

**Pro-apoptyczne właściwości ekstraktów
z kory *Cochlospermum angolense* Welw.**

***Paulina Wdowiak¹, Tomasz Baj², Magdalena Wasiak¹, Piotr Pożarowski¹,
Jacek Roliński¹, Kazimierz Głowniak²***

¹*Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin*

²*Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Akademia Medyczna, ul. Chodźki 1,*

1. Wprowadzenie.

Tematem niniejszej pracy była ocena wpływu ekstraktów roślinnych *Cochlospermum angolense* na cykl życiowy limfocytów krwi obwodowej uzyskanych od zdrowych dawców. Każda komórka organizmu przechodzi określoną ilość podziałów (cykli życiowych komórki). Jeżeli komórki są już niepotrzebne, uszkodzone lub nie otrzymują cząstek sygnałowych do proliferacji i podziałów wówczas włączany jest proces apoptozy. Apoptoza zwana jest naturalną śmiercią komórek indukowaną poprzez aktywację samobójczego mechanizmu - ekspresję odpowiednich genów, których produkty zabijają komórkę. Apoptoza ma za zadanie utrzymanie homeostazy komórkowej, czyli względnie stałej ich liczby w skali całego organizmu.

Ekstrakt z *Cochlospermum angolense* jest stosowany w tradycyjnej medycynie w Angoli do leczenia żółtaczki oraz w profilaktyce malarii przez rodzimych uzdrowicieli. Roślina ta jest małym drzewem o wysokości ok. 5 metrów i żółtych kwiatach. Sporządzono trzy ekstrakty roślinne: etanolowy 100% i 50% oraz wodny. Prowadzono hodowlę ludzkich limfocytów w obecności poszczególnych ekstraktów podawanych w różnych stężeniach. Oceny etapów rozwoju limfocytów dokonano przy pomocy oranżu akrydyny. Stwierdzono istotny wpływ jednego z ekstraktów na cykl komórkowy oraz apoptozę tych komórek.

2. Metodyka.

Krew obwodową pobrano od 5 zdrowych dawców, rozcieńczono w stosunku 1:1 z płynem PBS, a następnie izolowano komórki mononuklearne w gradiencie gęstości.

Uzyskane PBMC płukano dwa razy w PBS, liczono i oceniano ich żywotność przy pomocy błękitu trypanu.

Korzeń *Cochlospermum angolense* został rozdrobniony. Następnie odważono po 5g surowca, dodano 50 ml wody, 50% etanolu lub 100% etanolu i gotowano przez 30 min pod chłodnicą zwrotną na koszyku grzejnym w temp. 80°C. Następnie mieszaninę sączono przez sączek. Pozostały w kolbie ponownie surowiec zalewano 50 ml wody, 50% etanolu lub 100% etanolu, gotowano przez następne 30 min. Ponownie sączono i gotowano surowiec. Po przesączeniu uzupełniono wodą, 50% etanolem lub 100% etanolem do 150 ml.

PBMC hodowano przez 24h w medium hodowlanym i stymulowano mitogenem - PHA. Po 24h hodowli komórki przeniesiono na płytkę 24-dołkową (1×10^6 komórek na dołek). Następnie dodano poszczególne ekstrakty roślinne do dołków. Komórki inkubowano również w samym medium oraz w obecności odpowiednich ilości 50% i 100% etanolu. Wszystkie dodawane składniki były obecne w medium przez cały okres prowadzenia hodowli.

Do oceny cyklu komórkowego oraz apoptozy użyto oranżu akrydyny. Analizę przeprowadzono wykorzystując cytometr przepływowy.

3. Wyniki i wnioski.

Analizie poddano trzy ekstrakty z kory *Cochlospermum angolense*: wodny oraz etanolowe 50% i 100%. Wyjściowe ilości uzyskanych ekstraktów dodawano do hodowli w ilościach pozwalających uzyskać ich rozcieńczenie w medium odpowiednio 1:100, 1:1000 oraz 1:10000.

Po 24h hodowli odnotowano znaczący wzrost odsetka komórek apoptotycznych hodowanych w obecności ekstraktu etanolowego 50% w porównaniu z próbą kontrolną. Przy rozcieńczeniu ekstraktu 1:100 widoczny jest ponad dwukrotny wzrost odsetka komórek w regionie R8 wyznaczonym podczas analizy cytometrycznej (ryc.7). Również barwienie oranżem akrydyny po 48h uwidocznilo pro-apoptotyczne właściwości ekstraktu etanolowego 50%. Dodanie ekstraktu w większym rozcieńczeniu (1:1000) także wpływa na wzrost apoptozy komórek mononuklearnych krwi obwodowej, natomiast różnice przy rozcieńczeniu 1:10000 są słabiej zaznaczone, niemniej jednak odsetek komórek apoptotycznych zmniejszył się. W hodowlach z ekstraktami: wodnym oraz etanolowym 100% nie odnotowano różnic w porównaniu z próbami kontrolnymi. Zauważono również zmiany dotyczące cyklu komórkowego hodowli z ekstraktem etanolowym 50% (1:1000 oraz 1:100). Rycina 1 obrazuje zmniejszenie odsetka komórek w fazie S, czyli replikacji DNA oraz w fazie G₂ i M odpowiadającej podziałowi

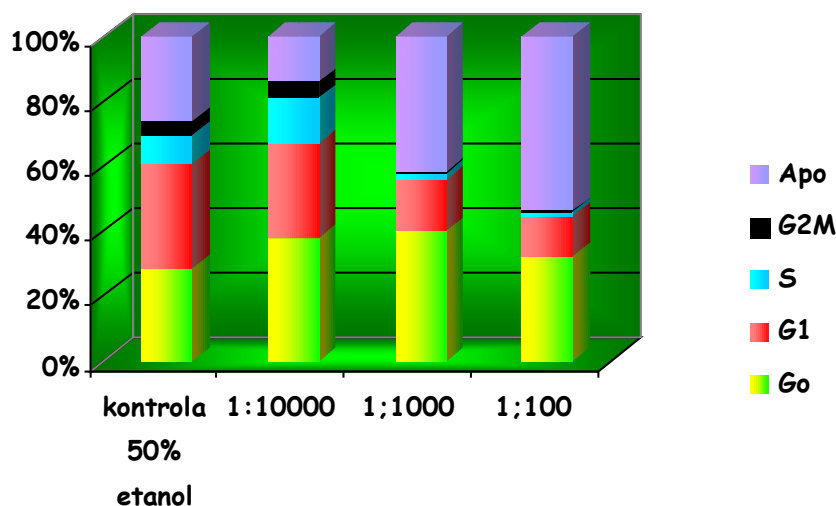
mitotycznemu. Analiza pozostałych hodowli z ekstraktami wodnymi oraz etanolem 100% nie wykazały znaczących zmian w cyklu życiowym komórek.

Indukcja apoptozy wywołana obecnością związków zawartych w ekstrakcie etanolem 50% skłania nas do prowadzenia dalszych doświadczeń mających na celu wyodrębnienie z ekstraktu poszczególnych grup związków i zbadanie ich wpływu na cykl komórkowy. Zaobserwowane właściwości pro-apoptotyczne wymagają również weryfikacji przy wykorzystaniu innych metod wykrywania apoptozy.

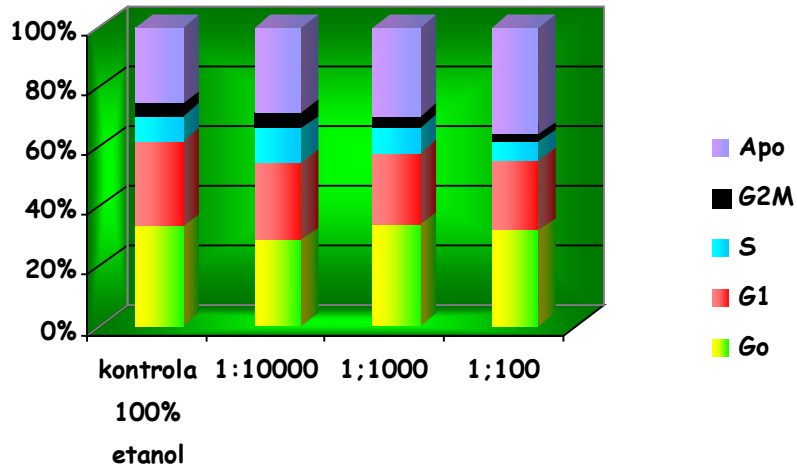
Piśminennictwo:

- R. Aliyu et al. The hepatoprotective cytochrome P-450 enzyme inhibitor isolated from the Nigerian medicinal plant *Cochlospermum planchonii* is a zinc salt. *Jurnal of Ethnopharmacology* 48 (1995) 89-97.
- W. Presber et al. Inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium bergheri in vitro* by an extract of *Cochlospermum angolense* (Welw.). *Acta Trop.* 1992; 50 (4); 331-8
- Amit K. Taraphadar et al. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science* 2001; 11 (80); 1387-1396
- S.Y. Chor et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of herbal medicine on hepatic stellate cell. *Jurnal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 180-186
- H. Poppendieck *Colchospermaceae*. New York Botanical Gardens, Bronx, N.Y. (1981)
- W. Gorczyca et al. Programowana śmierć komórek (apoptoza). *Pat. Pol.* 1993; 3 (44); 113-119
- C. Sherr. Cancer and cells. *Science.* 1996; 274: 1672-1677

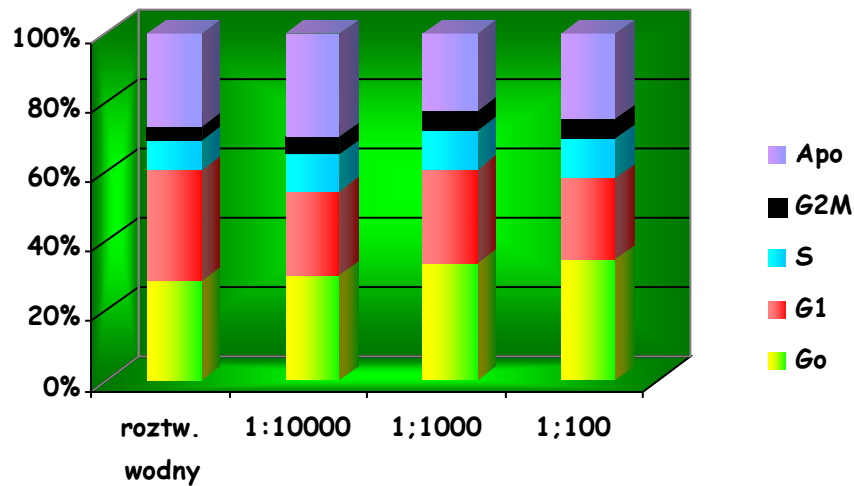
Ryciny



Ryc. 1. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G₀, G₁, S, G_{2M}) oraz komórek apoptotycznych (Apo) hodowanych przez 24 godz. w obecności ekstraktu (50% etanol) z *Cochlospermum angolense*.



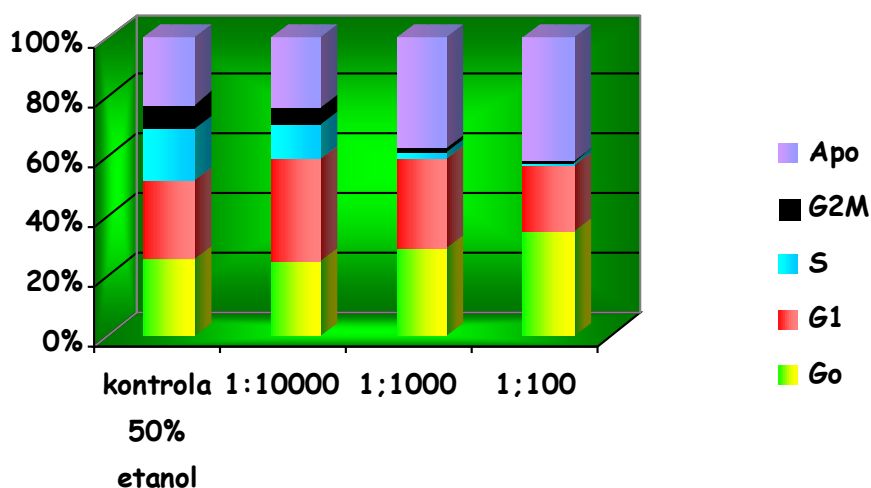
Ryc. 2. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G₀, G₁, S, G₂M) oraz komórek apoptotycznych (Apo) hodowanych przez 24 godz. w obecności ekstraktu (100% etanol) z *Cochlospermum angolense*.



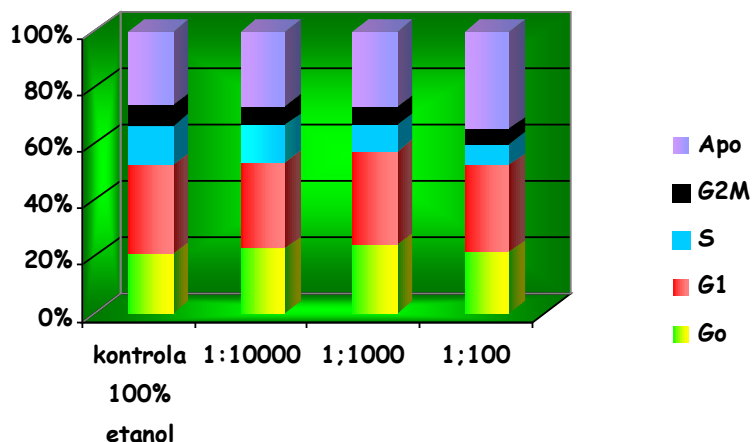
Ryc. 3. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G₀, G₁, S, G₂M) oraz komórek apoptotycznych (Apo) hodowanych przez 24 godz. w obecności ekstraktu (wodny) z *Cochlospermum angolense*.

Tab. 1. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G_0 , G_1 , S, G_2M) oraz komórek apoptotycznych (Apo) hodowanych w obecności poszczególnych ekstraktów *Cochlospermum angolense*.

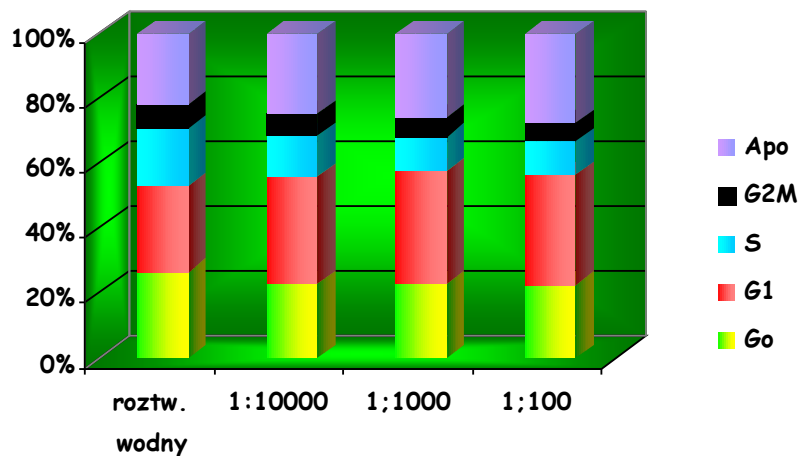
Cochlospermum angolense	24h					48h				
	G_0	G_1	S	G_2M	Apo	G_0	G_1	S	G_2M	Apo
kontrola 100% etanol	33,2	28,4	8,2	4,2	25,3	20,5	31	13,7	7,1	25,7
1:10000	28	25,7	11	5,5	27,7	22	29,6	13	6,4	25,5
1:1000	33,6	23,9	8,3	3,7	29,4	24	32,8	9,4	6,2	26,5
1:100	31,9	23,1	6,3	2,5	35,5	21,4	30,9	7,2	5,4	34,4
kontrola 50% etanol	28,3	32,1	8,9	4,2	25,9	24,7	25,7	17,1	7,8	21,8
1:10000	36,8	28,4	13,5	4,9	13,4	24,4	33,4	11,2	5,5	22,8
1:1000	39,8	15,6	2	0,6	41,1	28,8	30	2,4	1	37,1
1:100	32,1	12,2	1,3	0,4	53,4	34,6	22,5	0,9	0,2	41,4
roztwór wodny	28,2	31,7	8,4	4,2	26,6	25,6	25,6	17	7,2	20,8
1:10000	29,9	23,7	10,5	5	29,1	22	31,9	12,3	6,5	23,7
1:1000	32,9	26,7	11	5,3	22	22,2	34	10,2	5,8	25
1:100	33,7	22,5	11,1	5,5	24	22,1	33,1	10,1	5,8	26,7



Ryc. 4. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G_0 , G_1 , S, G_2M) oraz komórek apoptotycznych (Apo) hodowanych przez 48 godz. w obecności ekstraktu (50% etanol) z *Cochlospermum angolense*.

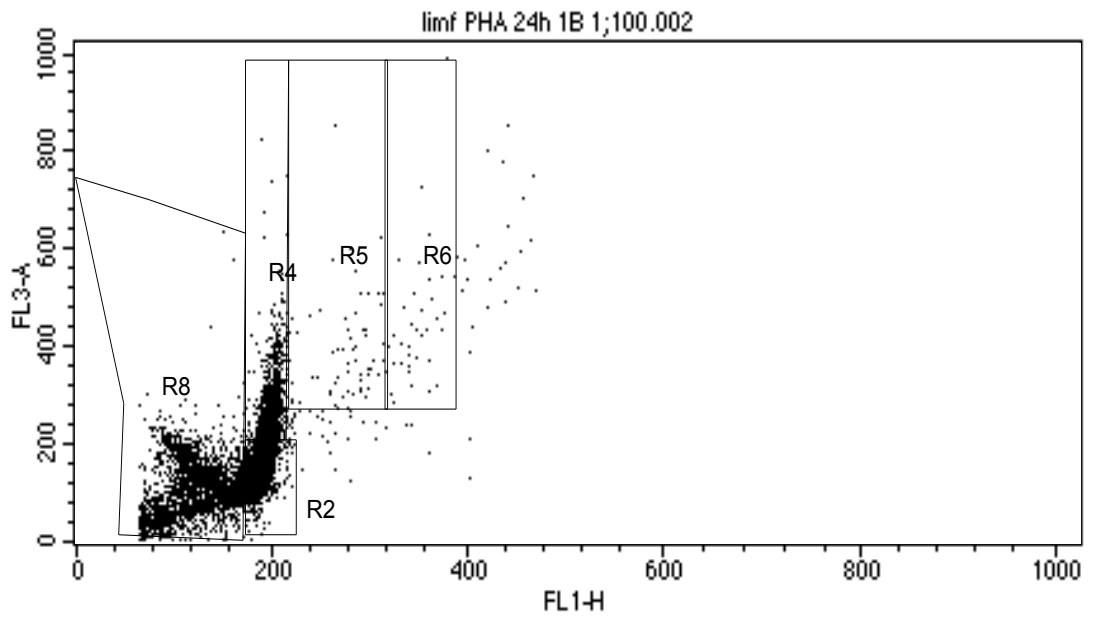
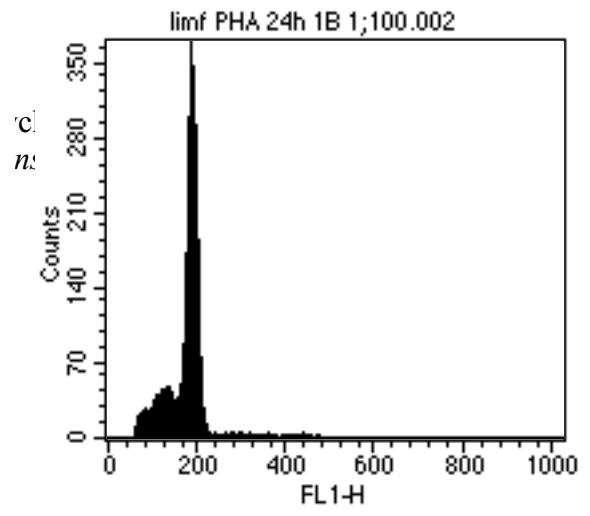
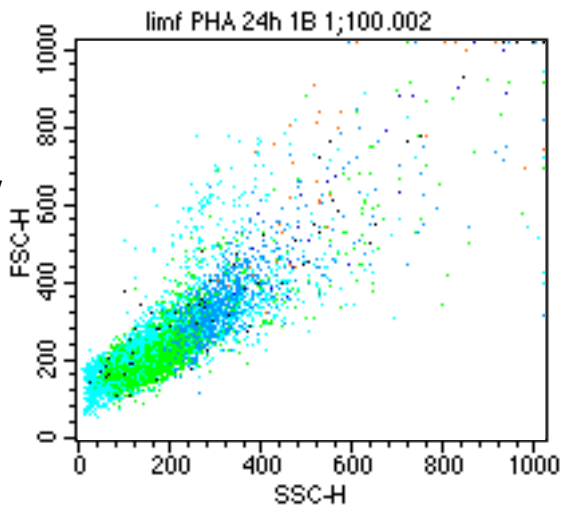


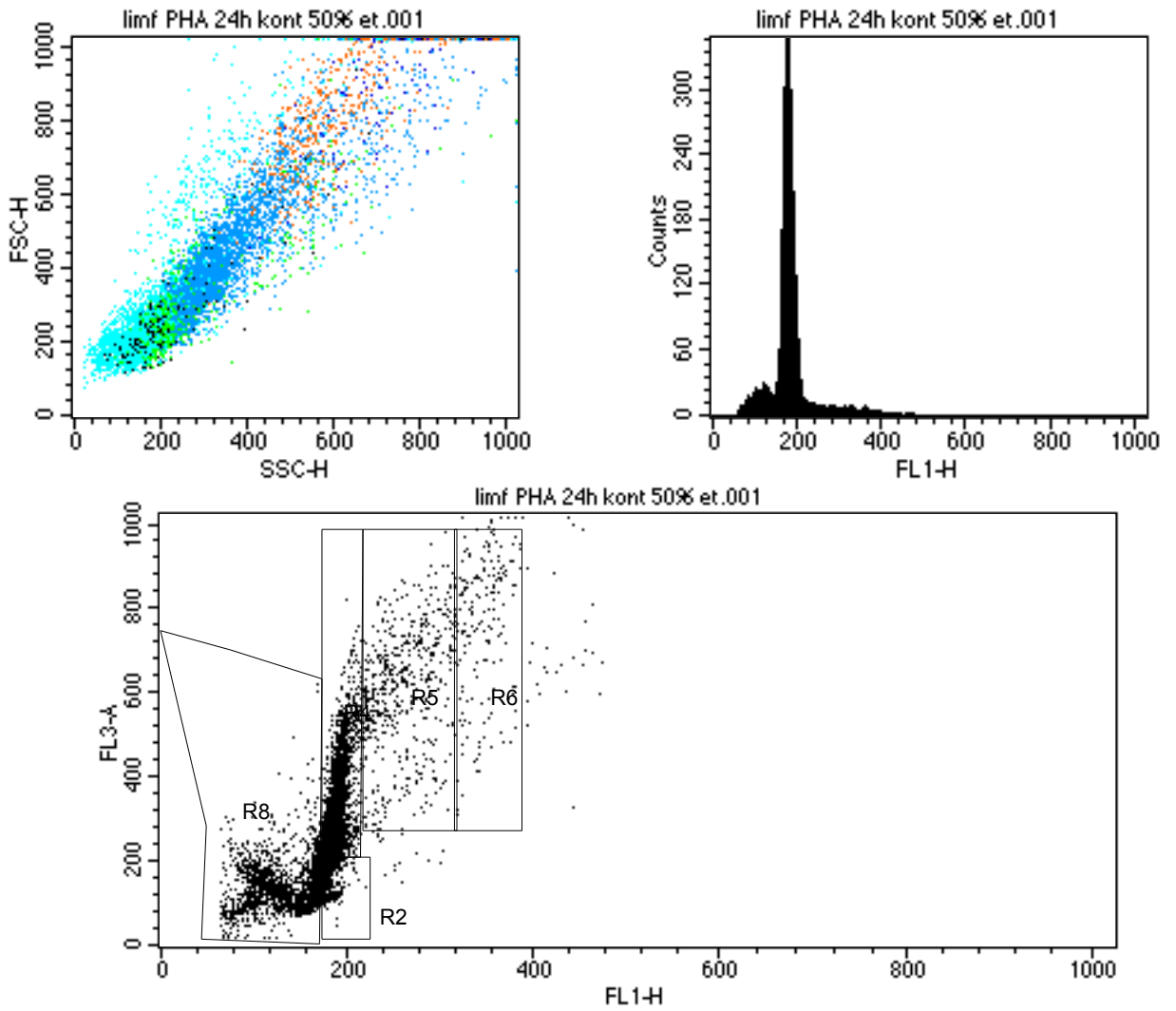
Ryc. 5. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G₀, G₁, S, G₂M) oraz komórek apoptotycznych (Apo) hodowanych przez 48 godz. w obecności ekstraktu (100% etanol) z *Cochlospermum angolense*.



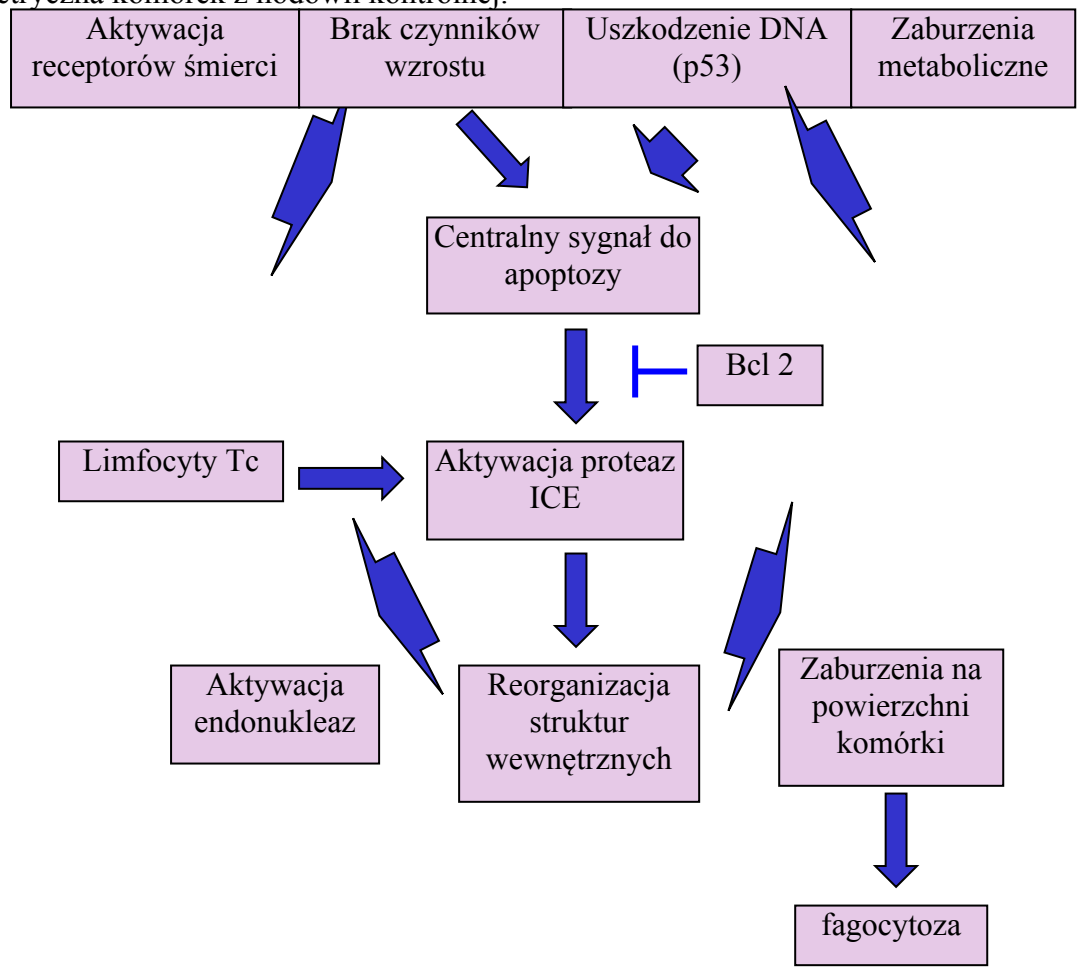
Ryc. 6. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G₀, G₁, S, G₂M) oraz komórek apoptotycznych (Apo) hodowanych przez 48 godz. w obecności ekstraktu (wodny) z *Cochlospermum angolense*.

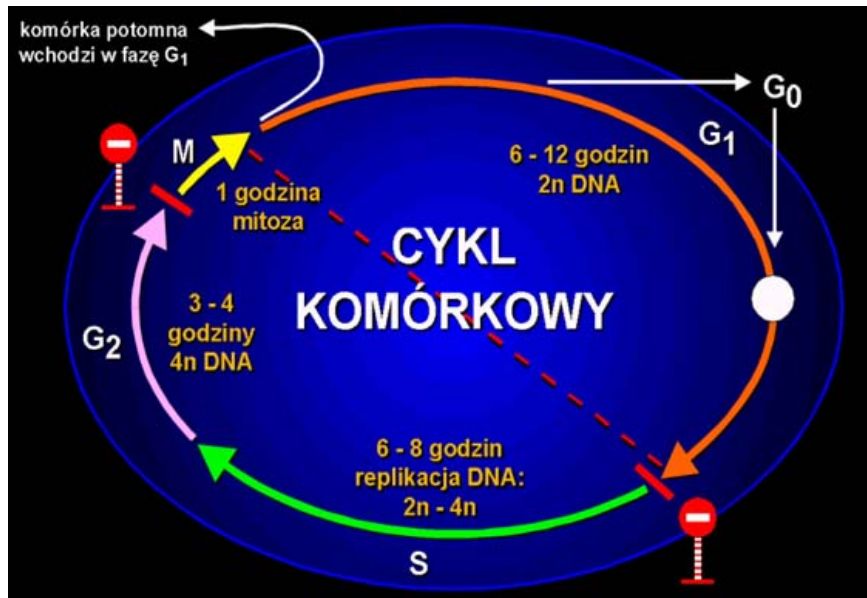
Ryc.7
1:100
Apo)





Ryc.8. Analiza cytometryczna komórek z hodowli kontrolnej.





Przykładowy model procesu apoptozy.