

ANDRZEJ TOKARZ, GRAŻYNA POKORSKA-LIS, ELŻBIETA POPIEL

ROLA GENISTEINY W PROCESIE ENZYMATYCZNEJ HYDROLIZY ALBUMINY W OBECNOŚCI AZOTANÓW (III) I (V)

ROLE OF GENISTEIN IN ENZYMATIC ALBUMIN HYDROLYSIS IN THE PRESENCE OF NITRATES (III) AND (V).

Katedra i Zakład Bromatologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1
e-mail: bromatos@wum.edu.pl
Kierownik: prof. nadzw. dr hab. A. Tokarz

W oparciu o prosty model doświadczalny in vitro badano wpływ różnych dawek genisteiny na dializę azotanów (III) i (V) w warunkach enzymatycznego trawienia białka. Porównując wyniki uzyskane w układach kontrolnych i badanych, zawierających różne dawki genisteiny od 0,3 do 4,8 mg/układ - można stwierdzić, iż w obecności polifenolu dializa ksenobiotyków maleje wraz ze zwiększaniem się stężenia, po czym przy dawce granicznej następuje wzrost.

Słowa kluczowe: azotany, azotyny, polifenole, genisteina, dializa
Key words: nitrate, nitrite, polyphenols, genistein, dialysis

WSTĘP

W obecnych czasach coraz więcej uwagi poświęca się zagadnieniom ekologii, zdrowego trybu życia, prawidłowego odżywiania się.

Choć świadomość zagrożeń toksykologicznych jest coraz szersza, nie możliwe jest całkowite wyeliminowanie wszystkich ksenobiotyków, które różnymi drogami mogą trafiać do naszego organizmu. Zdecydowanym postępowaniem jest szereg norm i ograniczeń prawnie usankcjonowanych, dotyczących maksymalnych dawek substancji obcych występujących w żywności.

Natomiast przyroda dysponuje ogromną pulą własnych mechanizmów obronnych jako wynik jej procesów adaptacyjnych i ewolucyjnych.

Zachowanie równowagi pomiędzy ksenobiotykami, do których należą między innymi azotany o udokumentowanym, niekorzystnym działaniu na nasze zdrowie [14,15,16], a związkami o działaniu ochronnym jest bardzo istotne. Dlatego tak ważne jest prowadzenie badań nad właściwościami związków pochodzenia roślinnego, należących do grupy tzw. naturalnych substancji nieodżywczych [5] oraz ich interakcjami z substancjami szkodliwymi. Do tej grupy zaliczane są między innymi polifenole będące wtórnymi metabolitami roślinnymi. Jest to

bogata grupa związków chemicznych bardzo zróżnicowana pod względem struktury, masy cząsteczkowej, właściwości fizycznych, biologicznych i chemicznych, szeroko występująca w świecie roślin [5, 6, 14]. Związki polifenolowe są szeroko rozpowszechnione w naszej codziennej diecie. Głównie spożywamy je razem z owocami, warzywami i napojami. Średnio nasz organizm przyjmuje dziennie około 1-2 g mieszaniny różnych flawonoidów [1].

Odkąd powiązano ze sobą liczne badania epidemiologiczne dotyczące zachorowalności ludzi na poszczególne jednostki chorobowe ze sposobem odżywiania się, genisteina stała się obiektem zainteresowania naukowców. Jej wyjątkowe właściwości możemy przypisać głównie charakterystycznej budowie szkieletu węglowego. Ponieważ jest on zbliżony swoją strukturą do cząsteczki ludzkiego estrogeneru, genisteina jest zaliczana do grupy fitohormonów (fitoestrogenów). Należy jednak podkreślić, że mechanizm działania licznych związków roślinnych zawartych w preparatach soi, w tym genisteiny, jest bardzo skomplikowany i nie w pełni wyjaśniony [13]. W wielu ośrodkach na całym świecie prowadzonych jest obecnie szereg badań mających na celu poznanie mechanizmów wielokierunkowego działania genisteiny, do którego m.in. należą: hamowanie rozwoju i prewencja raka sutka i prostaty, łagodzenie objawów menopauzy, łagodzenie objawów zespołu napięcia przedmiesiączkowego, hamowanie aktywności kinaz tyrozynowych, leczenie mukopolisacharydozy typu III, inicjacja apoptozy, hamowanie angiogenezy, ochrona przed wolnymi rodnikami poprzez wpływ na błonę komórkową i poprawę jej stabilności oraz zmniejszenie płynności, co stanowi przesłanną przeszkodę przed ich wnikaniem, a także zwiększenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne, czy łagodzenie osteoporozy [3, 4, 8, 9, 17].

