Radioprotekcyjne właściwości ekstraktów z kory sosny

Radioprotective effects of pine bark extracts

Marcin Goss[1,2], Iwona Wawer[1,3], Katarzyna Paradowska[1]

[1] Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, WUM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: katarzyna.paradowska@wum.edu.pl
[2] Komarko Sp. z o.o., 05-850 Ożarów Mazowiecki, ul. Kierbedzia 8;
[3] Karpacka Państwowa Uczelnia w Krośnie, 38-400 Krosno, Rynek 1; e-mail: iwona.wawer@kpu.krosno.pl

Słowa kluczowe: radioprotekcja, technet, komórki GMK, *Pinus silvestris*, kora sosny zwyczajnej
Key words: radioprotection, technetium, GMK cells *Pinus silvestris*, pine bark

Streszczenie

Zbadano przeżywalność komórek nerek zielonej małpy (GMK) poddanych rosnącym dawkom promieniowania γ. Do hodowli komórek dodano kompleks ^{99m}TcDMSA (technetu ^{99m}Tc z kwasem merkaptobursztynowym, DMSA). Rozmiary zmian post-radiacyjnych oszacowano na podstawie liczenia komórek. Dodanie ekstraktów z kory zwiększyło przeżywalność komórek, w porównaniu do grupy bez dodatku radioizotopu, a zwłaszcza potraktowanej technetem bez środków ochronnych. Badania ekstraktów z sosny zwyczajnej *Pinus silvestris* i *Pinus maritina* (Pycnogenol) metodą EPR pokazały, że oba są efektywne w zmiataniu rodnika DPPH. Sugerowany mechanizm radioprotekcyjny obejmuje działanie antyoksydacyjne i przeciwrodnikowe.

Summary

Survival of GMK (green African monkey, kidney) cells exposed to increasing doses of ionising γ-radiation from ^{99m}TcDMSA (a complex of technetium ^{99m}Tc and dimercaptosuccinic acid) added to the culture medium) was evaluated. In order to determine the extent of post-radiation changes, the cell count was performed. Addition of bark extracts to the culture medium increased cell survival, when compared both to the group without the radioisotope and to the group treated with technetium in the absence of extract. EPR assay indicated that the extracts from *Pinus silvestris* and *Pinus maritina* (Pycnogenol) are effective DPPH radical scavengers. The suggested mechanism of radioprotection may involve antioxidant and antiradical activities.

Wstęp

Inspiracją do wykonania badań było pojawienie się na polskim rynku preparatu Pycnogenol, szeroko reklamowanego w krajach Europy Zachodniej i USA. Otrzymuje się go z kory sosny *Pinus maritima* rosnącej na wybrzeżach Zatoki Biskajskiej. Ekstrakt zawiera związki polifenolowe o silnych właściwościach antyutleniających. Jest polecany jako środek wspomagający organizm w walce ze stresem oksydacyjnym, a więc w chorobach przebiegających w stanach zapalnych. W Polsce rośnie sosna zwyczajna *Pinus silvestris* a jej kora jest traktowana jako materiał odpadowy. Istnieją jednak możliwości pozwalające na wykorzystanie jej jako materiału, np. do produkcji suplementów diety. Celem pracy było zbadanie właściwości antyoksydacyjnych i radioprotekcyjnych ekstraktów z kory sosny zwyczajnej.

Preparaty z wysoką zawartością związków polifenolowych mogą być cennym źródłem substancji, które zostały usunięte z żywności wskutek jej przemysłowego przetwarzania. Liczne publikacje dowodzą, że polifenole, np. katechiny i taniny mają szerokie spektrum działań biologicznych (wpływ na układ immunologiczny, układ krążenia krwi czy układ nerwowy). Ekstrakt z kory sosny zwyczajnej może być alternatywą dla takich preparatów, jak np. ekstrakt z pestek winogron.

W ekstraktach kory sosnowej stwierdzono występowanie wielu związków polifenolowych:

1. Flawon-3-ole (katechina, epikatechina i procyjanidyny B1,B2,B3).
2. Flawonole (kwercetyna i jej glikozydy, taksyfolin).
3. Polimery katechin: B4-B12 i wyższe.
4. Taniny niehydrolizujące, katechinowe.
5. Taniny hydrolizujące, pochodne galoiloglukozy.
6. Kwasy fenolowe (galusowy, kawowy, chlorogenowy).

Obecność grup OH powoduje, że związki te mają właściwości redukujące. Pomiary względnej aktywności antyoksydacyjnej flawonoidów w stosunku do wolnych rodników, pokazały zależności od liczby i lokalizacji grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym, działających jako donor jonów wodorowych lub elektronów.

Polifenole (taniny) występują we wszystkich roślinach lądowych, co pozwala przypuszczać, że ich główną rolą jest ochrona przed promieniowaniem UV; mają maksimum absorpcji przy 280 nm. Drugą prawdopodobną rolą jest ochrona rośliny przed grzybami, bakteriami i innymi patogenami.

Biologiczna aktywność garbników

Od dawna znane jest i szeroko wykorzystywane przeciwdrobnoustrojowe działanie prostych związków polifenolowych oraz polimerów (garbniki, taniny). Stwierdzono silniejsze działanie garbników hydrolizujących w porównaniu ze skondensowanymi, lecz wpływ wielkości masy cząsteczkowej związku na jego aktywność nie został opracowany.

Działanie przeciwbiegunkowe. Garbniki są stosowane w przypadkach lekkich, nieswoistych oraz ostrych biegunek. Mechanizm działania polega na powstawaniu błony koagulacyjnej, którą garbniki tworzą z białkami śluzówki uszczelniając powierzchniowo tkankę. Stwierdzono też hamowanie enzymu hialuronidazy. Działanie garbników jest specyficzne: hamujące wydzielanie i perystaltykę jelit, hamujące rozwój drobnoustrojów oraz przeciwzapalne. Oficjalna medycyna proponuje leki typu: sallotannal lub białczan taniny (taninum albuminatum). Działanie ich polega na niszczeniu trzeciorzędowej struktury białka, efekt znany jest jako garbowanie skóry. Te same właściwości wykorzystano do ilościowego oznaczania tanin w reakcji z proszkiem skórzanym (FPV).

Działanie przeciwwirusowe. Wpływ garbników na żywotność drobnoustrojów i ich namnażanie również ma związek ze zdolnością do wiązania się z białkami. Wykazano osłabienie infekcyjności wirusów grypy działaniem polifenoli z herbaty zielonej i czarnej. Przeciwwirusowe działanie związków obecnych w herbatach wobec wirusów grypy typu A i B mają: teaflawina, procyjanidyna B2, galusan epigalokatechiny EGCG [1]. Interesujące, że molekuły dimerów (teaflawina, procyjanidyna B2) miały silniejsze działanie niż monomery katechin. Testowano liczne związki naturalne i wyciągi roślinne przeciw wirusowi HIV, m.in. te obecne w zielonej herbacie; EGCG hamuje rozwój wirusa HIV-1 [2].

Ostatnio największym problemem zdrowotnym stała się pandemia wywołana przez koronawirusy SARS-Co-V2. Ekstrakt z kory sosny śródziemnomorskiej (Pycnogenol) podawano pacjentom [3] zainfekowanym koronawirusem. Ekstrakt miał działanie przeciwzapalne, ochronne na komórki śródbłonka w układzie oddechowym i naczyń krwionośnych. Można go polecać pacjentom do łagodzenia objawów post-COVID, ale również osobom z chorobami układu krążenia [4].

Działanie przeciwnowotworowe. W celu określenia aktywności poszczególnych związków przeprowadzono badania na kulturach linii komórkowych oraz na zwierzętach doświadczalnych, którym implantowano komórki nowotworowe. Działanie przeciwnowotworowe garbników może mieć różny mechanizm, w tym przeciwmutagenny. Pokazano właściwości przeciwnowotworowe proantocyjanidyn z nasion winogron w przypadku nowotworów jelita grubego [5].

Preparaty o działaniu antyoksydacyjnym i radioprotekcyjnym

Silne właściwości antyoksydacyjne i zdolność wymiatania wolnych rodników przez związki polifenolowe spowodowały że poszukiwane są preparaty roślinne, które mogą dostarczać ich w większych ilościach.

Takim preparatem okazała się być kora sosny *Pinus maritima*, która rośnie na wybrzeżach zatoki Biskajskiej we Francji. Surowy klimat, silne wiatry, dużo słońca spowodowały, że gatunek ten nagromadza polifenole. Ekstrakt kory sosnowej (*Pinus maritima*) zawiera szereg związków polifenolowych, które można podzielić na monomery (katechina, epikatechina, taxifolin) i skondensowane flawonoidy (procyjanidyny B1, B2, B3, B7). Ekstrakt zawiera również kwasy fenolowe (kawowy, ferulowy i p-hydroksybenzoesowy). Jego skład, biodostępność i zdolności wymiatania rodników były intensywnie badane *in vitro* oraz *in vivo*. Badania kliniczne potwierdziły, że Pycnogenol ma pozytywne działanie we wspomaganiu terapii chorób o etiologii wolnorodnikowej [6].

Jednak, aby zrozumieć całość obserwowanych efektów, potrzebne są zarówno badania pojedynczych składników jak i badania całego zestawu związków polifenolowych obecnych w tym ekstrakcie. Badania składu ekstraktu metodą HPLC [7] wykazały obecność katechiny i epikatechiny, dihydrokwercetyny, a także procyjanidyn o różnym stopniu polimeryzacji, od 3 do 7, w zależności od metody ekstrakcyjnej.

Ochrona organizmu może być skuteczna, jeśli związki podane drogą pokarmową zostaną wchłonięte. Podano szczurom (+)-katechinę i (-)epikatechinę oznaczając poziom tych związków i ich metabolitów w surowicy krwi i w moczu za pomocą HPLC [8]. Okazało się, że w płynach ustrojowych są obecne głównie metabolity tych związków, w postaci glukuronianów, podczas gdy stężenie wyjściowych katechin w surowicy krwi i w moczu jest bardzo małe.

Pycnogenol o silnych właściwościach antyoksydacyjnych podano szczurom z wodą do picia przed naświetleniem ich dawką promieniowania X (154 Gy). Badania histologiczne przewodu pokarmowego pokazały, że zwierzęta dostające Pycnogenol zachowały w lepszym stanie kosmki jelitowe [9].

Działanie ochronne przed promieniowaniem jonizującym mają herbaty zielona i czarna. Skuteczne były zarówno ekstrakty, jak i poszczególne związki, np. galusan epigalokatechiny [10]. Przetestowano ochronne właściwości mieszaniny polifenoli z zielonej herbaty: EGCG, galusan epikatechiny, epigalokatechinę, i epikatechinę; podawano je myszom, które dostały dawkę promieniowania gamma [11].

Silne właściwości antyoksydacyjne ma mieszanina antocyjanin i polimerów katechinowych (tanin) obecna w owocach aronii, a także w ekstrakcie z owoców (Aronox). Badając wpływ antocyjanin aroniowych na przebieg doświadczalnej choroby popromiennej u królików, wywołanej znacznymi dawkami promieniowania jonizującego (4 Gy i 8 Gy) stwierdzono, że podanie ekstraktu zwiększało odsetek

przeżycia napromieniowanych zwierząt. Obserwowano zahamowanie nadmiernej generacji wolnych rodników, spadek liczby krwinek białych uległ zahamowaniu, co zmniejszało objawy choroby popromiennej. Wyniki badań potwierdziły ochronne działanie antocyjanin w przypadku choroby popromiennej [12, 13] i łagodzenie jej przebiegu.

Interesujące było więc sprawdzenie, czy właściwości radioprotekcyjne wykażą też ekstrakty z kory sosny zwyczajnej zawierające monomery (katechina, epikatechina), dimery (procyjanidyny) oraz polimery katechinowe (taniny). Badanie właściwości radioprotekcyjnych związków polifenolowych może mieć duże znaczenie w ocenie ich przydatności jako fitoprotektorów.

Działanie promieniowania jonizującego na komórki

Działanie pośrednie promieniowania w środowisku wodnym polega na jonizacji wody i tworzeniu wolnych rodników. Jony i rodniki zapoczątkowują reakcje prowadzące do powstania zmian biologicznych (działanie bezpośrednie). Uważa się, że szkodzenia popromienne przebiegają w kilku fazach [14]: (I) etap procesów fizycznych (ok. 10^{-16} s), w tym czasie wywoływana jest jonizacja wody, (II) etap procesów fizyko-chemicznych (ok. 10^{-6} s) – jony oddziałują z cząsteczkami wody tworząc sekwencję jonów i rodników: H^+, OH^-, H• i OH•. Wolne rodniki H• i OH• są bardzo reaktywne chemicznie, choć w większości ulegają rekombinacji w ciągu 10^{-5}-10^{-11} sekundy, bez wywoływania skutków biologicznych.

Działanie bezpośrednie promieniowania polega na uszkadzaniu struktur komórkowych. Etap procesów chemicznych (III) trwa kilka sekund, w tym czasie produkty reakcji oddziałują z biomolekułami w komórce uszkadzając np. chromosomy lub powodując rozerwanie połączeń w biopolimerach. Utlenione produkty mogą hamować działanie niektórych mechanizmów enzymatycznych lub inicjować zmiany materiału genetycznego. Etap biologiczny (IV) – może trwać kilkadziesiąt minut, dni lub jeszcze dłużej.

Aby radioizotop emitujący promieniowanie mógł być użyty w badaniach hodowli komórek powinien łatwo wbudowywać się w badany typ komórek. Jego czas półtrwania powinien być na tyle długi, aby umożliwić podanie nuklidu i zarejestrowanie rozkładu aktywności w hodowli. Technet-99 spełnia te wymogi, jego fizyczny czas półtrwania ($T_{1/2}$) wynosi 6 godzin. Biologiczny okres półtrwania $T_{1/2b}$ (czyli naturalna prędkość eliminacji) to 1 dzień. Połączenie biologicznego i fizycznego okresu półtrwania, czyli efektywny okres półtrwania ($T_{1/2e}$) wynosi 4,8 godziny. Technet-99 jest stosowany w diagnostyce (w scyntygrafii mózgu, wątroby, nerek i tarczycy) oraz w badaniach na liniach komórkowych. Różne tkanki mają różną zdolność wychwytu związków znakowanych technetem. ^{99m}Tc-DMSA (związek kompleksowy technetu z kwasem dwumerkapto-bursztynowym) jest radiofarmaceutykiem przeznaczonym głównie do diagnostyki zmian w nerkach.

Wbudowywanie się kompleksu ^{99m}Tc-DMSA w komórki pozwala zorientować się, jak przebiegają procesy metaboliczne. Stosując różne dawki promieniowania widać, jak szybko i na jaką skalę przebiega proces uszkadzania komórek. Dodając substancje o przypuszczalnym działaniu ochronnym możemy ocenić czy mogą one zahamować rozpad komórek.

Materiał i metody

Materiał roślinny. Korę sosnową do otrzymywania ekstraktów pozyskano z różnych stanowisk w Polsce: puszcza Borecka, puszcza Piska, Pomorze i okolice Warszawy. Zebrano korę, zwaną lustrzanką z młodych gałęzi i pnia głównego. Do ekstrakcji rozdrobnionej kory wykorzystano zmodyfikowaną metodę opracowaną przez prof. Jana Oszmiańskiego z Zakładu Technologii Owoców i Warzyw Akademii Rolniczej we Wrocławiu [15].

Materiał został rozdrobniony, a następnie odważono 100 g rozdrobnionej kory, dodano do niej 50 g chlorku sodu i 500 g mieszaniny (1:4) aceton : octan etylu. Połączone składniki umieszczono w myjce ultradźwiękowej na czas 30 minut. Następnie tak uzyskany roztwór, został przesączony pod próżnią stosując lejek Buchnera (z podwójną bibułą filtracyjną średniej gęstości). W wyniku sączenia uzyskano klarowny płyn o oliwkowym zabarwieniu w ilości 306,4 g. Przesącz poddany został procesowi zagęszczania wykorzystując wyparkę próżniową, z temperaturą w łaźni do 45°C. W wyniku zagęszczania, otrzymano ciemno-oliwkowy roztwór o masie 63,1 g. Do roztworu dodano 63 g heksanu i zaobserwowano wypadanie jasnego osadu. Strącony osad odsączono próżniowo ponownie wykorzystując lejek Buchnera i podwójną bibułę filtracyjną. Odsączony osad poddany został suszeniu z wykorzystaniem wyparki próżniowej. Suszenie trwało około 20 minut, w wyniku czego otrzymano jasno kremową substancję w ilości 0,68 g. Do oznaczeń składu sporządzono naważki o gramaturze 100 mg i rozpuszczono w 50 mL metanolu.

Widma EPR rejestrowano na przyrządzie Radiopan SE/25X o częstości 9,3 GHz, wyposażonym w komputer co umożliwiało akumulację widm i ich analizę. W testach pojemności antyoksydacyjnej zastosowano trwały rodnik DPPH (difenylo pikrylohydrazylu) zakupiony w firmie Aldrich. Sporządzone ekstrakty kory były odpowiednio rozcieńczane, a następnie dodawano do roztworu DPPH o stężeniu molowym $1{,}268 \times 10^{-3}$M w określonej ilości. Próbki zostały pozostawione w zaciemnionym miejscu. Dla wszystkich badanych ekstraktów czas reakcji z rodnikiem DPPH nie przekraczał 40 minut. Intensywność integralną sygnału oznaczano przez dwukrotne całkowanie. Wszystkie oznaczenia były wykonane przynajmniej 3 razy dla każdego ekstraktu.

Wytwarzanie radioizotopu. Z uwagi na krótki okres półtrwania, jego wytwarzanie na miejscu umożliwiał generator radioizotopowy, czyli zestaw do sporządzania ^{99m}Tc-DMSA (produkcji amerykańskiej, Medi-Physics, Inc., Arlington Heights, Illinois).

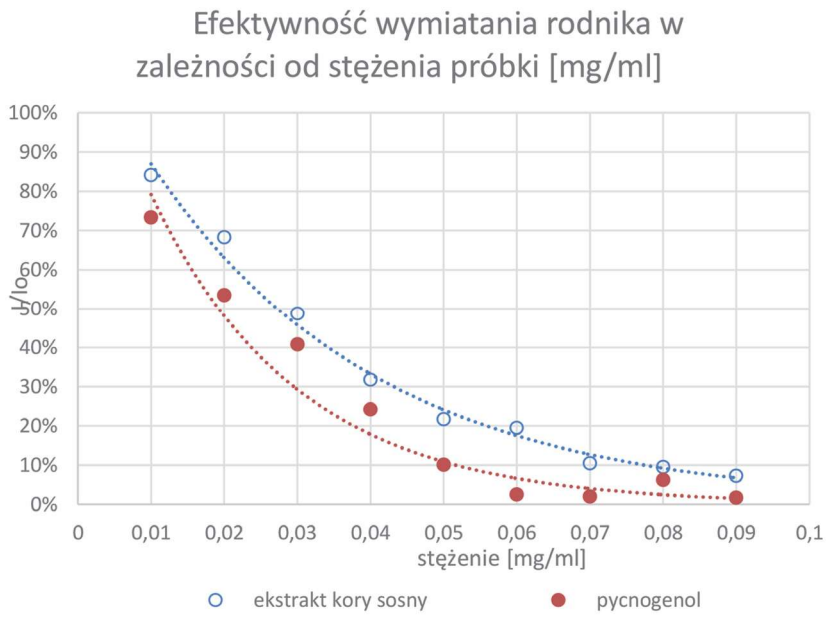
Hodowla tkankowa. Komórki nerki doskonale wychwytują kompleks ^{99m}TcDMSA. Do badania została zastosowana hodowla tkankowa komórek nerki małpy zielonej (*Aethiops sabeus* z rodzaju Cercopithecus), wyprodukowana przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Lublinie. Hodowle poddano inkubacji trwającej dwa dni, w temperaturze 37°C. Komórki GMK otrzymały czas na przyswojenie substancji, o potencjalnym działaniu ochronnym. Trzeciego dnia grupy hodowli podzielono na dwie podgrupy: poddane działaniu technetu (grupy T) i wzorcowe. Grupy T zostały przeniesione do pracowni radionuklidów, gdzie sporządzono roztwór ^{99m}Tc o określonej aktywności. Preparat z ^{99m}Tc-DMSA jest całkowicie jałowy i apirogenny. Do każdej probówki z grupy T dodano ww. roztwór w ilości 1 ml. Grupy T zostały poddane inkubacji przez okres 4 dni w temperaturze 37°C. Pozostałe grupy przeniesiono do boksu jałowego i dodano po 1 ml roztworu soli fizjologicznej, a następnie również poddano inkubacji przez 4 dni. W tym czasie komórki zostały poddane działaniu promieniowania γ z technetu, a ewentualne działania ochronne dodanych do hodowli substancji mogły modyfikować wielkość zmian popromiennych w hodowli. Nie wykonywano pomiarów radioaktywności poszczególnych próbek w trakcie inkubacji, ani po zakończeniu eksperymentu, gdyż proces rozpadu radionuklidu przebiega identycznie (zależy tylko od rodzaju radionuklidu, a nie od składu próbki). Po upływie 4 dni we wszystkich hodowlach przeprowadzono liczenie komórek, z wykorzystaniem komory Bürker'a.

Wyniki i dyskusja

Antyoksydacyjne działanie ekstraktów z kory sosnowej

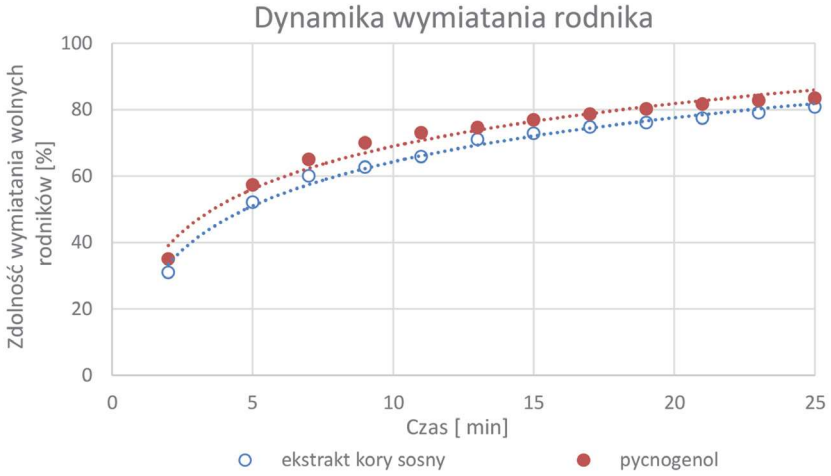
Trwały rodnik difenylopikrylohydrazylu (DPPH) wykorzystano w badaniach właściwości flawonoidów i tanin już w 1989 r. [16]. Testy właściwości antyrodnikowych ekstraktów z kory sosny z użyciem rodnika DPPH wykonano metodą EPR, rejestrując zmniejszenie intensywności sygnału pod wpływem dodatku badanych ekstraktów.

Rysunek 1 ilustruje efektywność wymiatania rodnika DPPH przez ekstrakt z kory sosny zwyczajnej oraz z sosny śródziemnomorskiej (preparat handlowy – Pycnogenol). Oba ekstrakty są podobnie skuteczne w wymiataniu rodnika, różnice są rzędu 10%. W celu szczegółowego porównania ich działania należałoby ustalić skład chemiczny obu preparatów, zarówno jakościowy jak i ilościowy.



Rysunek 1. Efektywność wymiatania rodnika DPPH w funkcji stężenia roztworu ekstraktu kory sosny (punkty bez wypełnienia) i Pycnogenolu (punkty z wypełnieniem).

Figure 1. The effectiveness of scavenging the DPPH radical as a function of pine bark extract solution concentration (points without filling) and Pycnogenol (points with filling).



Rysunek 2. Kinetyka reakcji rodnika DPPH ze związkami polifenolowymi w ekstrakcie kory sosny (punkty bez wypełnienia) oraz Pycnogenolu (punkty z wypełnieniem).

Figure 2. The kinetics of DPPH radical reaction with polyphenolic compounds in pine bark extract (points without filling) and Pycnogenol (points with filling).

Reakcja związków polifenolowych zawartych w ekstraktach z rodnikami DPPH trwa około 30 minut. Dynamikę wymiatania rodnika ilustruje Rysunek 2. Zarówno czas trwania reakcji, jak i efektywność wymiatania rodnika zależą od dostępności fenolowych grup OH dla rodnika. Należy spodziewać się, że wysoko molekularne katechiny będą reagować wolniej. Mechanizm reakcji spolimeryzowanych katechin z rodnikiem jest złożony i wymaga dalszych badań. Interesujące, że ekstrakt z kory sosny pospolitej okazał się prawie tak samo efektywny jak Pycnogenol – preparat opracowany przez duże zespoły naukowe z Francji i Szwajcarii.

Radioprotekcyjny efekt ekstraktów z kory sosnowej

Głównym celem badań było określenie zdolności radioprotekcyjnych ekstraktów z kory sosny *Pinus silvestris*, ale wykonano eksperymenty z dodatkiem pojedynczych związków katechiny i epikatechiny, a także katechiny z dodatkiem witaminy C. Dla porównania, oznaczono w identycznych warunkach właściwości radioprotekcyjne Pycnogenolu oraz ekstraktu z głogu i zielonej herbaty.

W badaniach zostało wykorzystane zjawisko wbudowywania się technetu w struktury komórek. Wykorzystano standaryzowane hodowle komórek GMK, które zostały odpowiednio przygotowane i potraktowane w procesie badawczym. Metoda zastosowana w pracy miała na celu ocenę przeżywalności komórek po zadziałaniu określonej dawki promieniowania jonizującego w obecności substancji mającej charakter radioprotekcyjny. Ilościowe zobrazowanie stopnia przeżywalności komórek umożliwiło oznaczenie ich liczby w hodowli do której dodano niewielkie dawki kompleksu ^{99m}TcDMSA. Tabela 1 zawiera liczby komórek zliczonych w kamerze (wartości średnie, wyliczone z 4 serii po 3 obliczenia na serię). Efekt radioprotekcyjny ilustruje Rysunek 3.

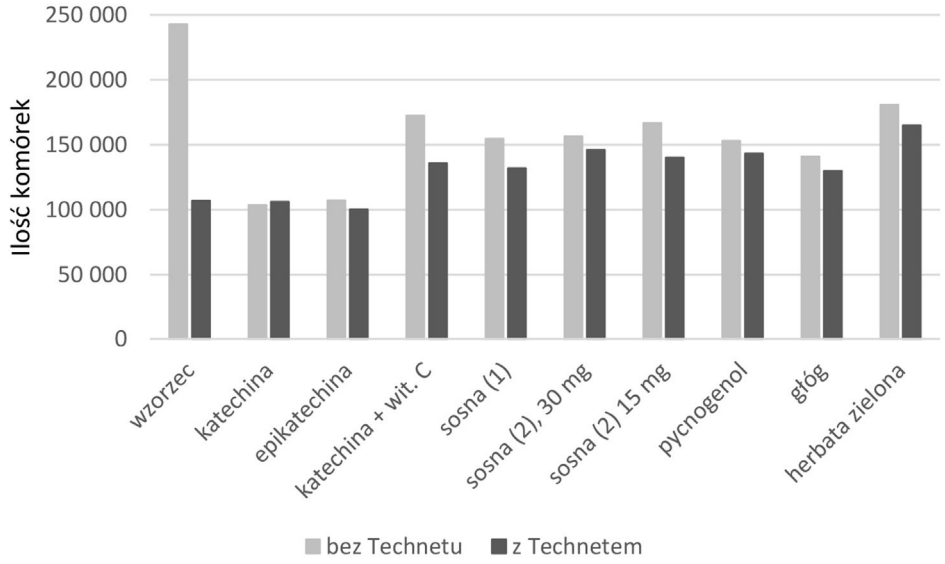
W hodowli wzorcowej z początkowej liczby prawie 250 tys. komórek po poddaniu jej promieniowaniu gamma z technetu zostało ok. 100 tys. (44%), a więc zginęła ponad połowa. Katechina ani epikatechina po podaniu ich do hodowli komórkowej nie zadziałały ochronnie, lepszy efekt obserwowano po dodaniu katechiny z witaminą C.

Warto zauważyć, że dodatek katechin i ekstraktów powoduje spadek przeżywalności komórek. Jest to naturalna odpowiedź na wprowadzenie do środowiska obcych związków, a w przypadku ekstraktów najprawdopodobniej związana z obecnością całego zestawu różnych związków. Niektóre z nich mogą być bardziej toksyczne (katechina i epikatechina) dla hodowli komórkowej, inne mniej, np. katechina z witaminą C.

Analiza danych pozwala stwierdzić, że przeżywalność komórek (wyrażona w procentach) jest zróżnicowana i zależna od zastosowanego radioprotektora. Interesujące, że naturalne ekstrakty z kory działają korzystniej niż pojedyncze związki.

Większą ochronę zapewniają ekstrakty, które w swym składzie zawierają cały zestaw przeciwutleniaczy, w tym także związki spolimeryzowane – procyjanidyny, taniny i wiele innych. Silniejszym właściwościom wymiatającym rodniki powinien towarzyszyć też lepszy efekt radioprotekcyjny.

Ekstrakty zawierające katechiny są w stanie chronić komórki przed reaktywnymi formami tlenu generowanymi na skutek ekspozycji na promieniowanie γ. Celowe byłoby powtórzenie eksperymentów z zastosowaniem innych metod oceny przeżywalności np. pomiarów aktywności dehydrogenazy mleczanowej lub poziomu ekspresji białka p53 i KI-67.



Rysunek 3. Ilości komórek zliczone w pomiarach właściwości ochronnych badanych ekstraktów.

Figure 3. The number of cells counted in the measurements of the protective properties of the tested extracts.

Tabela 1. Liczba komórek zliczona w kamerze (wartości średnie, dla 4 serii po 3 obliczenia na serię) poddanych napromienieniu z dodatkiem ekstraktów i związków katechinowych oraz bez tych dodatków (wzorzec).

Table 1. Number of cells counted in the camera (average values, for 4 runs, 3 counts per series) exposed to irradiation with and without the addition of extracts and catechins (standard).

Nr preparatu	badana próba	liczba komórek	badana próba + technet (Tc)	przeżywalność %
1	Wzorzec hodowla kontrolna	242 650	106 758	44
2	katechina	103 500	105 992	43,6
3	epikatechina	107 046	100 242	41,3
4	katechina + wit. C	172 213	135 700	56
5	sosna (1)	154 579	131 771	54,3
6	sosna (2), 30 mg	156 304	145 954	60,1
7	sosna (2) 15 mg	166 558	140 013	57,7
8	Pycnogenol	153 046	143 271	63
9	głóg	140 875	129 854	53,5
10	herbata zielona	180 454	164 929	68

Podsumowanie

Ekstrakty z kory sosny zwyczajnej oraz z sosny śródziemnomorskiej (Pycnogenol) są skuteczne w wymiataniu rodnika DPPH, różnice w efektywności są rzędu 10%. Zbadano zdolności radioprotekcyjne serii surowców zielarskich zawierających związki katechinowe, w tym ekstrakty z kory sosny zwyczajnej, sosny śródziemnomorskiej, głogu i zielonej herbaty. Przeżywalność komórek poddanych działaniu ^{99m}TcDMSA w podobnym stopniu (do 54-68%) zwiększają ekstrakty z kory sosnowej i zielonej herbaty. Kora sosny zwyczajnej *Pinus silvestris* może być źródłem cennych związków o właściwościach antyoksydacyjnych i radioprotekcyjnych.

Literatura

[1] Yang Z.-.F., Bai L.-.P., Huang W., Li X.-.Z., Zhao S.-.S., Zhong N.-.S., Jiang Z.-.H., Comparison of *in vitro* antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis, Fitoterapia, 2014, 93, s. 47-53.

[2] Yamaguchi K., Honda M., Ikigai H., Hara Y., Shimamura T., Inhibitory effects of (−)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), Antiviral Research, 2002, 53, s. 19-34.

[3] Weichmann F., Rohdewald P., Projected supportive effects of Pycnogenol® in patients suffering from multi-dimensional health impairments after a SARS-CoV2 infection, International Journal Antimicrobial Agents, 2020, 56(6), s. 106191-106200.

[4] Enseleit F., Sudano I., Périat D., Winnik S., Wolfrum M., Flammer A.J., Fröhlich G. M., Kaiser P., Hirt A., Haile S. R., Krasniqi N., Matter C. M., Uhlenhut K., Högger P., Neidhart M., Lüscher T. F., Ruschitzka F., Noll G., Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study, European Heart Journal, 2012, 33(13), s. 1589-1597.
[5] Ravindranathan P., Pasham D., Balaji U., Cardenas J., Gu J., Toden S., Goel A., Mechanistic insights into anticancer properties of oligomeric proanthocyanidins from grape seeds in colorectal cancer, Carcinogen, 2018, 39, s. 767-777.
[6] Rohdewald P., A review of the french maritime pine bark extract (Pycnogenol), an herbal medication with a diverse clinical pharmacology, International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2002, 40, s. 158-168.
[7] Jerez M., Pinelo M., Sineiro J., Nunez M. J., Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis, Food Chemistry, 2006, 94, s. 406-414.
[8] Harada M., Kan Y., Naoki H., Fukui Y., Kageyama N., Nakai M., Miki W., Kiso Y., Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested catechin and epicatechin, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1999, 63, s. 973-977.
[9] de Moraes Ramos F.M., Schönlau F., Novaes P.D., Manzi F.R., Bóscolo F.N., de Almeida S.M., Pycnogenol protects against Ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays, Phytotherapy Research, 2006, 20(8), s. 676-679.
[10] Uchida S., Ozaki M., Suzuki K., Mikio S., Radioprotective effects of (-)epigallocatechin 3-O-gallate (green tea tannin) in mice, Life Sciences, 1992, 50, s. 147-152.
[11] Lee H.J., Kim J.S., Moon C., Kim J.C., Lee Y.S., Jang J.S., Jo S.K., Kim S.H., Modification of gamma-radiation response in mice by green tea polyphenols, Phytotherapy Research, 2008, 22(10), s. 1380-1383.
[12] Andryskowski G., Niedworok J., Maziarz Z., Małkowski B., Protective effect of natura anthocyanin dye on experimental radiation sickness, Acta Poloniae Toxicologica, 1998, 6, s. 155-162.
[13] Andryskowski G., Niedworok J., Maziarz Z., Małkowski B., The effect of natura anthocyanin dye on superoxide radical generation and chemiluminescencje In animal after absorber 4Gy dose of gamma radiation, Polish Journal Environmental, 1998, 7(6), s. 355-357.
[14] O'Neill P., Al-Kazwini A.T., Fielden E.M., Adams G.E., Role of hydration in influencing radiation-induced damage of DNA at early times. Radiation Research: A Twentieth Century Perspective Vol. II, Academic Press, San Diego, 1992, s. 99-103.
[15] Oszmiański J., Bourzeix M., Preparation of catechin and procyanidin standards from hawthorn (*Crategus Azarolus* L.) and pine (Pinus mesogeensis fiesch) BARK, Polish Journal Food and Nutrition Sciences, 1995, 4/45(2), s. 89-96.
[16] Yoshida T., Mori K., Hatano T., Okumura T., Ueuhara I., Komagoe K., Fujita Y., Okuda T., Studies on Inhibition Mechanism of Antioxidation by Tannins and Flawonoids. V. Radical-Scavenging Effects of Tannins and Related Polyphenols on 1.1-Diphenyl-picrylhydrazyl Radical, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1989, 3, s. 1919-1921.

Do cytowania:
Goss M., Wawer I., Paradowska K., Radioprotekcyjne właściwości ekstraktów z kory sosny, Herbalism, 2022 1(8), s. 73-84.