

*Bogdan Kędzia, Elżbieta Hołderna-Kędzia

Pinocembryna – flawonoidowy składnik krajowego propolisu o działaniu opóźniającym rozwój choroby Alzheimera

Pinocembrin – flavonoid component of domestic propolis with delaying effect of the development of Alzheimer's disease

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu
Dyrektor Naukowy Instytutu: prof. dr n. techn. Ryszard Kozłowski

SUMMARY

The most commonly used drugs for delaying the development of Alzheimer's disease include acetylcholine esterase inhibitors and glutamic acid antagonists. These drugs, despite their beneficial therapeutic properties, are burdened to a large extent with undesirable effects, limiting their longer-term use or provoking patients to give up therapy. Hence the search for other formulations effective in treating Alzheimer's disease, with no side effects not showing side effects.

Based on the studies presented, it is possible to assume, that pinocembrin has been shown to inhibit the accumulation of amyloid β in brain tissue, blood-brain barrier permeability reduction activity, retarded apoptosis, antioxidant activity, as well as a clearly marked improvement of spatial orientation and cognitive functions.

In this context, pinocembrin offers potential opportunities for its use in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Due to the fact that domestic Polish propolis is a rich source of pinocembrine, it can be a convenient source for the use of this substance for therapeutic purposes.

Keywords: pinocembrin, domestic propolis, Alzheimer's diseases

STRESZCZENIE

Do leków najczęściej stosowanych w opóźnianiu rozwoju choroby Alzheimera należą inhibitory esterazy acetylocholinowej, a także antagoniści kwasu glutaminowego. Leki te, mimo korzystnych właściwości terapeutycznych, obciążone są jednak w dużym stopniu działaniami niepożądanymi, co ogranicza ich dłuższe stosowanie lub wręcz zmusza chorych do rezygnacji z terapii. Stąd poszukiwania innych preparatów skutecznych w leczeniu choroby Alzheimera, niewykazujących efektów ubocznych.

Na podstawie przedstawionych badań można stwierdzić, że pinocembryna odznacza się działaniem ograniczającym gromadzenie się w tkance mózgowej amyloidu β , działaniem zmniejszającym przepuszczalność bariery krew-mózg, opóźnianiem apoptozy neuronów, działaniem przeciwutleniającym, a także wyraźnie zaznaczonym działaniem poprawiającym orientację przestrzenną i funkcje poznawcze.

W tym kontekście omawiana substancja stwarza potencjalne możliwości zastosowania jej w zapobieganiu i leczeniu choroby Alzheimera. Ze względu na to, że krajowy propolis jest bogatym źródłem pinocembryny, może on stanowić dogodną formę dla wykorzystania tej substancji do celów leczniczych.

Słowa kluczowe: pinocembryna, propolis krajowy, choroba Alzheimera

Wstęp

Choroba Alzheimera jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną, charakteryzującą się występowaniem płytek starczych, splotów neurofibrilarnych oraz ubytkiem neuronów w strukturach mózgu. Płytki starcze stanowią złożony kompleks białkowy amyloidu β (A_{β}), a szczególnie peptydu tego amyloidu o sekwencji β_{40-43} , natomiast sploty neurofibrilarne

zlokalizowane są wewnątrz neuronów i stanowią kompleks hiperfosforylowanego białka tau. Zmiany chorobowe występują głównie w rejonie kory mózgowej i hipokampa i upośledzają procesy poznawcze, takie jak: pamięć, zdolność abstrakcyjnego myślenia, orientacja przestrzenna, a także funkcjonalne, a mianowicie mowę i umiejętności ruchowe. Prowadzą one stopniowo do otępienia, zubożenia na czynniki

zewnątrzne, zniерuchomienia i zaburzeń funkcji fizjologicznych (1, 2).

Do leków najczęściej stosowanych w opóźnieniu rozwoju choroby Alzheimera należą inhibitory esterazy acetylocholinowej (donepezil, rywastygmina, galantamina), a także antagoniści kwasu glutaminowego (memantyna). Leki te, mimo korzystnych właściwości terapeutycznych, obciążone są jednak w dużym stopniu działaniami niepożądanymi, co ogranicza ich dłuższe stosowanie lub wręcz zmusza chorych do rezygnacji z terapii (2).

