej zlokalizowanej wokół żyły wrotnej, która powstaje na skutek śródbłonkowego uszkodzenia naczyń włosowatych. Dochodzi do tego w wyniku alkilacji makrocząsteczek komórkowych oraz hamowania syntezy białka. Toksyczność alkoholu allilowego jest prawdopodobnie także wynikiem reakcji jego podwójnego wiązania z grupami SH określonych enzymów wątrobowych, co powoduje ich inaktywację i prowadzi do uszkodzenia i martwicy tkanki wątrobowej (6).

Wójcicki i wsp. (6) w badaniach uwzględnili trzy grupy szczurów doświadczalnych: kontrolne (nieleczone), zatrute alkoholem allilowym (0,4 g/100 g m.c.) oraz leczone po zatruciu alkoholem allilowym przez 2 dni mieszaniną wyciągu wodnego (Cernitin T60, 50 mg/kg m.c.) i wyciągu lipidowego (Cernitin GBX, 50 mg/kg m.c.). Alkohol allilowy i mieszaninę wyciągów podawano drogą doustną.

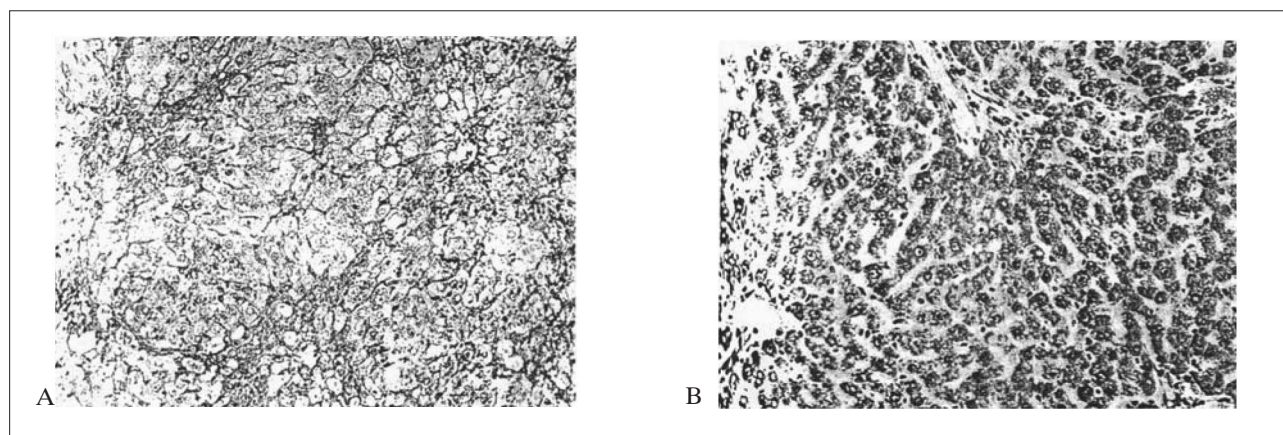
Wyniki badań umieszczone w tabeli 6 wskazują, że po podaniu alkoholu allilowego aktywność enzymów wątrobowych w surowicy krwi szczurów wzrosła w przypadku aminotransferazy alaninowej o 21,8 raza, aminotransferazy asparaginianowej o 12,9 raza i w przypadku fosfatazy alkalicznej o 2,8 raza. Leczenie mieszaniną wyciągów z pyłku kwiatowego spowodowało obniżenie aktywności tych enzymów odpowiednio o 11,4, 4,0 i 2,9 raza w porównaniu do stanu zatrucia.

Z badań histopatologicznych wynika, że po zatruciu alkoholem allilowym w hepatocytach pojawiło się wiele kropelek tłuszczu lub były one całkowicie wypełnione tłuszczem (ryc. 4A). Pojedyncze zwyrodniałe hepatocyty także były widoczne. W przeci-

Tabela 4. Wpływ wyciągu wodnego (Cernitin T60) i lipidowego (Cernitin GBX) na aktywność enzymów wątrobowych i bilirubiny po zatruciu szczurów galaktozaminą (wg 5).

Grupa zwierząt	Wskaźniki biochemiczne			
	AIAT (U/l)	AspAT (U/l)	AP (U/l)	B (μ mol/l)
Kontrola (nieleczona)	53	102	247	3,5
Galaktozamina	2,523	1,772	338	24,6
Galaktozamina + Cernitin T60	143	129	201	4,1
Galaktozamina + Cernitin GBX	1,563	890	181	4,4

AIAT – Aminotransferaza alaninowa, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, AP – fosfataza alkaliczna, B – bilirubina



Ryc. 3. Obraz histopatologiczny tkanki wątrobowej szczura po zatruciu galaktozaminą (400 mg/kg m.c.) (A) i po leczeniu wodnym wyciągiem z pyłku kwiatowego (Cernitin T60, 50 mg/kg m.c.) (B).

wieństwie do tego, w wątrobie szczurów poddanych leczeniu mieszaniną wyciągów z pyłku kwiatowego nie zaobserwowano żadnych symptomów martwicy lub zwyrodniałych tłuszczowo hepatocytów (ryc. 4B). W niektórych przypadkach widoczne były odnowione komórki Browicza-Kupffera.

Tabela 5. Uszkodzenia wątroby szczura po podaniu galaktozaminy oraz wyciągu wodnego (Cernitin T60) i lipidowego (Cernitin GBX) w postaci wartości punktowych (wg 5).

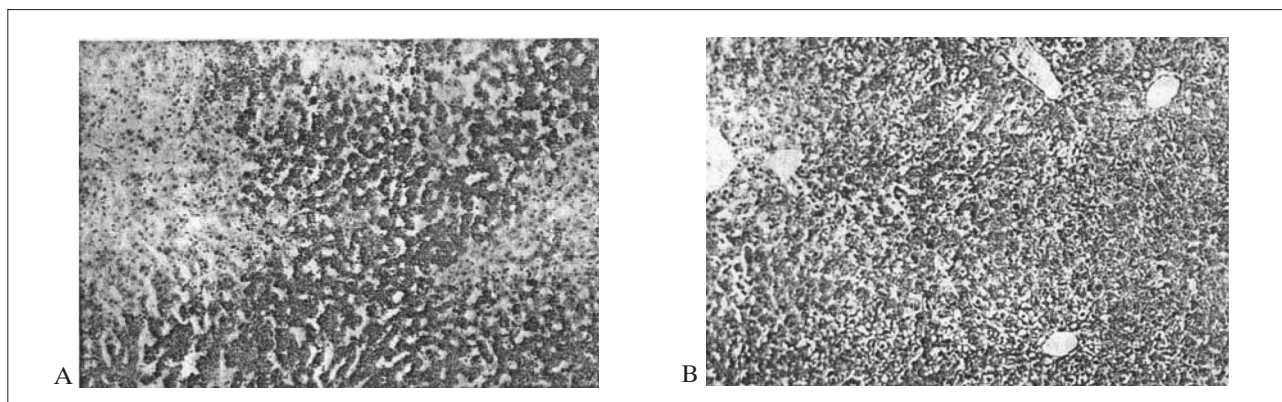
Uszkodzenia wątroby	Grupy zwierząt			
	A	B	C	D
Nacieczenia komórkowe	0	3	0	2
Nacieczenia okolicy żyły wrotnej	0	3	0	2
Nacieczenia skrajnych fragmentów zrazika wątrobowego	0	3	0	0
Przekrwienie	0	3	1	2
Rozszerzenie naczyń zatokowych	0	3	1	2
Wzrost liczby komórek Browicza-Kupffera	0	2	1	2
Martwica ogniskowa	0	1	0	0
Martwica obwodowa	0	3	0	1
Martwica pośrednia	0	2	0	1
Zwyrodnieniowe kropelki tłuszczu o niewielkich rozmiarach	0	3	1	3
Nacieczenie zwyrodnieniowe obwodowych części zrazika wątrobowego	0	3	0	2
Zwłóknienie	0	2	0	0
Łącznie	0	31	4	17

A – kontrola (nieleczona), B – galaktozamina (400 mg/kg m.c.), C – wyciąg wodny z pyłku kwiatowego (50 mg/kg m.c.), D – wyciąg lipidowy z pyłku kwiatowego (50 mg/kg m.c.)

Tabela 6. Wpływ mieszaniny wyciągu wodnego (Cernitin T60) w ilości 50 mg/kg m.c. i lipidowego (Cernitin GBX) w ilości 50 mg/kg m.c. na aktywność enzymów wątrobowych po zatruciu szczurów alkoholem allilowym (wg 6).

Grupa zwierząt	Enzymy wątrobowe		
	AIAT	AspAT	AP
Kontrola (nieleczona)	35	62	149
Alkohol allilowy	763	799	418
Alkohol allilowy + mieszanina wyciągu wodnego i lipidowego z pyłku kwiatowego	67	202	144

AIAT – Aminotransferaza alaninowa, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, AP – fosfataza alkaliczna



Ryc. 4. Obraz histopatologiczny tkanki wątrobowej szczura po zatruciu alkoholem allilowym (0,4 g/100 g m.c.) (A) oraz po leczeniu mieszaniną wodnego wyciągu (Cernitin T60, 50 mg/kg m.c.) i lipidowego (Cernitin GBX, 50 mg/kg m.c.) z pyłku kwiatowego (wg 6).

Podsumowanie badań

Z przedstawionych powyżej badań wynika, że wyciągi z pyłku kwiatowego odznaczają się wysokim stopniem odnowy tkanki wątrobowej, zatrwanej substancjami o bardzo silnym działaniu uszkodzającym wszelkie możliwe struktury tego narządu. Co więcej, działanie to nie ograniczało się wyłącznie do leczenia uszkodzonej tkanki wątrobowej. Wyciągi z pyłku kwiatowego miały także zdolność ochraniać wątrobę przed szkodliwym działaniem trucizn wątrobowych, to znaczy wykazywały bardzo skuteczne działanie zapobiegające zatruciom.

Piśmiennictwo

1. Loniewski I, Pawlik A, Musiał HD. Der Einfluss von Pollenextrakten auf die von Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) experimentell hervorgerufenen Veränderungen in der Rattenleber. *Arzneimittelforschung* 2001; 42:594-601.
2. Budavari S. (red.): *The Merck index*. Eleventh. Ed. Merck and Co, Inc, Rahway (USA), 1989.
3. Wójcicki J, Samochowiec L. Effect of Cernitins on the hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. *Herba Pol* 1984; 30:207-12.
4. Wójcicki J, Hinek A, Samochowiec L. Inhibition of ethionine-induced rat liver injury by Cernitins. *Herba Pol* 1984; 30:213-6.
5. Wójcicki J, Samochowiec L, Hinek A. The effect of Cernitins on galactosamine-induced hepatic injury in rat. *Arch Immunol Ther Exper* 1985; 33:361-70.
6. Wójcicki J, Hinek A, Samochowiec L. The protective effect of pollen extracts against allyl alcohol damage of the liver. *Arch Immunol Ther Exper* 1985; 33:841-9.

otrzymano/received: 10.07.2011
zaakceptowano/accepted: 01.08.2011

Adres/address:

*prof. dr hab. Bogdan Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
Zakład Farmakologii i Biologii Doświadczalnej
ul. Libelta 27, 61-707 Poznań
tel.: (61) 665-95-50, fax: 665-95-51
e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl