

Proapoptozinis juodojo serbento (*Ribes nigrum* L.) uogų ekstraktų poveikis žiurkės širdies mitochondrijoms

Julius LIOBIKAS¹, Sonata TRUMBECKAITĖ¹, Vidmantas BENDOKAS²,
Danas BANIULIS², Daiva MAJIENĖ¹, Dalia Marija KOPUSTINSKIENĖ¹,
Tadeušas ŠIKŠNIANAS², Nijolė ANISIMOVIEŅĖ³

¹Kauno medicinos universiteto
Biomedicininų tyrimų institutas
Eivenių g. 4, Kaunas
El. paštas: ljulius@vector.kmu.lt

²Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institutas
Kauno g. 30, Babtai, Kauno r. sav.

³Botanikos institutas
Žaliųjų Ežerų g. 49, Vilnius

Santrauka

Antocianinai yra flavonoidų grupės pigmentai, randami uogose bei įvairiose daržovėse. Jie veikia kaip antioksidantai ir gali būti pritaikomi gydant oksidacinio streso sukeltas ligas. 2008 m. tirta juodojo serbento (*Ribes nigrum* L.) veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' trijų sunokimo laipsnių (nokimo pradžios, pusiau sunokusių ir techninės brandos) uogų ekstraktų antocianinų kiekybinė sudėtis ir poveikis žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimo rodikliams. Nustatyta, kad, nepriklausomai nuo serbentų veislės ir uogų sunokimo laipsnio, uogų ekstraktuose vyrauja trys antocianinai: cianidino 3-O-rutinozidas, delfinidino 3-O-rutinozidas ir delfinidino 3-O-gliukozidas. Didžiausi antocianinų sudėties pokyčiai buvo nustatyti tik veislės 'Ben Lomond' skirtingo sunokimo laipsnio uogų ekstraktuose. Nustatyta, kad tirti ekstraktai slopino žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimo greitį esant trečiaai metabolinei būsenai, o efekto dydis priklausė nuo serbentų veislės bei uogų sunokimo laipsnio. Taip pat antocianinų turtingi ekstraktai skatino citochromo *c* pašalinimą iš mitochondrijų. Šio proapoptozinio reiškinio priežastys ir mechanizmas dar nėra aiškūs, tad reikia tolesnių tyrimų.

Reikšminiai žodžiai: antocianinai, ekstraktas, izoliuotos žiurkės širdies mitochondrijos, oksidacinis fosforilimas, proapoptozinis poveikis, *Ribes nigrum* L., uogos.

Įvadas

Antocianinai – tai raudoną, violetinę ar mėlyną spalvą augalams suteikiantys flavonoidų grupės pigmentai, randami įvairiose uogose bei vaisiuose ir daržovėse /Havsteen, 2002/. Dėl savo cheminės sudėties antocianinai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, kurios naudingos gydant oksidacinio streso sukeltas ligas, pvz., vainikinių širdies kraujagyslių ligas arba vėžį /Kong et al., 2003; Zafra-Stone et al., 2007/. Nors antocianinų biologinio poveikio tyrimai atliekami jau seniai, tačiau dar nėra duomenų apie šių natūralių pigmentų tiesioginį poveikį mitochondrijoms.

Serbentų uogose identifikuota penkiolika įvairių antocianinų grupės junginių /Slimestad, Solheim, 2002/. Keturi pagrindiniai pigmentai – delfinidino bei cianidino 3-O-gliukozidai ir 3-O-rutinozidai – sudaro daugiau kaip 97 % visų antocianinų kiekio. Visų tirtų antocianinų rutinozidų kiekis yra didesnis, palyginti su gliukozidais, turinčiais tą pačią aglikono grupę. Nustatyta, kad nokstant uogoms bendras antocianinų kiekis didėja ir jų sudėtis kinta /Rubinskiene ir kt., 2004; 2008; Rubinskiene et al., 2005/. Nokimo pradžioje didžiausias kiekis yra delfinidino 3-O-rutinozido, o sunokusiose uogose dominuoja cianidino 3-O-rutinozidas. Nustatyta, kad terminio serbentų uogų apdorojimo metu cianidino 3-O-rutinozidas yra stabiliausias iš keturių pagrindinių antocianinų /Rubinskiene et al., 2005/.

Darbo tikslas – ištirti juodųjų serbentų veislių 'Joniniai' bei 'Ben Lomond' skirtingo sunokimo uogų antocianinų kiekybinę sudėtį ir ekstraktų, turtingų antocianinų, poveikį izoliuotų žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimo greičiui, esant skirtingoms metabolinėms būsenoms.

Sąlygos ir metodai

Tyrimų metu 2008 m. antocianinų turtingiems ekstraktams paruošti buvo panaudotos 2007 m. surinktos juodųjų serbentų veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' trijų sunokimo laipsnių uogos: I – nokimo pradžios, II – pusiau sunokusios ir III – techninės brandos. Surinktos uogos (po 100 g kiekvienos veislės) buvo užšaldytos ir laikomos $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Ekstraktai buvo paruošti pagal aprašytą metodiką /Liobikas ir kt., 2008/. Ekstraktai ruošti sutrintas serbentų uogas 16 val. inkubuojant vandeniniame 92 % metanolio tirpale, parūgštintame 0,1 N HCl, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje tamsoje, nuolat purtant. Ekstraktai nuo uogų likučių atskirti vakuuminės filtracijos būdu per 0,22 ir 0,12 μm porų skersmens membraninius filtrus („Millipore“, JAV) ir išgarinti vakuume, esant $+38\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai /Tian et al., 2006/. Gautuose uogų ekstraktuose bendras antocianinų kiekis nustatytas spektrofotometriškai pH diferenciniu metodu pagal absorbciją, esant 520 ir 700 nm bangos ilgiui, ir išreikštas cianidino 3-O-gliukozido kiekiu. Iš išgarintų ekstraktų paruošti vandeniniai ekstraktų tirpalai ('Joniniai': I – $0,0458\text{ mg ml}^{-1}$, II – $0,135\text{ mg ml}^{-1}$, III – $0,147\text{ mg ml}^{-1}$; 'Ben Lomond': I – $0,0482\text{ mg ml}^{-1}$, II – $0,548\text{ mg ml}^{-1}$, III – $0,748\text{ mg ml}^{-1}$) buvo užšaldyti ir laikomi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Antocianinų identifikavimas ir kiekybinė analizė buvo atlikta efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, naudojant cianidino 3-O-gliukozido (C-3-G), cianidino 3-O-rutinozido (C-3-R), delfinidino 3-O-rutinozido (D-3-R), delfinidino 3-O-gliukozido (D-3-G), malvidino 3-O-gliukozido (M-3-G), pelargonidino 3-O-gliukozido (Pel-3-G) ir peonidino 3-O-gliukozido (Peo-3-G) standartus („Extrasynthese“, Prancūzija, „Polyphenols Laboratories AS“, Norvegija) pagal aprašytą metodiką /Durst, Wrolstad, 2001/. Analizė atlikta chromatografu „Agilent 1200“ su diodų matricos detektoriumi (bangos ilgis – 520 nm) ir kolonėle „Eclipse XDB C18“ (4,6 x 150 mm) („Agilent Technologies Inc.“, Vokietija). Analizei naudotas judriosios fazės (A – 10 % acto rūgštis, 1 % ortofosforo rūgštis, B – acetonitrilas) gradientas: 0 min 95 % A, 5 min 95 % A, 20 min 75 % A, 25 min 55 % A, 27 min 95 % A ir 30 min 95 % A. Srauto greitis – 1 ml min^{-1} . Kolonėlės temperatūra $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$, injekcijos tūris – 20 μl . Prieš injekuojant ekstraktai praskiesti vandeniu (pH 2,0) santykiu 1:50.

Laboratorinių kamieno *Wistar* žiurkių patinėliai buvo įsigyti iš Biochemijos instituto vivariumo, kuriame jie yra laikomi pagal Europos konvencijos „Dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos“ reikalavimus. Eksperimentai buvo atliekami remiantis Lietuvos Respublikos valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos išduotu leidimu (Nr. 0006). Žiurkės širdies mitochondrijos buvo išskirtos diferencinio centrifugavimo metodu. Iš halotanu anestezuotos žiurkės išimta širdis buvo praplauta atšaldytu 0,9 % KCl tirpalu, perkirpta, pašalintas jungiamasis ir riebalinis audinys. Atšaldyta širdis buvo susmulkinta žirkulutėmis ir homogenizuota išskyrimo terpėje: 180 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA (pH 7,7 su KOH +4 °C temperatūroje). Po to homogenatas 5 min centrifuguotas 750 × g pagreičiu. Gautas supernatantas perkoštas ir centrifuguotas 10 min 6 800 × g pagreičiu. Po centrifugavimo mėgintuvėlio dugne nusėdusios mitochondrijos buvo suspenduotos terpėje, turinčioje 180 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,35 su KOH +4 °C temperatūroje), ir laikytos mėgintuvėlyje su ledais viso eksperimento metu.

Bendras širdies mitochondrijų suspensijos baltymų kiekis buvo nustatytas biuretometodu /Gornall et al., 1949/. Eksperimentų metu mitochondrijų baltymų koncentracija buvo 0,5 mg ml⁻¹. Mitochondrijų kvėpavimo greitis registruotas „BioMed“ oksimetrine sistema termostatuojamoje (+37 °C) stiklinėje kiuvetėje su įmontuotu Klarko tipo deguonies elektrodu. Matavimai atlikti terpėje, turinčioje 150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ (pH 7,2 su KOH +37 °C temperatūroje). Pagal oksimetrines kreives buvo apskaičiuotas deguonies sunaudojimo greitis esant antrai (oksiduojant 6 mM piruvo ir 6 mM obuolių rūgšties Na druskas) ir trečiai (esant terpėje 1 mM ADP) mitochondrijų metabolinėms būsenoms. Išoriniu citochromu *c* (35 μM) stimuliuotas kvėpavimo greitis ketvirtos metabolinės būsenos metu (esant 125 μM atraktilozido). Mitochondrijų kvėpavimo greitis išreikštas nmol O min⁻¹ mg⁻¹ mitochondrijų baltymų.

Rezultatai ir jų aptarimas

Palyginus kiekybinę juodųjų serbentų veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' uogų ekstraktų antocianinų sudėtį buvo pastebėta, kad, nepriklausomai nuo serbentų veislės ir uogų sunokimo laipsnio, vyrauja trys antocianinai: C-3-R, D-3-R ir D-3-G (lentelė). Iš jų didžiausią dalį sudarė C-3-R (apytiksliai 53–65 % visų identifikuotų antocianinų). Šie duomenys panašūs į kitų autorių paskelbus duomenis apie antocianinų kiekybinę sudėtį juodųjų serbentų uogose /Rubinskienė ir kt., 2004; 2008; Rubinskiene et al., 2005/.

Be keturių pagrindinių antocianinų, visuose uogų ekstraktuose dar buvo nustatytas ir M-3-G. Veislės 'Ben Lomond' II ir III sunokimo laipsnio uogų ekstraktuose buvo rasta Pel-3-G – atitinkamai 1,03 ± 0,028 bei 1,36 ± 0,034 mg ml⁻¹ – ir Peo-3-G – atitinkamai 0,08 ± 0,014 bei 0,13 ± 0,009 mg ml⁻¹. Bendras šių minorinių antocianinų kiekis sudarė mažiau kaip 1,7 ir 1,3 % bendro identifikuotų antocianinų kiekio atitinkamai II ir III sunokimo laipsnio veislės 'Ben Lomond' uogų ekstraktuose.

Dviejų tirtų serbentų veislių uogų ekstraktų antocianinų sudėties pokyčiai priklausė nuo uogų sunokimo laipsnio. Veislės 'Joniniai' II ir III sunokimo laipsnio uogų ekstraktuose bendras antocianinų kiekis padidėjo, palyginti su I sunokimo laipsnio uogų ekstraktu, tačiau atskirų antocianinų kiekio santykis pakito nežymiai. Didžiausi antocianinų sudėties ir kiekio santykio pokyčiai buvo nustatyti palyginus veislės

'Ben Lomond' I ir III sunokimo laipsnio uogų ekstraktus: antocianino D-3-R dalis padidėjo nuo 19,8 iki 31,6 %, D-3-G – nuo 9,2 iki 10,6 %, o C-3-R, C-3-G ir M-3-G sumažėjo atitinkamai nuo 64,5 iki 54,1 %, nuo 5,1 iki 2,3 % ir nuo 1,4 iki 0,5 % (1 pav.). Taip pat nustatyta, kad tik veislės 'Ben Lomond' II ir III sunokimo laipsnio uogų ekstraktuose buvo rastas nedidelis kiekis (mažiau kaip 1 % bendro identifikuotų antocianinų kiekio) Pel-3-G bei Peo-3-G. Šie kiekybiniai antocianinų sudėties skirtumai galbūt yra sąlygoti genetinių serbentų veislių skirtumų.

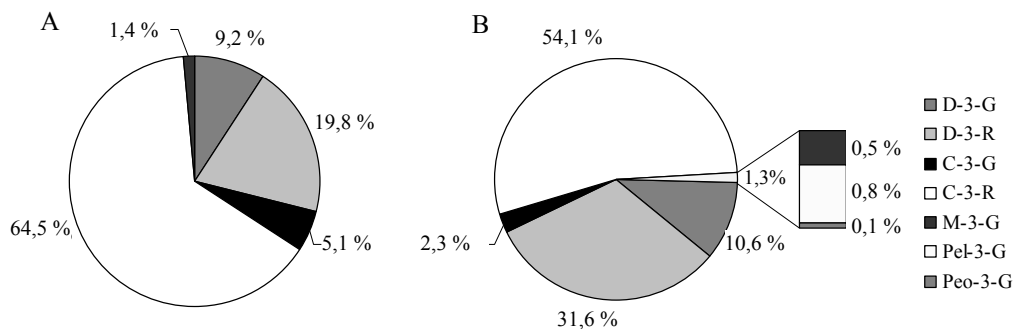
Lentelė. Antocianinų kiekis juodųjų serbentų veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' I, II bei III sunokimo laipsnio uogų ekstraktuose

Table. Anthocyanin content in extracts of black currant 'Joniniai' and 'Ben Lomond' berries of I, II and III degree of berry ripeness

Antocianinai Anthocyanin	Koncentracija / Concentration mg ml ⁻¹					
	'Joniniai'			'Ben Lomond'		
	I	II	III	I	II	III
D-3-G	1,18±0,004	3,26±0,005	2,98±0,072	2,70±0,004	15,60±0,643	18,50±0,368
D-3-R	2,19±0,004	4,28±0,005	4,22±0,077	5,85±0,011	31,52±0,985	54,99±0,991
C-3-G	0,48±0,000	1,28±0,003	1,13±0,025	1,50±0,003	4,21±0,145	4,06±0,057
C-3-R	6,36±0,006	13,11±0,020	13,01±0,239	19,01±0,025	59,84±1,352	94,03±1,224
M-3-G	0,09±0,005	0,30±0,002	0,35±0,008	0,42±0,010	0,75±0,020	0,82±0,021

Pastaba. Pateiktos rezultatų vidurkio ir vidutinio nuokrypio reikšmės.

Note. Results are presented as mean and standard deviation values.

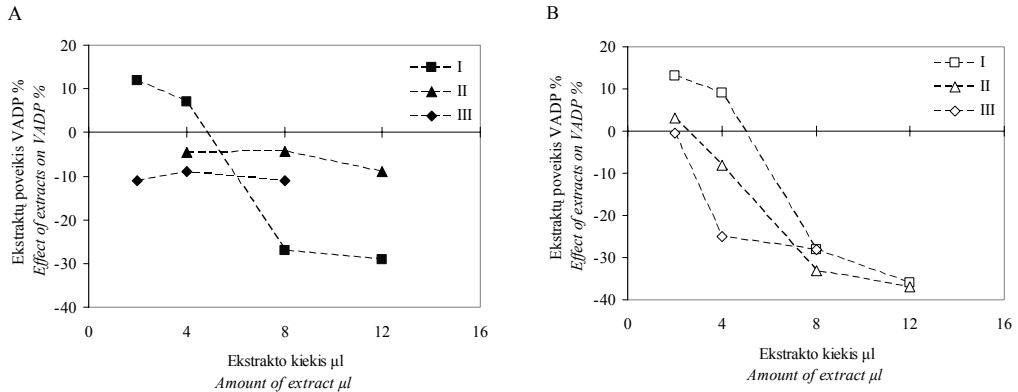


1 paveikslas. Antocianinų kiekio santykis juodųjų serbentų veislės 'Ben Lomond' I (A) ir III (B) sunokimo laipsnio uogų ekstraktuose

Figure 1. Comparison of anthocyanin relative quantity in black currant 'Ben Lomond' berry extracts of I (A) and III (B) degree of berry ripeness

Ištyrus juodųjų serbentų veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' trijų sunokimo laipsnių uogų antocianinų turtingų ekstraktų poveikį žiurkės širdies mitochondrijų funkcijai, pastebėtas žymus poveikis ADP stimuliuotam mitochondrijų kvėpavimo greičiui (trečia metabolinė būseną). Jo efektyvumas priklausė nuo serbentų veislės bei uogų sunokimo laipsnio (2 pav.). Veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' uogų I sunokimo laipsnio ma-

žiausias naudotas ekstrakto kiekis (2–4 μ l 1,5 ml matavimo terpės) 10 % padidino ADP stimuliuotą mitochondrijų kvėpavimo greitį. Didesnis antocianinų ekstrakto kiekis (8–12 μ l 1,5 ml) jau iki 27–36 % slopino šį kvėpavimo greitį. Veislės 'Ben Lomond' uogų II ir III sunokimo laipsnio ekstraktų didesnis kiekis (8–12 μ l 1,5 ml) stipriau slopino mitochondrijų kvėpavimo greitį trečios metabolinės būsenos metu, palyginti su veislės 'Joniniai' uogų II ir III sunokimo laipsnio ekstraktais.



Pastaba. Romėniški skaičiai nurodo skirtingus uogų sunokimo laipsnius: I – nokimo pradžia, II – pusiau sunokusios uogos ir III – techninė branda. Panašūs rezultatai buvo gauti 2–3 skirtingų eksperimentų metu.

Note. Roman numerals indicate the different degrees of berry ripeness: I – onset of ripening, II – half-ripe and III – ripe berries. Similar results were obtained in 2–3 different experiments.

2 paveikslas. Juodųjų serbentų veislių 'Joniniai' (A) ir 'Ben Lomond' (B) trijų sunokimo laipsnių uogų antocianinų turtingų ekstraktų poveikis žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimo greičiui trečios metabolinės būsenos metu

Figure 2. Effect of anthocyanin-rich extracts from black currant varieties 'Joniniai' (A) and 'Ben Lomond' (B) berries on the State 3 respiration rate of rat heart mitochondria

Kiekybiniai antocianinų sudėties skirtumai serbentų įvairių veislių uogų ekstraktuose, matyt, sąlygojo ir nevienodą ekstraktų tiesioginį poveikį žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimo greičiui *in vitro*. Būtina pastebėti, kad didžiausi antocianinų ekstraktų poveikio mitochondrijų kvėpavimo greičiui, esant trečiai metabolinei būsenai, skirtumai buvo gauti tiriant tik veislės 'Joniniai' uogų (trijų sunokimo laipsnių) ekstraktus. Akiivaizdu, kad I sunokimo laipsnio uogų ekstraktoje buvo 2,9–3,2 karto mažiau antocianinų (išreikškus C-3-G kiekio ekvivalentu) nei pusiau sunokusių ar techninės brandos uogų ekstraktuose (žr. skyrių „Sąlygos ir metodai“). I sunokimo laipsnio uogų ekstraktas (8–12 μ l) pasižymėjo labai stipriai, net iki 30 %, ADP stimuliuoto mitochondrijų kvėpavimo greičio slopinimu. Veislės 'Ben Lomond' skirtingo sunokimo laipsnio uogų ekstraktų mitochondrijų kvėpavimo greitį trečios metabolinės būsenos metu slopinantis poveikis stiprėjo didinant ekstraktų kiekį ir didėjant antocianinų kiekiui ekstraktuose.

Siekiant išsiaiškinti, kokie veiklieji junginiai slopina mitochondrijų funkciją, buvo ištirtas chemiškai gryno etaloninio C-3-G (pagal kurį buvo standartizuoti pagaminti ekstraktai) poveikis mitochondrijų funkcijai. Nustatyta, kad C-3-G vandeninis tirpalas, turintis 1,0–60,0 μ g C-3-G 1,5 ml matavimo terpės, priešingai nei juodųjų serbentų

ekstraktai, neturėjo poveikio mitochondrijų kvėpavimo greičiui trečios metabolinės būsenos metu. Tai rodo, kad poveikį mitochondrijoms gali sąlygoti kiti juodųjų serbentų uogų ekstrakto randami antocianinai, pvz., C-3-R, D-3-R, D-3-G ir kt. Be to, negalima atmesti prielaidos, kad mitochondrijas gali veikti ir kiti neidentifikuoti polifenoliniai junginiai.

Mitochondrijų išorinės membranos intaktiškumui įvertinti buvo atliktas citochromo *c* testas: mitochondrijoms perėjus į ketvirtą metabolinę būseną, į matavimo terpę buvo pridėta egzogeninio citochromo *c* /Toleikis et al., 2005/. Nustatyta, kad tiek veislės 'Joniniai', tiek 'Ben Lomond' uogų visų trijų sunokimo laipsnių antocianinų ekstraktai (priklausomai nuo panaudoto jų kiekio) 10–110 % padidino išoriniu citochromu *c* stimuliuotą mitochondrijų kvėpavimo greitį ketvirtos metabolinės būsenos metu. Didžiausią poveikį citochromo *c* išsiskyrimui iš mitochondrijų turėjo abiejų veislių II sunokimo laipsnio uogų ekstraktai (58 % – 'Joniniai', 58–110 % – 'Ben Lomond'), tačiau veislės 'Ben Lomond' uogų ekstraktų poveikis visais atvejais (esant ir I, ir II, ir III sunokimo laipsniams) buvo ryškesnis nei veislės 'Joniniai'. Eksperimentų metu tirtas etaloninis C-3-G tirpalas minėto poveikio neturėjo. Taigi, šių tyrimų metu nustatytas svarbus ir įdomus faktas, kad tirtų juodųjų serbentų veislių ekstraktai sukėlė citochromo *c* išsiskyrimą iš mitochondrijų. Citochromas *c* yra mitochondrijų kvėpavimo grandinės komponentas. Tačiau, negrįžtamai sutrikdžius mitochondrijų energijos gamybos funkciją, citochromas *c* (kartu su kitais specifiniais mitochondrijų tarpmembranės erdvės baltymais) yra išskiriamas į citozolį ir tada prasideda ląstelės žūtis apoptozės būdu /Garrido et al., 2006; Ow et al., 2008/. Literatūroje nėra duomenų apie antocianinų ar jų aglikonų poveikį izoliuotų mitochondrijų funkcijoms. Yra tik keletas darbų, kuriuose aprašomas antocianinų aglikonų poveikis mitochondrijoms įvairiose žmogaus vėžinių ląstelių linijose /Lazze et al., 2004; Yeh, Yen, 2005/. Šių darbų autoriai nustatė, kad delfinidinas sukėlė hepatomos HepG₂, gimdos karcinomos HeLa S3 bei gaubtinės žarnos adenokarcinomos CaCo-2 ląstelių apoptozę. Apoptozės būdu žūstančioms ląstelėms buvo būdinga žymiai sumažėjęs mitochondrijų membraninis potencialas, efektorinės trečiosios kaspazės fragmentų susidarymas bei padidėjęs aktyvumas, taip pat padidėjusi proapoptozinio baltymo *Bax* raiška ir tarpnukleosominės DNR fragmentacija bei poli-(ADP ribozės) pirmosios polimerazės proteolizė. Pažymėtina, kad proapoptozinis poveikis būdingas ir kitiems flavonoidų grupės fenoliniams junginiams. Nustatyta, kad apigeninas, kvercetas, miricetas ir kempferolis sukelia leukemijos HL-60 ląstelių mitochondrijų membraninio potencialo sumažėjimą bei citochromo *c* išsiskyrimą iš mitochondrijų, dėl to prasideda devintosios prokaspazės brendimas, o po to aktyvėja trečiosios kaspazės veikla /Wang et al., 1999/. Kiti autoriai nurodo, kad kvercetas sukėlė izoliuotų žiurkės inkstų žievės mitochondrijų membraninio potencialo sumažėjimą, slopino adenino nukleotidų nešiklio veiklą ir sužadino nespecifinio pralaidumo poros atsidarymą bei citochromo *c* išsiskyrimą /Ortega, Garcia, 2009/. Be to, kvercetas tiesiogiai pažeidė mitochondrijų išorinę membraną. Taigi, apibendrinus negausius literatūros duomenis ir juos palyginus su šių tyrimų metu gautais rezultatais, galima teigti, kad juodųjų serbentų uogų antocianinų ekstraktai sukelia ADP stimuliuoto mitochondrijų kvėpavimo greičio slopinimą. Šio poveikio priežastys yra ne tik citochromo *c* išsiskyrimas iš mitochondrijų, bet ir antocianinų sąlygotas mitochondrijų kvėpavimo grandinės

slopinimas. Taip pat negalima atmesti prielaidos, kad antocianinai slopina adenino nukleotidų nešiklio veiklą.

Ištyrus juodųjų serbentų veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiui, esant antrai metabolinei būsenai (t. y. nesant ADP), nustatyta, kad tirti uogų (visų trijų sunokimo laipsnių) ekstraktai nepadidino mitochondrijų kvėpavimo greičio antros metabolinės būsenos metu, t. y. neatskyrė oksidacijos bei fosforilinimo procesų ir nekeitė mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo protonams. Etaloninis C-3-G tirpalas taip pat nedidino mitochondrijų kvėpavimo greičio antros metabolinės būsenos metu. Ankstesnių Lietuvos tyrėjų darbų /Trumbeckaite et al., 2006; 2007/ duomenimis, kai kurie kiti flavonoidai – rutinas, kvercitrinas, kvercetas ir hiperozidas (priklausomai nuo jų koncentracijos) – stimuliuoja mitochondrijų kvėpavimo greitį esant antrai metabolinei būsenai (t. y. atskiria mitochondrijų oksidacijos bei fosforilinimo procesus) ir slopina mitochondrijų kvėpavimo greitį trečios metabolinės būsenos metu. Flavonoidų turtingas propolis slopino abu minėtus rodiklius /Majiene et al., 2006/. Įvairiapusis skirtingų klasių flavonoidų poveikis galėtų būti susijęs su jų cheminės sudėties ypatumais (flavonoidai kvercetas ir jo dariniai yra flavonolių klasės, propolyje randamas chrizinas – flavonų, pinocembrinas – flavononų, o galanginas – flavonolių). Skirtingas poveikis mitochondrijų kvėpavimo rodikliams galėtų būti susijęs su flavonoidų cheminės sudėties ypatumais. Be to, kaip rodo Biochemijos laboratorijoje atlikti tyrimai, kelių veikliųjų junginių poveikis ne visada sumuojasi /Trumbeckaite et al., 2007/, priešingai – viena veiklioji medžiaga gali slopinti ar net visai sustabdyti kitos veikliosios medžiagos veikimą.

Išvados

1. Nustatyta, kad, nepriklausomai nuo juodųjų serbentų veislės ir uogų sunokimo laipsnio, uogų ekstraktuose vyrauja antocianinai C-3-R, D-3-R ir D-3-G. Didžiausi antocianinų sudėties pokyčiai būdingi veislės 'Ben Lomond' skirtingo uogų sunokimo laipsnio ekstraktams.

2. Juodųjų serbento veislių 'Joniniai' ir 'Ben Lomond' trijų sunokimo laipsnių uogų antocianinų ekstraktai nekeitė izoliuotų žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimo greičio antros metabolinės būsenos metu. Pastebėtas žymus antocianinų ekstraktų poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiui esant trečiajai metabolinei būsenai, o efektyvumas priklausė nuo serbentų veislės bei uogų sunokimo laipsnio.

3. Serbentų uogų antocianinų turtingi ekstraktai skatina citochromo *c* išsiskyrimą iš žiurkės širdies mitochondrijų ir pasižymi proapoptoziniu poveikiu.

Padėka

Tyrimą parėmė Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas pagal Pramoninės biotechnologijos plėtros programos projektą „Vaisiniai augalai – natūralių antocianinų producentai“ (Nr. N-07015).

Gauta 2009 06 10
Pasirašyta spaudai 2009 07 20

LITERATŪRA

1. Durst R. W., Wrolstad R. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC // Current protocols in food analytical chemistry. – New York, 2001, p. F1.3.1–F1.3.13
2. Garrido C., Galluzzi L., Brunet M. et al. Mechanisms of cytochrome *c* release from mitochondria // Cell Death and Differentiation. – 2006, vol. 13, p. 1423–1433
3. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // Journal of Biological Chemistry. – 1949, vol. 177, p. 751–766
4. Havsteen B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids // Pharmacology and Therapeutics. – 2002, vol. 96, p. 67–202
5. Yeh C. T., Yen G. C. Induction of apoptosis by the anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-Terminal kinase cascade in hepatoma cells // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005, vol. 53, p. 1740–1749
6. Kong J. M., Chia L. S., Goh N. K. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins // Phytochemistry. – 2003, vol. 64, p. 923–933
7. Lazze M. C., Savio M., Pizzala R. et al. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines // Carcinogenesis. – 2004, vol. 25, No. 8, p. 1427–1433
8. Liobikas J., Liegiūtė S., Majienė D. ir kt. Skirtingų *Ribes nigrum* veislių uogų ekstraktų, turtingų antocianinų, antimikrobinis aktyvumas // Sodininkystė ir daržininkystė. – 2008, t. 27, Nr. 4, p. 59–66
9. Majiene D., Trumbeckaite S., Savickas A. et al. Influence of propolis water solution on heart mitochondrial function // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2006, vol. 58, No. 5, p. 709–713
10. Ortega R., García N. The flavonoid quercetin induces changes in mitochondrial permeability by inhibiting adenine nucleotide translocase // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2009, vol. 41, No. 1, p. 41–47
11. Ow Y. L. P., Green D. R., Hao Z. et al. Cytochrome *c*: functions beyond respiration // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2008, vol. 9, p. 532–542
12. Rubinskiene M., Jasutiene I., Venskutonis P. R. et al. HPLC determination of the composition and stability of blackcurrant anthocyanins // Journal of Chromatography Science. – 2005, vol. 43, p. 478–482
13. Rubinskienė M., Viškelis P., Jasutienė I. ir kt. Antocianinai ir jų kitimas juodųjų serbentų uogose bei produktuose // Sodininkystė ir daržininkystė. – 2004, t. 23, Nr. 4, p. 9–21
14. Rubinskienė M., Viškelis P., Stanys V. ir kt. Juodųjų serbentų cheminės sudėties ir fizikinių savybių pokyčiai uogoms nokstant // Sodininkystė ir daržininkystė. – 2008, t. 27, Nr. 4, p. 73–80
15. Slimestad R., Solheim H. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.) // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002, vol. 50, No. 11, p. 3228–3231
16. Tian Q., Giusti M. M., Stoner G. D. et al. Characterization of new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry // Food Chemistry. – 2006, vol. 94, p. 465–468
17. Toleikis A., Trumbeckaite S., Majiene D. Cytochrome *c* effect on respiration of heart mitochondria: influence of various factors // Bioscience Reports. – 2005, vol. 25, No. 5–6, p. 387–397
18. Trumbeckaite S., Bernatoniene J., Majiene D. et al. Effect of *Ginkgo biloba* extract on the rat heart mitochondrial function // Journal of Ethnopharmacology. – 2007, vol. 111, No. 3, p. 512–516

19. Trumbeckaitė S., Bernatoniene J., Majiene D. et al. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2006, vol. 60, No. 5, p. 245–248

20. Wang I. K., Lin-Shiau S. Y., Lin J. K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells // *European Journal of Cancer*. – 1999, vol. 35, No. 10, p. 1517–1525

21. Zafra-Stone S., Yasmin T., Bagchi M. et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention // *Molecular Nutrition and Food Research*. – 2007, vol. 51, No. 6, p. 675–683

ISSN 1392-3196

Zemdirbyste-Agriculture, vol. 96, No. 3 (2009), p. 149–157

UDK 634.23:547.56:547.973:576.8

Pro-apoptotic effect of black currant (*Ribes nigrum* L.) berry extracts on rat heart mitochondria

J. Liobikas¹, S. Trumbeckaitė¹, V. Bendokas², D. Baniulis², D. Majienė¹,
D. M. Kopustinskienė¹, T. Šikšnianas², N. Anisimovienė³

¹Institute for Biomedical Research of Kaunas University of Medicine

²Lithuanian Institute of Horticulture

³Institute of Botany

Summary

Anthocyanins are pigments from the group of flavonoids found in berries and various vegetables. Due to antioxidant activity they could be useful for treatment of diseases caused by the oxidative stress. In this work, the quantitative composition of anthocyanins in different berries, and the effect of anthocyanin-rich extracts on the rat heart mitochondrial functions were investigated in 2008. The berries of black currant (*Ribes nigrum* L.) varieties 'Joniniai' and 'Ben Lomond' with three degrees of berry ripeness (I – onset of ripening, II – half-ripe, and III – ripe) were used in these studies. The results showed that three anthocyanins: cyanidin-3-O-rutinoside, delphinidin-3-O-rutinoside and delphinidin-3-O-glucoside dominated in all anthocyanin-rich black currant berry extracts, irrespective of the variety and the degree of berry ripeness. Furthermore, the maximum changes in the composition of anthocyanins were found only in extracts from 'Ben Lomond' berries with different degree of berry ripeness. It was shown that extracts suppressed the state 3 respiration rate of rat heart mitochondria. The extent of this effect was dependent on the currant variety and the degree of berry ripeness. Moreover, the anthocyanin-rich extracts stimulated the release of cytochrome *c* from mitochondria. Reasons and a molecular mechanism of such a pro-apoptotic effect have not been defined and need further experimental studies.

Key words: anthocyanins, extract, isolated rat heart mitochondria, oxidative phosphorylation, pro-apoptotic effect, *Ribes nigrum* L., berries.