Stąd poszukiwania innych preparatów skutecznych w leczeniu choroby Alzheimera, niewykazujących efektów ubocznych. W tym celu prowadzone są próby stosowania izolowanych substancji roślinnych (kwas γ -liponowy, hupercyna A, kwas rozmarynowy), ekstraktów roślinnych (*Bacopa monnieri*, *Withania somnifera*, *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*), izolowanych substancji zwierzęcych (acetylo-L-karnityna, fosfatydyloseryna, kwas dokozaheksaenowy), produktów spożywczych (olej kokosowy), witamin (witaminy z grupy B, witaminy D i E) oraz produktów pszczełich (mleczko pszczele, pyłek kwiatowy, propolis) (3-8).

Bardzo obiecujące są badania neurobiologiczne nad flawonoidowym składnikiem propolisu, a mianowicie nad pinocembryną (9, 10), dlatego wydawało się celowe bliższe omówienie tego związku, jako możliwego do wykorzystania w praktyce w leczeniu choroby Alzheimera.

Pinocembryna jako składnik propolisu

Propolis pozyskiwany przez pszczelarzy jest mieszaniną żywiczno-balsamicznych substancji, z domieszką innych produktów pszczełich (wosk, obnóże pszczele, pierzga) oraz zanieczyszczeń mechanicznych. Przyjmuje się, że surowy propolis zawiera ok. 60% substancji biologicznie aktywnych i ok. 40% substancji balastowych. W celu ich usunięcia, surowy propolis poddaje się zazwyczaj ekstrakcji za pomocą 70% etanolu (w stosunku 1:10). Po odparowaniu alkoholu uzyskuje się półpłynną pozostałość o zawartości ok. 67% suchej masy. Uzyskany w ten sposób zagęszczony etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP) służy do sporządzania stałych form preparatów leczniczych (11).

W skład EEP, otrzymanego z surowego propolisu krajowego, zbieranego przez pszczoły głównie z pązków liściowych topoli czarnej, w największej ilości wchodzi związek flawonoidowy (ok. 45%). Dużą grupę związków stanowią także kwasy fenolowe (ok. 30%) i ich estry (ok. 10%) (12).

Badania Kalety (13) wykazały, że w 10% ekstraktach etanolowych z propolisu, pochodzącego z różnych rejonów kraju (badania obejmowały 15 próbek

propolisu), zawartość związków flawonoidowych wahała się w zakresie od 6,2 do 18,8%. Wśród flawonoidów w największej ilości znajdowała się pinocembryna (śr. 4,7%). W mniejszych ilościach wykrywano pinobanksynę (śr. 3,1%), galanginę (śr. 2,2%) i chryzynę (śr. 2,1%).

Na tej podstawie można przyjąć, że propolis krajowy jest bogatym źródłem pinocembryny – związku należącego do grupy flawanonów (ryc. 1).

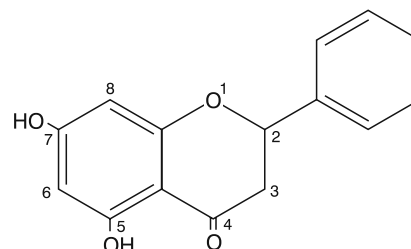
Jeśli założyć, że wydajność ekstrakcyjna propolisu wynosi średnio 22% (14), to w zagęszczonym ekstrakcie etanolowym z propolisu (EEP) znajduje się od 8,4 do 31,0% pinocembryny (13).

Jest to stwierdzenie bardzo istotne, ponieważ propolis pochodzący z innych krajów świata może zawierać tylko śladowe ilości pinocembryny (propolis brazylijski) lub może wcale nie zawierać tego flawonoidu (propolis pochodzący z Wysp Kanaryjskich) (12).