Bogata lista świadcząca o prozdrowotnych właściwościach genisteiny, skłania do przesłannego badania interakcji zachodzących pomiędzy składnikami odżywczymi – białkiem albuminą a genisteiną i ksenobiotykami – azotanami podczas enzymatycznego procesu trawienia tych składników odżywczych.

MATERIAŁY I METODY

Zastosowano model *in vitro* pozwalający na przeprowadzenie enzymatycznej hydrolizy kwaśno-zasadowej albuminy w obecności azotanów, polifenoli i witaminy C w różnych układach stężeń. Jest to układ dwukompartментowy pozwalający badać proces dializy azotanów przez błonę półprzepuszczalną tomofofanową. Kompartмент A-zewnętrzny zawierał bufor fosforanowy, natomiast kompartмент B – wewnętrzny : substraty enzymatycznej hydrolizy białka z dodatkiem azotanów (III) lub (V) oraz polifenolu – genisteiny, z dodatkiem resweratrolu i witaminy C.

Zastosowane stężenia: azotanów (V) -1000 mg NO₃⁻/dm³ i azotanów (III) - 12,5 mg NO₂⁻/dm³ oraz polifenoli to średnie wartości spotykane w codziennej diecie.

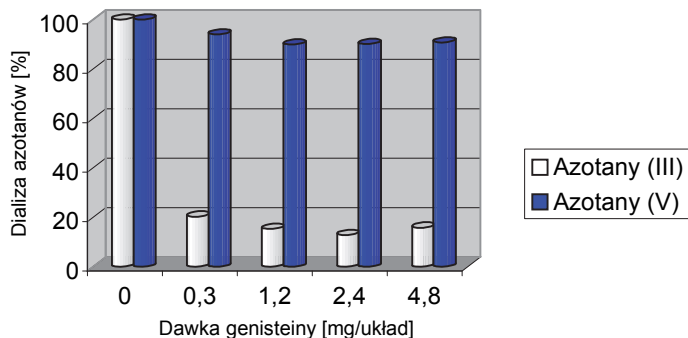
Oznaczanie azotanów przeprowadzono w oparciu o spektrofotometryczną metodę z odczynnikami Griess'a zgodnie z Polską Normą PN-92/A-75112 [12].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań stwierdzono, że polifenole mogą hamować przechodzenie azotanów do dializatu w układach *in vitro* imitujących enzymatyczną kwaśno-zasadową hydrolizę m.in. białka - kazeiny [11].

Celem tej pracy było określenie stopnia oddziaływania wybranego polifenolu – genisteiny z azotanami w procesie pełnej enzymatycznej hydrolizy białka - albuminy.

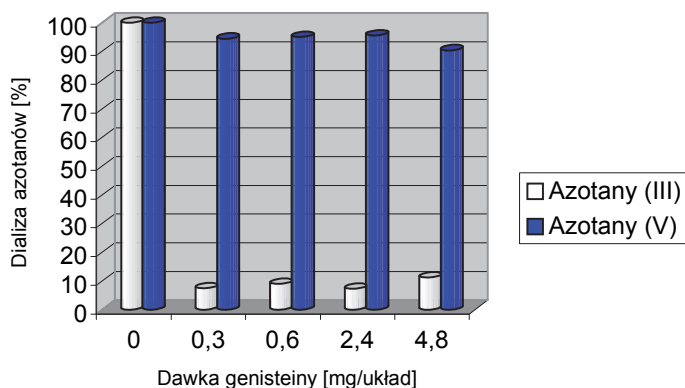
W pierwszym etapie badań przeprowadzono dializę azotanów (III) i (V) w obecności tylko różnych dawek genisteiny oraz enzymów trawiennych celem stwierdzenia wpływu samego środowiska reakcyjnego na poziom oznaczanych azotanów w dializacie, tj. w układach bezbiałkowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotny wpływ parametrów środowiska reakcyjnego na proces dializy szczególnie azotanów (III). Potwierdziło to znane już destrukcyjne oddziaływanie kwaśnego środowiska na jony NO_2^- [11] wyrażające się ponad 80% obniżeniem stężenia azotanów (III) w dializacie w obecności genisteiny. Także stopniowe zwiększanie dawek polifenolu powodowało obniżenie stopnia przechodzenia azotanów do dializatu. Zauważono też, że genisteina wykazuje znacznie silniejsze oddziaływanie na azotany (III) niż na azotany (V). Szczególnie w przypadku zastosowania NO_2^- stwierdzono istnienie dawki granicznej dla genisteiny na poziomie 2,4 mg/układ, której przekroczenie powodowało cofanie jej efektu hamującego na proces dializy azotanów. Zjawisko to zilustrowano na rycinie 1.



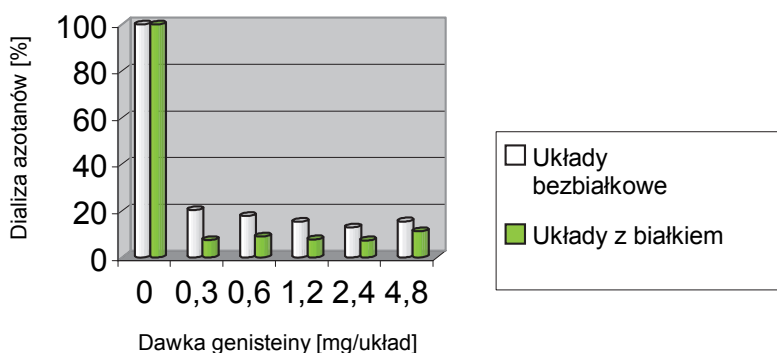
Ryc. 1. Zależność stopnia dializy azotanów od zastosowanej dawki genisteiny w układach bezbiałkowych
Extent of nitrates dialysis according to genistein dose in protein-free system

W kolejnych układach doświadczalnych oprócz wymienionych substratów reakcji zastosowano albuminę. Analizowano wpływ różnych dawek genisteiny na dializę azotanów (III) i (V). Potwierdzony został hamujący wpływ genisteiny na stopień przechodzenia azotanów do dializatu podczas pełnej kwaśno-zasadowej hydrolizy enzymatycznej albuminy. Oddziaływania te są znacznie wyraźniejsze w układach z azotanami (III) (obniżenie stopnia dializy do około 8%) niż z azotanami (V) (do około 90%) (rycina 2).

Obecność białka okazała się być nieobojętna dla procesu dializy. W przypadku układów z azotanami (III), wprowadzenie białka spowodowało istotne zmniejszenie (z 20% do 8%) przechodzenia NO_2^- do dializatu. Można przypuszczać, iż w trakcie hydrolizy w kompartmentcie wewnętrznym azotany (III) związały się w kompleks z białkiem i dlatego ich transport przez błonę półprzepuszczalną został utrudniony, co obniżyło stopień dializy (rycina 3). Dla układów zawierających azotany (V) białko nie wpływa tak istotnie na proces ich dializy (około 90%).



Ryc. 2. Porównanie stopnia dializy azotanów (III) i azotanów (V) przy zastosowaniu różnych dawek genisteiny podczas pełnej enzymatycznej hydrolizy albuminy
Comparison of nitrates (III) and nitrates (V) dialysis according to different genistein doses



Ryc. 3. Porównanie stopnia dializy azotanów (III) w układach bezbiałkowych i z białkiem przy zastosowaniu różnych dawek genisteiny
Comparison of nitrates (III) dialysis extents in protein-free and protein containing systems according to different genistein doses

Również w przypadku badań w warunkach bezbiałkowych, można było stwierdzić istnienie pewnej granicznej dawki genisteiny, której przekroczenie wiązało się z ograniczeniem jej korzystnego działania. Dla układów z azotanami (V) dawka ta wynosiła 2,4-4,8 mg, a z azotanami (III) 1,2-2,4 mg genisteiny/układ. Ważnym zatem wydaje się fakt, że spożywanie soi jako źródła genisteiny może wykazywać korzystny wpływ na zdrowie organizmu, o ile nie nastąpi nadmierna jej konsumpcja, nie tylko nie zwiększająca tego działania ale wręcz je ograniczająca. Przeprowadzone liczne badania dotyczące problematyki polifenoli wykazały, że przy zastosowaniu dużych dawek tych związków przekraczających znacznie dzienne przeciętne ich spożycie, flawonoidy wykazywały właściwości prooksydacyjne. Problem dotyczy

głównie albo suplementacji preparatami zawierającymi duże stężenia flawonoidów dochodzące do 10- lub 20- krotnego ich zwiększenia, bądź też monotonicznej np. diety ludności głodującej strefy tropikalnej żywiącej się produktami na bazie prosa [10].

Polifenole są związkami występującymi bardzo licznie w produktach pochodzenia roślinnego. Spożywając warzywa i owoce przyjmowanych jest razem z dietą nie jeden ale wiele związków z tej grupy. Dlatego też w celu lepszego odzwierciedlenia rzeczywistych warunków, w jakich zachodzą interakcje między azotanami a kilkoma polifenolami, do układów dodano jednocześnie z genisteiną związek z grupy stilbenów – resweratrol. Wyniki badań dość jednoznacznie wskazują na występowanie synergizmu między polifenolami w kierunku ograniczenia stopnia dializy azotanów (tabela I).

Tabela I. Dializa azotanów (V) i (III) w procesie enzymatycznej hydrolizy albuminy w obecności genisteiny i resweratrolu
Nitrates (V) and nitrates (III) dialysis during enzymatic albumine hydrolysis in presence of genistein and resveratrol.

Skład układów reakcyjnych	Dializa [%]	Skład układów reakcyjnych	Dializa [%]
Albumina Azotany(V) 1000 mg dm ³	100 %	Albumina Azotany(III) 12,5 mg dm ³	100 %
Albumina Azotany(V) 1000 mg dm ³ Genisteina 2,4 mg/układ	95,64 %	Albumina Azotany(III) 12,5 mg dm ³ Genisteina 2,4 mg/układ	7,27 %*
Albumina Azotany(V) 1000 mg dm ³ Genisteina 2,4 mg/układ Resweratrol 2,4 mg/układ	79,99 %*	Albumina Azotany(III) 12,5 mg dm ³ Genisteina 2,4 mg/układ Resweratrol 2,4 mg/układ	2,57 %*

Potwierdza to słusność stwierdzenia, że stosowanie urozmaiconej diety bogatej w liczne związki polifenolowe jest znacznie korzystniejsze dla zdrowia niż sztuczna suplementacja, ograniczająca się do pojedynczych substancji czynnych.

Witamina C jest substancją bardzo szeroko występującą w codziennej diecie, stosowaną w dużych ilościach w leczeniu oraz jako suplement diety. Kwas askorbowy ma silne właściwości antyoksydacyjne podobnie jak polifenole. Prace *Malińskiej i Czczot* [2, 7] potwierdzają ochronny wpływ polifenoli na witaminę C. Ich właściwości przeciwutleniające zapobiegają neutralizacji kwasu askorbowego. Najprawdopodobniej witamina C działa analogicznie wobec polifenoli. W celu potwierdzenia ew. interakcji między genisteiną a witaminą C, które wpływałyby na proces dializy azotanów podczas enzymatycznej hydrolizy albuminy, wprowadzono do układów obydwie antyoksydanty. Polifenol zastosowano w dawce granicznej, tj. 1,2 mg/układ. Genisteina okazała się silniej hamować dializę azotanów niż kwas askorbowy (z azotanami (V) 83,74% oraz 89,48% a z azotanami (III) 6,72% oraz 74,69%) przy niewielkiej dawce witaminy C (2 mg/układ) (efekty jej działania nie były zauważalne). Jednak przy dawce zwiększonej (6 mg/układ) w układach z azotanami (III) wykazano synergistyczne działanie polifenolu z kwasem askorbowym, w wyniku którego niemal całkowicie zahamowana została dializa azotanów(III) do kompartmentu zewnętrznego – tabela II.

Tabela II. Dializa azotanów (III) i (V) w procesie enzymatycznej hydrolizy albuminy w obecności genisteiny i witaminy C
Nitrates (III) and nitrates (V) dialysis during enzymatic albumine hydrolysis in presence of genistein and vitamin C.

Skład roztworów reakcyjnych	Dializa [%]	Skład roztworów reakcyjnych	Dializa [%]
Albumina Azotany (III) 12,5 mg/dm ³	100 %	Albumina Azotany (V) 1000 mg/dm ³	100 %
Albumina Azotany (III) 12,5 mg/dm ³ Genisteina 1,2 mg/układ	6,72 %*	Albumina Azotany (V) 1000 mg/dm ³ Genisteina 1,2 mg/układ	83,74 %
Albumina Azotany (III) 12,5 mg/dm ³ Witamina C 2 mg/układ Witamina C 6 mg/układ	74,65 % 23,46 %*	Albumina Azotany (V) 1000 mg/dm ³ Witamina C 2 mg/układ Witamina C 6 mg/układ	89,48 % 89,44 %
Albumina Azotany (III) 12,5 mg/dm ³ Genisteina 1,2 mg/układ Witamina C 2 mg/układ Witamina C 6 mg/układ	7,72 % 0,00 %*	Albumina Azotany (V) 1000 mg/dm ³ Genisteina 1,2 mg/układ Witamina C 2 mg/układ Witamina C 6 mg/układ	85,49 % 74,08 %*

* różnica istotna statystycznie

Przeprowadzone badania wskazują na korzystne działanie genisteiny wynikające z jej hamującego wpływu na dializę azotanów, odpowiadającą procesowi ich wchłaniania z przewodu pokarmowego. Nieobojętna okazała się dawka stosowanego flawonoidu. Z badań wynika, że zbyt duża ilość dodanej genisteiny nie tylko nie wywołuje wzmocnienia pożądanego efektu, ale wręcz powoduje jego cofnięcie.

WNIOSKI

1. Zastosowany do badań model *in vitro* umożliwia ustalenie w krótkim czasie oddziaływań między azotanami (III) i (V) a genisteiną.
2. Stwierdzono oddziaływanie genisteiny przede wszystkim z azotanami (III) - obniżenie dializy do ok.8%, podczas gdy z azotanami (V) jest ono dość znikome (dializa do ok. 90%).
3. Stopień zahamowania dializy azotanów jest zależny od zastosowanej dawki genisteiny przy czym dawką graniczną jest 1,2 – 2,4 mg/układ.
4. Wykazano wystąpienie zjawiska synergizmu genisteiny i resweratrolu wobec azotanów (III) w procesie enzymatycznej hydrolizy albuminy.
5. Stwierdzono większą aktywność genisteiny wobec azotanów (III) niż kwasu askorbowego oraz potwierdzono synergizm tych antyoksydantów w obecności badanych ksenobiotyków.

A. Tokarz, G. Pokorska-Lis, E. Popiel

ROLA GENISTEINY W PROCESIE ENZYMATYCZNEJ HYDROLIZY ALBUMINY W OBECNOŚCI AZOTANÓW (III) I (V)

Streszczenie

Polifenole i azotany są nieodłącznym składnikiem naszej diety. Szkodliwość związków azotanowych jest znana i badana od dawna. Korzystne właściwości polifenoli są wciąż poznawane i wzbudzają ogromne zainteresowanie.

Celem pracy było zbadanie interakcji zachodzących pomiędzy azotanami (III) i (V) a genisteiną w układach odtwarzających proces enzymatycznego trawienia białka (albuminy).

Zastosowano model *in vitro* pozwalający na przeprowadzenie enzymatycznej hydrolizy kwasno-zasadowej albuminy w obecności azotanów, polifenoli i witaminy C w różnych układach stężeń. W dializacie oznaczano zawartość azotanów metodą spektrofotometryczną z odczynnikami *Griess'a*. Stwierdzono hamujący wpływ genisteiny na obecność NO_2^- w kompartmentcie zewnętrznym, przy czym kierunek oddziaływania zależał od dawki polifenolu (dla azotanów (III) od 11,21% do 7,27%, dla azotanów (V) od 95,64% do 79,64% dializy). Genisteina wprowadzana do układu badawczego w zbyt dużych stężeniach – powyżej 2,4 mg/układ - nie tylko nie wywoływała wzmocnienia przewidywanego efektu, ale wręcz powodowała jego cofnięcie. Wykazano także synergizm w oddziaływaniu genisteiny z resweratolem oraz witaminą C.

A. Tokarz, G. Pokorska-Lis, E. Popiel

ROLE OF GENISTEIN IN ENZYMATIC ALBUMIN HYDROLYSIS IN THE PRESENCE OF NITRATES (III) AND (V).

Summary

Polyphenols and nitrates are essential ingredients of human diet. Harm caused by nitrates is well known and studied. Positive role of polyphenols is investigated.

The aim of the study was to analyze interactions between nitrates (III) and (V) and genistein in systems of enzymatic protein (albumin) hydrolysis. *In vitro* model of enzymatic acidic-alkaline albumine hydrolysis in the presence of nitrates, polyphenols and vitamin C in different concentrations was used. Content of nitrates was measured in dialysation fluid spectrophotometrically according to Griess' method. The study revealed inhibiting influence of genistein on nitrates(III) concentration in external compartment. The influence depended on polyphenol dose (for nitrates (III) between 11,21% and 7,27%, for nitrates (V) between 95,64% and 79,64% of dialysis). When genistein was introduced in too high concentrations – over 2,4 mg/system – it did not improve the effect, but inhibited it. The influence of genistein was synergic with resveratrol and vitamin C.

PIŚMIENNICTWO

1. *Budryn G., Nebesny E.*: Fenolokwasy – ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2006, 39, 2, 103-110.
2. *Czeczot H., Podsiad M., Skrzycki M., Gawryszewska E.*: Właściwości antyoksydacyjne wybranych flawonoidów. *Farmacja Polska*, 2002, 58, 20, 934-936.

3. *Fazlul H Sarkar, Yewei Li*: Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2002, 21, 3, 265-281.
4. *Jun Wang, Isam-Eldin Eltoum, Coral A. Lamartiniere*: Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer In Lobund-Wistar rats. *Cancer Letters* 2002, 186, 11-18.
5. *Kusznierewicz B., Wolska L., Bartoszek A., Namieśnik J.*: Charakterystyka polifenoli: występowanie, właściwości, przegląd metod analitycznych., *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005, 38, 1, 81-92.
6. *Maćkiw E.*: Wybrane składniki wina a ich znaczenie prozdrowotne. *Żywnie człowieka i metabolizm*, 2003, 30, 3/4, 1088-1096.
7. *Malińska D., Kiersztan A.*: Flawonoidy – charakterystyka i znaczenie w terapii. *Postępy biochemii* 2004, 50, 2, 182-196.
8. *Mielcarz G., Linke K., Podgórski T., Wojewódzki A. B.*: Polifenole, witamina C oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu u pacjentów z chorobą Crohn'a. *Żywnie człowieka i metabolizm*, 2003, 30, 3/4, 834-837.
9. *Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.*: *Biochemia Harpera*. PZWL, Warszawa, 1994, 796-799, 436.
10. *Oleđzka R.*: Flawonoidy w żywności i ich zdrowotne znaczenie. *Roczniki Warszawskiej Szkoły Zdrowia*, 2005, 5, 58-65.
11. *Pokorska-Lis G., Tokarz A., Sawicka J., Wiącek K.*: Interakcje azotanów (III) i (V) z wybranymi polifenolami w procesie enzymatycznej hydrolizy białka. *Bromat. Chem. Toksykol. Supplement*, 2005, 165-170.
12. *Polski Komitet Normalizacji, Miar i Jakości, PN-92/A-75112*: Owoce, warzywa i ich przetwory. Oznaczanie zawartości azotanów i azotanów.
13. *Śieja K.*: Dieta sojowa w zmniejszeniu raka piersi. *Ginek. Prakt.* 2004, 76, 1 23-28
14. *Sikorski Z.E.*: *Chemia żywności*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 2002, 456-472, 538-540.
15. *Szponar L., Traczyk I.*: Azotany i azotyny w żywności, racjach pokarmowych i płynach biologicznych. *Żywnie człowieka i metabolizm*, 1995, 22, 1, 70-76.
16. *Traczyk I.*: Azotany i azotyny – występowanie i wpływ na organizm człowieka. *Żywność, żywienie, prawo a zdrowie*, 2000, 1, 81-89
17. *Young H. Ju, Kimberly F. Allred, Clinton D. Allerd, William G. Helferich*: Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. *Carcinogenesis* 2006, 27, 6, 1292-1299

Otrzymano: 03.06.2008 r.

Akceptowano: 05.07.2008 r.