

Przeciwnikacyjne właściwości ekstraktów roślinnych bogatych w polifenole**

Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Cezary Watała

ANTYGLYCATIVE PROPERTIES OF POLYPHENOL EXTRACTS OF PLANT ORIGIN

SUMMARY

It is believed that the hyperglycemia is the major reason of the development of late diabetic complications, such as retinopathy, neuropathy and nephropathy, macrovascular disease, Alzheimer's disease, cataract. One of the hypotheses, explaining the correlation between high glucose levels in blood and the development of long-term complications is protein dysfunction, resulting from protein glycation. Protein glycation is initiated by the reaction of nucleophilic addition between a free amino group from protein and carbonyl group from reducing sugar (and their derivatives). It results in formation of Schiff Base, which rearranges to a more stable product – Amadori product, converted to advanced glycation end-products (AGEs). It has been documented that AGEs accumulated in tissues, impaired the protein's structure and function. So far, there is no effective treatment against AGEs forming, which has passed clinical trials. There are many researches testing antyglycative properties of polyphenol plant's extracts. Polyphenols are aromatic polyhydroxy compounds of the group of phenols, naturally occurring in plants. They are antioxidants, dyes, insecticides and fungicides, protection from ultraviolet radiation. Among these, phenolic compounds have received considerable attention for their biological effects, antiplatelet, cardioprotective, anti-inflammatory, antioxidant, antiproliferative, diuretics. Antyglycative properties of plant extracts and commercially available polyphenols were analyzed both as well. This article focus on protein glycation, related consequences and the role of a diet rich in fruits and vegetables preventing and reducing the adverse effects of hyperglycemia.

KEY WORDS: POLYPHENOLS – NONENZYMATIC GLYCATION – ADVANCES GLYCATION END PRODUCTS

Wstęp

Uważa się, iż hiperglikemia, charakterystyczna dla przebiegu cukrzycy, jest główną przyczyną stanów patomorfologicznych związanych z tą chorobą. Wśród późnych powikłań cukrzycy, będących następstwem mikro- i makroangiopatii, możemy wymienić retinopatię,

neuropatię, nefropatię, kataraktę, miażdżycę i chorobę Alzheimera (1). Wśród wielu hipotez, próbujących wyjaśnić związek między wysokim stężeniem glukozy we krwi a rozwojem późnocukrzycowych powikłań, zwraca się uwagę na znaczenie dysfunkcji białek, spowodowanej ich potranslacyjnymi nieenzymatycznymi modyfikacjami, wśród których dominującą rolę przypisuje się nieenzymatycznej glikozylacji, tzw. glikacji białek. Glikacja i towarzysząca jej glikooksydacja, przyczyniają się do powstania tzw. końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE). Prowadzone są liczne badania nad mechanizmem powstawania AGE oraz znalezieniem skutecznej terapii w zapobieganiu jej powstawania w organizmie. Coraz częściej mówi się o przeciwnikacyjnych właściwościach polifenolowych ekstraktów roślinnych, które uważa się za potencjalny terapeutyk chroniący przed niekorzystnym wpływem glukozy na tkanki i narządy organizmu ludzkiego.

Końcowe produkty późnej glikacji białek

Nieenzymatyczna N-glikozylacja białek, zwana potocznie glikacją, jest zjawiskiem zachodzącym w każdym żywym organizmie. W jej wyniku dochodzi do wytworzenia wiązania między grupą karbonylową cukrowca (glukozy, galaktozy, fruktozy) lub jego pochodnych (glioksal, metyloglioksal, 3-deoksyglukoson, sorbitol, aldehyd glicerynowy), a pierwszorzędową aminową grupą białka (1-3). Proces ten nasilony jest głównie w stanach hiperglikemii, charakterystycznej dla przebiegu cukrzycy. W wyniku szeregu przemian glukozy (np. autooksydacji, reakcji szlaku polioliowego) powstają inne niż glukoza cukry i ich pochodne (sorbitol, fruktoza, galaktoza i α -oksyaldehydy: glioksal, metyloglioksal, aldehyd glicerynowy), charakteryzujące się obecnością silnie reaktywnej grupy karbonylowej. Wykazują one silne powinowactwo do N-terminalnych grup aminowych lizyny i argininy.

**Niniejsza praca była finansowana w ramach projektu „Flawopiryna” UDA-POIG.01.03.01-10-129/08-04 oraz projektu NCN N N405 611238.

W wyniku ataku nukleofilowego karbonyli na grupy aminowe białek powstają labilne zasady Schiffa, które poprzez liczne przegrupowania (reakcje Amadoriego) przekształcają się w produkty Amadoriego. Z wpływem tygodni związki te podlegają reakcjom oksydacji, dehydratacji, fragmentacji i kondensacji z innymi grupami aminowymi w biomakrocząsteczkach (reakcje Maillarda), których efektem jest powstanie tzw. końcowych produktów zaawansowanej glikacji (*advanced glycation end-products*, AGEs). Do tej pory zidentyfikowano około piętnaście produktów zaawansowanej glikacji białek, wśród nich pentozydinę, karboksymetylolizynę, pyrrolinę, argipirymidynę, pochodne imidazolowe (1). Udowodniono, iż nagromadzone w tkankach struktury AGE upośledzają funkcję białek ustrojowych organizmu, zmieniają strukturę macierzy pozakomórkowej i właściwości enzymów, zwiększają stres oksydacyjny i karbonylowy, a wszystko to prowadzi do licznych niekorzystnych zmian funkcjonalnych tkanek i narządów (1, 3-5).

AGE w cukrzycy

Białkami najbardziej narażonymi na zaawansowaną glikację w stanach hiperglikemii są białka długo żyjące, tj. kolagen, krystalina, białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Również albumina, enzymy, np. cyklooksygenaza, insulina, dehydrataza kwasu d-aminolewulinowego (ALA-D), hemoglobina, narażone są na modyfikacje, lecz z uwagi na krótki czas obrotu metabolicznego tych białek, modyfikacje te prowadzą do powstania wczesnych produktów glikacji, niezostawiających trwałych zmian w organizmie. Skutkiem długotrwałych przemian jest powstawanie usieciowań w białku, powstawanie nowych wiązań, odszczepianie grup hydroksylowych i karbonylowych, jak również addycja nowych grup funkcyjnych. Związane jest to ze zmianami strukturalnymi białek, zmniejszaniem ich rozpuszczalności, powstawaniem usieciowań (cross-linków), utratą właściwości funkcjonalnych enzymów. Produkty autooksydacji glukozy i obecność związków z reaktywnymi grupami karbonyłowymi, przyczyniają się do wzrostu stresu oksydacyjnego i karbonylowego w komórkach. Uważa się, że AGE przyczyniają się również do zainicjowania reakcji zapalnej w organizmie. Znajdujące się na komórkach receptory dla AGEs – RAGE – po połączeniu z ligandami na komórkach śródbłonna i leukocytach, aktywują je do wytwarzania cytokin zapalnych i białka CRP.

Wymienione zjawiska skutkują niszczeniem tkanek i narządów, dysfunkcją białek strukturalnych i enzymów. W przypadku modyfikacji kolagenu w ścianach naczyń krwionośnych, dochodzi do ich sztywnienia, wzrostu ciśnienia krwi i w następstwie – rozwoju cho-

rób sercowo-naczyniowych (1, 6), które są przyczyną śmierci u ponad połowy chorych na cukrzycę (wg raportów WHO). Niszczenie naczyń krwionośnych o charakterze mikroangiopatii ma swój udział w rozwoju retinopatii. Trwała ekspozycja krystaliny – białka obecnego w soczewce oka – na związki z reaktywną grupą karbonylową, skutkuje rozwojem katarakty (2). Innym stanem patofizjologicznym, będącym następstwem hiperglikemii, jest polineuropatia cukrzycowa lub choroba Alzheimerera. Gromadzona w komórkach układu nerwowego glukoza i produkty jej przemian zwiększają stres oksydacyjny i karbonylowy, powodują wzrost stężenia sorbitolu i fruktozy w komórkach Schwanna i w aksonach pnia mózgu, zmniejszają ilość mioinozytolu (7). Zaburzona gospodarka sodowo-potasowa w neuronach powoduje obrzęk neuronów i mieliny, przyczyniając się do ich niszczenia. Neuropatie związane są również z zamykaniem światła włóknicek wewnątrznerwowych, co skutkuje niedotlenieniem i złym odżywieniem komórek. Podobny mechanizm uszkodzenia komórek obserwowany jest w nerkach i prowadzi do stwardnienia kłębuszków nerkowych, włóknienia miąższu nerek, a także rozwoju niewydolności nerek. Wśród innych stanów chorobowych należy wymienić stopę cukrzycową, sztywność stawów i zwiększenie łamliwości kości (uszkodzenie białek osteocytów i chondrocytów).

Terapia przeciwglikacyjna

Oprócz skutecznej terapii regulującej poziom glukozy we krwi, naukowcy próbują znaleźć substancje interferujące w powstawanie i gromadzenie struktur AGE w tkankach ustroju, jak również w niszczenie powstałych już produktów późnej glikacji białek.

Rozpatruje się trzy aspekty terapeutyczne (8, 9):

- stosowanie związków oligo/poliaminowych konkurujących z grupami aminowymi białek o przyłączanie reaktywnych grup karbonylowych,
- substancje niszczące produkty usieciowania białek (tzw. AGEs-breakers),
- stosowanie związków obniżających stres oksydacyjny i karbonylowy, np. zmiataczy wolnych rodników.

Do pierwszej grupy terapeutyków zaliczamy pochodne hydrazyny, np. aminoguanidynę. Związek ten nie przeszedł prób klinicznych, nie jest stosowany w praktyce lekarskiej, jednakże trwają badania kliniczne nad jego pochodnymi, np. ALT- 946, wykazującymi przeciwglikacyjne właściwości w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach. Uważa się, iż związki te konkurencyjnie wiążą się z grupami karbonyłowymi cukrów redukujących, chroniąc reszty lizynowe i argininowe białek ustrojowych przed ich modyfikacją. Podobne

działanie wykazują leki obniżające poziom glukozy we krwi, tj. metformina i pioglitazon. Wykazano, że bromek fenalcytiadolu i jego pochodna ALT-711, podawane szczurom z cukrzycą indukowaną streptozotocyną, istotnie statystycznie zmniejszały sztywność ścian aorty brzusznej i ścięgien obecnych w ogonach, co może świadczyć o niszczeniu niepożądanych usięciowań w zmodyfikowanych białkach. Badania te prowadzone są na razie na modelach zwierzęcych (8-10).

Ogromne nadzieje pokładane są w substancjach o właściwościach przeciwutleniających. W literaturze pojawia się coraz więcej prac dotyczących przeciwnoglikacyjnych właściwości ekstraktów roślinnych bogatych w polifenole.

Polifenole

Polifenole są to aromatyczne, wielohydroksylowe związki z grupy fenoli, naturalnie występujące w roślinach. Pełnią one wielorakie funkcje w organizmach roślin: przeciwutleniaczy, barwników, insektycydów i fungicydów, chronią przed promieniowaniem ultrafioletowym. Ze względu na budowę szkieletu węglowego polifenole podzielono na kilka grup (tab. 1). Związki te wykazują szereg interesujących właściwości biologicznych. Wśród nich należy wymienić działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, kardioochronne, w tym przeciwpłytkowe, moczopędne, czy antyproli-

feracyjne, w tym przeciwnowotworowe. Przykładem kardioochronnego działania polifenoli jest zjawisko tzw. francuskiego paradoksu (11, 12). We Francji zaobserwowano mniejszy wskaźnik występowania incydentów sercowo-naczyniowych, w tym miażdżycy, zawałów serca i udarów mózgu w stosunku do mieszkańców innych krajów Europy Zachodniej (11, 12), pomimo dużego spożycia tłuszczów zwierzęcych, nadużywania tytoniu, czy braku aktywności fizycznej. Zjawisko to tłumaczy się regularnym spożywaniem czerwonego wina, bogatego w związki polifenolowe, w tym w resweratrol (11, 12). Koncepcja paradoksu francuskiego akcentuje fakt, iż dieta bogata w składniki roślinne o wysokiej aktywności przeciwutleniającej może być skuteczną metodą w profilaktyce chorób cywilizacyjnych, w tym powikłań cukrzycowych.

Czerwone wino nie jest jedynym tzw. zdrowym napojem, zaś aktywność przeciwutleniająca jedynym korzystnym działaniem związków polifenolowych. Naukowcy z Madrasu analizowali wpływ ekstraktu z zielonej herbaty na powstawanie AGEs w kolagenie izolowanym z ścięgien ogonów i ścian aorty szczurow z cukrzycą doświadczalną indukowaną streptozotocyną (13, 14). Zaobserwowali oni prawie dwukrotny spadek poziomu glukozy we krwi w porównaniu z grupą kontrolną (szczury z hiperglikemią nie karmione ekstraktem). Fluorescencja struktur AGE obecnych

Tabela 1. Klasyfikacja polifenoli.

Szkielet węglowy	Grupa	Przykłady	Źródło
C_6-C_1 C_6-C_2	pochodne kwasu benzoowego i hydroksybenzoowego	kwas galusowy	żurawina, grzyby, kora czereśni, malina, anyż
C_6-C_3	kumaryny, pochodne kwasu hydroksycynamonowego	kumaryna, kwas kawowy, ferulowy	kawa, fasola, jabłka, rzodkiewka, pomidor
C_6-C_4	naftochinony	juglon, droseron	orzech włoski, rosiczka
$C_6-C_1-C_6$	ksantony	gartanina, garcinon	żmijowiec, roślina noni, mangostan
$C_6-C_2-C_6$	stylbeny, antrachinony	resweratrol	winogrono
$C_6-C_3-C_6$	flawonoidy: – flawony – flawonole	luteolina, apigenina kwercetyna, kemferol	rumianek, seler, dalia pomidory, brokuły, cebula, porzeczka
	– flawanony	hesperydyna, naryngenina	pomarańcze, grejpfruty
	– chalkony – antocyjany	ksantohumanol delfinidyna, petunidyna	chmiel, astrowate ślaz, ogórecznik
	– izoflawony	daidzeina, genisteina	soja
$(C_6-C_3)_n$	ligniny, lignany, neolignany	enterodiol	rośliny strączkowe
$(C_6-C_3-C_6)_n$	taniny skondensowane	protoantocyjanidyny	winogrono, orzeszki ziemne, owoce morwy, morele

w homogenatach tkankowych ogonów szczurów z cukrzycą była dwukrotnie wyższa w stosunku do wartości rejestrowanych u szczurów zdrowych i półtora raza wyższa w stosunku do szczurów cukrzycowych karmionych ekstraktem z zielonej herbaty. Przeciwiglikacyjne właściwości zielonej herbaty upatruje się w obecnych w tej roślinie polifenolach, np. kofeinie, epigalokatechinie, epikatechinie, galusanie epigalokatechiny i epikatechiny.

Ju-Wen Wu i Chiu-Lan (15) wykazali przeciwiglikacyjny wpływ ekstraktu polifenolowego pozyskanego z grusli właściwej (*Psidium* L.) (guajawy). W doświadczeniach *in vitro* ekstrakt z liści grusli istotnie zmniejszał zawartość α -dikarboonyli (o ponad 95%), jak również obecność AGE oznaczanych metodą fluorescencyjną (średnio o 70%). Doświadczenia, w których analizowano właściwości komercyjnie dostępnych polifenoli zawartych w badanym ekstrakcie, potwierdziły ich przeciwiglikacyjne właściwości. Wśród wielu związków obecnych w ekstrakcie z grusli obecne były polifenole: kwasy galusowy, ferulowy, chlorogenowy, kawowy oraz flawonoidy – rutyna, kwercetyna, kemferol. Szeroki zakres ich właściwości biologicznych, w tym przeciwiglikacyjnych, sprawiły, iż napój z grusli coraz częściej stosowany jest jako suplement diety o właściwościach prozdrowotnych.

Ponadto Noowaboot i wsp. (16), którzy badali w warunkach *in vivo* przeciwiglikacyjne właściwości ekstraktu z morwy białej, zaobserwowali spadek poziomu glukozy we krwi u szczurów cukrzycowych karmionych ekstraktem w stosunku do kontroli (szczury cukrzycowe nie karmione ekstraktem). Stopień redukcji stężenia glukozy był porównywalny do spadku glukozy we krwi po podaniu insuliny w dawce 4 U/kg. Również stężenie glikowanej hemoglobiny we krwi było o ok. 7% niższe w stosunku do szczurów cukrzycowych, którym nie podawano ekstraktu z morwy białej. Ta sama grupa naukowców analizowała również wpływ tego samego ekstraktu w warunkach *in vitro*. Analiza fluorescencji AGE w próbkach albuminy wołowej inkubowanych z glukozą i ekstraktem z morwy wskazała, iż stężenie AGE było blisko o połowę niższe niż w kontroli, co świadczy o zahamowaniu glikacji i powstawania AGE. Analiza zawartości polifenoli w liściach i owocach morwy białej wykazała obecność 3-(6-malonyloglikozydu) kwercetyny, 3-(6-malonyloglikozydu) kemferolu, rutyny, izokwercytryny, astragaliny, tanin, kumaryn – skopoliny oraz skiminy, fenolokwasów – kwasu chlorogenowego i kawowego, jak również terpenów.

Piśmiennictwo podaje, iż zawarty w melisie lekarskiej kwas rozmarynowy silnie hamuje proces powstawania AGE (17). W badaniach *in vitro* ekstrakt

z melisy istotnie obniżał intensywność fluorescencji białka zawartego w poinkubacyjnym roztworze BSA i glukozy. Technika dichroizmu kołowego potwierdziła również ochronny wpływ ekstraktu z melisy na strukturę drugorzędową albuminy.

Doceniony już za czasów prekolumbijskich ostrokrzew paragwajski, staje się coraz bardziej popularny w krajach wysokorozwiniętych, jako suplement diety o właściwościach prozdrowotnych. Uważa się, iż zawiera on więcej polifenoli niż czerwone wino, czy zielona herbata, a oprócz właściwości przeciwzapalnych i przeciwutleniających, wykazuje właściwości przeciwiglikacyjne (18, 19). Ostrokrzew paragwajski swoje biologiczne właściwości zawdzięcza witaminom A, B, C, E, taninom, kwasom: chlorogenowemu, kawowemu, oleinowemu, meta-saponinom i katechinom. Doświadczenia *in vitro* wykazały istotny spadek zawartości struktur AGE w roztworach albuminy wołowej inkubowanej z metyloglioksalem i ekstraktem z ostrokrzewu paragwajskiego (18, 19). Warto również wspomnieć o przeciwiglikacyjnych właściwościach kawy, jarzębiny, tymianku, czarnej porzeczki, jabłek i wielu innych owoców i warzyw (20, 21).

Podsumowanie

Dotychczas zidentyfikowano ponad 8 tysięcy związków polifenolowych. Ich dzienne zalecane spożycie szacuje się na poziomie 0,5-1 g (11, 22). Zmagania w zapobieganiu i leczeniu poważnych i nieodwracalnych powikłań patofizjologicznych, będących następstwem długo utrzymującej się hiperglikemii w organizmie ludzkim, są nadal wyzwaniem dla lekarzy i naukowców. W laboratoriach syntetyzowane są nowe terapie zapobiegające powstawaniu, jak również przyczyniające się do degradacji późnych produktów glikacji białek. Niniejsza praca, w której przedstawiono najbardziej spektakularne wyniki badań poświęconych przeciwiglikacyjnym właściwościom wybranych ekstraktów roślinnych bogatych w polifenole, ma na celu podkreślenie roli diety bogatej w owoce i warzywa, nie tylko w leczeniu, ale i zapobieganiu konsekwencjom hiperglikemii.

Piśmiennictwo

1. Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 67:3-21.
2. Nagaraj RH, Linetsky M, Stitt W. The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye. *Amino Acids* 2012; 42:1205-20.
3. Pietkiewicz J, Seweryn J, Bartys A i wsp. Receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji – znaczenie fizjologiczne i kliniczne. *Postepy Hig Med Dośw* 2008; 62:511-23.
4. Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy* 2000; 101:541-51.
5. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 2004; 95:233-8.
6. Jakus V,

- Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 2004; 53:131-42.
7. Chudzik B, Kaczorowska B, Przybyła M i wsp. Neuropatia cukrzycowa. *Pol Merkur Lek* 2007; 12:66-9.
8. Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol* 2006; 54:405-19.
9. Zuwala-Jagiello J. Therapeutic intervention in diseases with advanced glycation end products in their pathogenesis. *Pol Merkur Lek* 2009; 27:152-6.
10. Rahbar S., Figarola JL. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 63-79.
11. Vidavalur R, Otani H, Singal PK i wsp. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp Clin Cardiol* 2006; 11:217-25.
12. Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005; 135:2291-4.
13. Babu PV, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of collagen in the aorta of streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33:351-7.
14. Babu PV, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of tail tendon collagen in streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:280-85.
15. Ju-Wen W, Chiu-Lan H. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chem* 2009; 113:78-84.
16. Noowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V i wsp. Antihyperglycemic, antioxidant and antglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2009; 16:116-21.
17. Miroliaei M, Hhazaei S, Moshkelgosha S i wsp. Inhibitory effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract on the formation of advanced glycation end products. *Food Chem* 2011; 129:267-71.
18. Gugliucci A, Bastos DH, Schulze J i wsp. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 2009; 80:339-44.
19. Lunceford N, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 2005; 76:419-27.
20. Morimitsu Y, Yoshida K, Esaki i wsp. Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris*). *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59:2018-21.
21. Duge de BT, Guyot S, Paulin JP i wsp. Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochem* 2010; 71:443-52.
22. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann Rev Nutr* 2002; 22:19-34.

otrzymano/received: 15.01.2013
zaakceptowano/accepted: 28.02.2013

Adres/address:
*mgr biol. Agnieszka Klepacka
Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Żeromskiego 113, 90-549 Łódź
tel.: +48 (42) 639-34-71, fax: +48 (42) 678-75-67
e-mail: klepacka.agnieszka@gmail.com