Charakterystyka neurobiologiczna choroby Alzheimera

Istnieją co najmniej dwie teorie próbujące wyjaśnić powstawanie choroby Alzheimera. Jedną z nich zakłada gromadzenie się w tkance mózgowej amyloidu β (A_{β}), co daje początek całej kaskadzie zmian prowadzących do rozwoju tej choroby (1, 2, 15). W myśl drugiej teorii początkiem choroby Alzheimera jest udar mózgu. Powstające w związku z tym zaburzenia przepuszczalności krew-mózg stanowią podstawę do gromadzenia się amyloidu β w strukturach mózgowych (9).

Pierwsza z wymienionych hipotez neurobiologicznych choroby Alzheimera zakłada, że w starzejącym się organizmie ludzkim dochodzi do stopniowego zwyrodnienia i obumierania neuronów mózgowych w następstwie zmian strukturalnych niektórych białek oraz uszkodzenia szlaków przekazywania sygnałów (1, 2). W strukturach mózgu, szczególnie kory mózgowej i hipokampa, zaczynają pojawiać się różnorodne formy patologiczne, m.in. zbudowane



Ryc. 1. Struktura chemiczna pinocembryny (5,7-dihydroksyflawanonu)

z amyloidu β blaszki starcze (przestrzenie pozaneuronowe) oraz sploty neurofibrilaryjne złożone z nadmiernie ufosforylowanego białka tau (twory wewnątrzneuronowe). Powodują one stan zapalny komórek nerwowych. Dochodzi do zaburzeń poziomu wapnia, uwolnienia cytochromu C, gromadzenia chromatyny, uszkodzenia jąder komórkowych i fragmentacji DNA, a to w konsekwencji prowadzi do śmierci neuronów (15).

Ponadto stwierdzono, że przewlekły stan zapalny tkanki mózgowej powoduje aktywację komórek mikrogleju i astrocytów. W wyniku tego procesu następuje uwalnianie mediatorów zapalnych, takich jak cytokiny (TNF- α , IL-1 β , IL-6), wolne rodniki tlenowe (ROS) i tlenek azotu (NO). Następnym etapem tych zmian jest zaburzenie ciągłości bariery krew-mózg, co umożliwia napływ komórek obwodowego układu odpornościowego (limfocyty) i powoduje dalsze pogłębianie się stanu zapalnego (1, 2).

Warto dodać, że peptydy amyloidu β mają zdolność wiązania się z różnymi receptorami zlokalizowanymi na komórce nerwowej. Jednym z najważniejszych jest receptor dla produktów zaawansowanej glikacji (ang. *receptor for advanced glycation end products* – RAGE). Liu i wsp. (15) wykazali, że pinocembryna blokuje receptor RAGE i uniemożliwia wiązanie się amyloidu β ze strukturami mózgowymi. A zatem jest to jedno z możliwych rozwiązań dotyczących zapobiegania odkładaniu się amyloidu β w tkance nerwowej w postaci blaszek starczych i usuwania go wraz z prądem krwi poza struktury mózgowe (15).

Druga hipoteza dotycząca powstawania choroby Alzheimera zakłada, że dużą rolę odgrywa w tym procesie uszkodzenie naczyń mózgowych w wyniku udaru lub mikroudarów mózgu. Ma to zaburzać przepuszczalność bariery krew-mózg, a także spowalniać krążenie krwi w naczyniach kapilarnych mózgu. W konsekwencji oczyszczanie struktur mózgowych z amyloidu β ulega osłabieniu i sprzyja jego odkładaniu się w tkance mózgowej.

To z kolei zwiększa proces zapalny i prowadzi do stresu oksydacyjnego. Liu i wsp. (9) nazwali ten stan patologiczny jednostką nerwowo-naczyniową (ang. *neurovascular unit* – NVU). NVU obejmuje krwionośne naczynia mózgowie, otaczające je astrocyty (komórki glistkowe gwiaździste), neurony i inne komórki podporowe (mikroglej okołonaczyniowy), które łączą funkcje komórek nerwowych z miejscowym przepływem krwi, a także regulują przepuszczalność przez śródbłonek mózgowy składników odżywczych, peptydów i elementów morfotycznych krwi. W wyniku zaburzenia ciągłości bariery krew-mózg dochodzi do przemieszczania się do struktur

mózgowych komórek obwodowego układu odpornościowego, m.in. limfocytów.

W normalnych warunkach wytwarzane w tkance nerwowej wolne rodniki nadtlenkowe (ang. *reactive oxygen species* – ROS) są neutralizowane przez występujące w tej samej tkance układy przeciwutleniające. Jednym z takich układów neuroochronnych jest erytroidalny czynnik jądrowy 2 (ang. *nuclear factor 2* – Nrf2). Jest on powiązany z elementem odpowiedzi przeciwutleniającej (ang. *antioxidant response element* – ARE) (16, 17). System ten powiązany jest ściśle ze stresem oksydacyjnym. W przypadku wzrostu poziomu ROS w tkance nerwowej system Nrf2-ARE przyczynia się do wytworzenia dużej liczby cząstek enzymów przeciwutleniających, takich jak hemowa oksygenaza-1 (ang. *heme oxygenase-1* – HO-1) oraz syntetaza γ -glutamylcysteinowa (ang. *γ -glutamylcysteine synthetase* – γ -GCS). Jednak w przypadku wytworzenia w tkance nerwowej zbyt dużego poziomu ROS w wyniku stresu oksydacyjnego, system ten zawodzi i dochodzi do uszkodzenia, a następnie do apoptozy (śmierci) neuronów (16, 17).

Według Wang i wsp. (17) pinocembryna należy do substancji, które opóźniają uszkodzenie i apoptozę neuronów pod wpływem utleniania spowodowanego przez amyloid β , a także stresu oksydacyjnego na drodze pobudzania systemu Nrf2-ARE. Szczególnie istotna jest w tym przypadku aktywność enzymu przeciwutleniającego, a mianowicie HO-1.

Badania doświadczalne nad wpływem pinocembryny na struktury mózgowie

W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań z udziałem zwierząt doświadczalnych i hodowli komórkowych, które dotyczyły neuroochronnego działania pinocembryny.

Liu i wsp. (15) wykazali, że pinocembryna znacznie ogranicza u szczurów włączanie amyloidu β do struktur kory mózgowej. Podanie tej substancji drogą pokarmową w dawce 20 mg/kg m.c. spowodowało zmniejszenie stopnia wiązania amyloidu β przez tkankę nerwową do 54,1%, a w dawce 40 mg/kg m.c. do 8,2% w porównaniu z kontrolą (tab. 1). Ustalono, że pinocembryna blokuje komórkowy receptor RAGE, uniemożliwiając w ten sposób gromadzenie się w tkance mózgowej amyloidu β .

Efektom działania pinocembryny była poprawa pamięci i orientacji przestrzennej u myszy w teście labiryntu wodnego Morrisa. Podanie amyloidu β zwierzętom spowodowało, że czas potrzebny na odnalezienie platformy ukrytej w basenie z wodą był czterokrotnie dłuższy (400%) niż u zwierząt kontrolnych (100%).

Tab. 1. Wpływ pinocebryny na wiązanie się amyloidu β do struktur mózgowych (15)

Badane substancje	Stopień wiązania amyloidu β do struktur mózgowych (%)
Kontrola	0
Amyloid β	100,0
Amyloid β + pinocebryna (20 mg/kg m.c.)	54,1
Amyloid β + pinocebryna (40 mg/kg m.c.)	8,2

Podanie pinocebryny w dawce 20 mg/kg m.c. skracало ten czas o ponad 30%, a w dawce 40 mg/kg m.c. blisko 50% w odniesieniu do kontroli (tab. 2).

W późniejszych badaniach Liu i wsp. (9) dowiedli, że pinocebryna ochrania tkankę mózgową zwierząt doświadczalnych przed czynnikami szkodliwymi oraz poprawia ich funkcje poznawcze. W badaniach używano myszy transgenicznych linii APP/PS1 o upośledzonych funkcjach poznawczych. Pinocebrynę podawano w dawce 40 mg/kg m.c.

Badania wykazały, że przesączalność kapilarnych naczyń mózgowych pod wpływem pinocebryny zmniejszała się o ok. 45%, aktywność mediatorów

prozapalnych z grupy cytokin (TNF- α , IL-1 β i IL-6) obniżyła się w tkance mózgojowej średnio o 32%, a gromadzenie się amyloidu β w strukturach mózgu zostało zahamowane w granicach 30% (tab. 3). Ponadto stwierdzono, że pinocebryna zwiększała u zwierząt liczbę poszukiwań ukrytej platformy w labiryncie wodnym Morrisa o 125% oraz powodowała wzrost pamięci krótkotrwałej w teście jasnego pola o 57% (tab. 4).

Wyniki te świadczą wyraźnie o korzystnym neuroochronnym działaniu pinocebryny na struktury mózgojowe. Ujawniły one działanie zmniejszające przepuszczalność bariery krew-mózg, działanie przeciwzapalne oraz działanie ograniczające gromadzenie się amyloidu β . Ponadto obserwowano pod wpływem pinocebryny kształtowanie się u zwierząt funkcji poznawczych.

Z kolei Wang i wsp. (17) przebadali wpływ pinocebryny na neurotoksyczność amyloidu β z udziałem hodowli komórek ludzkiego nerwiaka niedojrzałego (ang. *human neuroblastoma*) linii SH-SY5Y. Do hodowli wymienionych komórek dodali oni amyloid β oraz pinocebrynę w ilości 20 μ moli. Stwierdzono, że przeżywalność komórek nerwowych w obecności tej substancji wzrosła po 24-godz. inkubacji o 15,5% w porównaniu do kontroli (tab. 5). Poza tym wykazano,

Tab. 2. Wpływ pinocebryny na pamięć i orientację przestrzenną u myszy (15)

Badane substancje	Czas potrzebny do odnalezienia ukrytej platformy w teście labiryntu wodnego Morrisa	
	(s)	(%)
Kontrola	9	100
Amyloid β	36	400
Amyloid β + pinocebryna (20 mg/kg m.c.)	24	267
Amyloid β + pinocebryna (40 mg/kg m.c.)	19	211

Tab. 3. Działanie neuroochronne pinocebryny (9)

Badana właściwość	Poziom badanych parametrów w tkance mózgojowej	
	kontrola	pinocebryna
Przesączalność kapilarnych naczyń mózgowych (%)	58	32
Aktywność mediatorów prozapalnych z grupy cytokin w tkance mózgojowej (pg/g)		
TNF- α	132	91
IL-1 β	80	63
IL-6	16	9
Gromadzenie się amyloidu β w strukturach mózgu (μ g/g)	2,05	1,25

Tab. 4. Wpływ pinocembryny na funkcje poznawcze myszy (9)

Funkcje poznawcze	Grupy zwierząt	
	kontrolna	badana (otrzymująca pinocembrynę)
Liczba poszukiwań ukrytej platformy w labiryncie wodnym Morrisa	1,6	3,6
Wzrost pamięci krótkoterminowej w teście jasnego pola (czas utajenia w s)	135	212

Tab. 5. Przeżywalność komórek nerwiaka niedojrzałego linii SH-SY5Y w obecności amyloidu β oraz pinocembryny (17)

Badane substancje	Przeżywalność komórek (%)
Kontrola	100,0
Amyloid β	70,4
Amyloid β + pinocembryna	85,9

Tab. 6. Pobudzanie aktywności erytroidalnego czynnika jądrowego 2 (Nrf2) oraz hemowej oksygenazy-1 (HO-1) przez pinocembrynę (17)

Badane układy	Stopień aktywności (%)	
	0 godz.	24 godz.
Nrf2 + lamina 2	100	210
HO-1 + β -aktyna	100	240

że pinocembryna pobudza aktywność erytroidalnego czynnika jądrowego 2 (Nrf2) oraz hemowej oksygenazy-1 (HO-1). Zarówno aktywność czynnika Nrf2 w obecności inhibitora laminy 2, jak i aktywność enzymu HO-1 w obecności inhibitora α -aktyny po 24-godz. inkubacji komórek wzrastały ponad dwukrotnie (tab. 6). Doświadczenia te świadczą o wyraźnym przeciwapoptycznym (opóźniającym śmierć komórek) działaniu pinocembryny.

Podsumowanie

Na podstawie przedstawionych powyżej badań można stwierdzić, że pinocembryna odznacza się

działaniem ograniczającym gromadzenie się w tkance mózgowej amyloidu β , działaniem zmniejszającym przepuszczalność bariery krew-mózg, opóźnianiem apoptozy (śmierci) neuronów, działaniem przeciwutleniającym, a także wyraźnie zaznaczonym działaniem poprawiającym orientację przestrzenną i funkcje poznawcze.

W tym kontekście omawiana substancja stwarza potencjalne możliwości zastosowania jej w zapobieganiu i leczeniu choroby Alzheimera. Ze względu na to, że krajowy propolis jest bogatym źródłem pinocembryny, może on stanowić dogodną formę dla wykorzystania tej substancji do celów leczniczych.

Piśmiennictwo

- Zablocka A. Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego. *Post Hig Med Dośw* 2006; 60:209-16.
- Kubis AM, Janusz M. Choroba Alzheimera – nowe możliwości terapeutyczne oraz stosowane modele eksperymentalne. *Post Hig Med Dośw* 2008; 62:372-92.
- Perlmutter D, Colman C. Księga zdrowia mózgu. Vital, Białystok 2014.
- Aguiar S, Borowski T. Neuropharmacological review of the nootropic herb *Bacopa monnieri*. *Rejuven Res* 2013; 16(4):313-26.
- Durg S, Dhadde SB, Vandal R i wsp. *Withania somnifera* (Ashwagandha) in neurobehavioural disorders induced by brain oxidative stress in rodents: a systematic review and metaanalysis. *J Pharm Pharmacol* 2015; 67(7):879-99.
- Fernando WM, Martius IJ, Gozee CS i wsp. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *Br J Nutr* 2015; 114(1):1-14.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Mleczko pszczele. Pozyskiwanie, skład chemiczny, właściwości biologiczne, działanie lecznicze. Humana Divinis, Toruń 2013.
- Chen J, Long Y, Han M i wsp. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharm Biochem Behav* 2008; 90:441-6.
- Liu R, Li J-Z, Song J-K i wsp. Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiol Aging* 2014; 35:1275-85.
- Saad MA, Salam RMA, Kenawy SA i wsp. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. *Pharm Rep* 2015; 67:115-22.
- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Powstawanie, pozyskiwanie i skład chemiczny propolisu. *Pasieka* 2016; (4):54-7.
- Kędzia B. Skład chemiczny i aktywność biologiczna propolisu pochodzącego z różnych rejonów świata. *Post Fitoter* 2006; (1):23-35.

13. Kaleta J. Analiza fizykochemiczna propolisu i możliwość jego standaryzacji. Praca doktorska. Uniw Jagiel Coll Med, Kraków 2007.
14. Tichonov AI, Jarnych WP, Zypaniec IA i wsp. Teoria i praktyka wytwarzania leczniczych preparatów propolisowych. Apipol-Farma, Kraków 2006.
15. Liu R, Wu C-X, Zhou D i wsp. Pinocembrin protects against β -amyloid induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE) – independent signaling pathways and regulating mitochondrion – mediated apoptosis. BMC Med 2012; 10:105-25.
16. Jin X, Liu Q, Jia L i wsp. Pinocembrin attenuates 6-OHDA – induced neuronal cell death through Nrf2/ARE pathway in SH-SY5Y cells. Cell Mol Neurobiol 2015; 35:323-33.
17. Wang Y, Miao Y, Mir AZ i wsp. Inhibition of beta-amyloid – induced neurotoxicity by pinocembrin through Nrf2/HO-1 pathway in SH-SY5Y cells. J Neurol Sci 2016; 368:223-30.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 17.05.2017

zaakceptowano/accepted: 20.07.2017

Adres/address:

*prof. dr hab. n. farm. Bogdan Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań
tel.: +48 (61) 845-58-67
e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl