

INFLUENȚA UNOR PRODUȘI POLIFENOLICI NATURALI ASUPRA RESPIRAȚIEI CELULARE

THE INFLUENCES OF SOME POLYPHENOLIC COMPOUNDS UPON CELLULAR RESPIRATION

NEACȘU ION¹, ROTINBERG PINCU², GHERGHEL DANIELA²,
MIHAI COSMIN², COTEA V. VALERIU³,
ZĂNOAGĂ CRISTINEL², NICULAUA MARIUS³

¹Filiala Iași a Academiei Române – Centrul de Cercetări pentru Oenologie

²Institutul de Cercetări Biologice Iași

³Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Iași

Abstract. *Influence of two polyphenolic fractions – methanolic one (PMF) and ethanolic another (PEF) – extracted from the leaves of medicinal plant Asclepias syriaca upon cellular respiration was studied. Experiments were performed in vitro on the cells from liver, striated muscle sartorius and stomachal smooth muscle of frog (Rana ridibunda, Pall.), determining the cellular oxygen consumption by Warburg micromanometric method. Polyphenol effects are different, depending on the nature of used fraction and cellular type. So, after 90 minutes of experiment, on liver, the both polyphenolic fractions stimulate cellular respiration, compared to that of control, untreated batch; on striated muscle PMF inhibits and PEF stimulates respiratory processes; and on stomach muscle, inverse effects are evidenced: PMF stimulates and PEF slightly inhibits cellular respiration. Results highlight the specific action of these polyphenolic agents upon cellular respiration and on energetic metabolism processes, permitting estimation of their useful pharmacological properties, as well.*

Diferite cercetări au semnalat prezența polifenolilor în diferite organe ale unor vegetale, și în special în flori, fructe și frunze [1], precum și în sucuri, must și vin [2, 16]. De asemenea, s-au consemnat și o serie de aspecte privind proprietățile bioactive ale polifenolilor din diferite extracte vegetale, cum sunt în special cele care se manifestă la nivel celular, exprimate prin acțiuni membranotrope, bioelectrice, bioenergetice [3, 4, 9, 12, 13], metabolice [15], antioxidante și hepatoprotectoare [16], antitumorale [12-15] sau de modulatori redox [6, 16].

Pentru evidențierea unor aspecte caracteristice ale acțiunii unor agenți polifenolici naturali la nivelul celulelor animale, în prezenta lucrare am studiat efectele specifice asupra respirației celulare, determinate de două tipuri de extracte polifenolice vegetale, la trei categorii de celule animale – celule hepatice, musculare striate și musculare netede, având în vedere corelațiile dintre intensitatea consumului de oxigen și energetica celulară [6, 7] și îmbogățirea tabloului de date privind proprietățile farmacologice utile ale produșilor polifenolici studiați, precum și explicarea unor aspecte ale mecanismului efectelor lor.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a urmărit dinamica intensității consumului respirator de oxigen la trei categorii de celule animale, sub influența a două tipuri de preparate polifenolice extrase și purificate din frunzele plantei medicinale *Asclepias syriaca* – fracția metanolică (FMP) și cea etanolică (FEP) – în doze de 1,5 mg substanță uscată/mL soluție fiziologică Ringer normală (RN).

Experimentele s-au desfășurat *in vitro* pe trei serii de preparate tisulare de broască (*Rana ridibunda*, Pall.) reprezentate de fragmente de ficat (FIC), mușchi striat sartorius (MS) și mușchi neted de stomac (ST), precis cântărite și incubate în vasul de respirație în soluție fiziologică Ringer, pură sau conținând agenții studiați, la temperatură constantă de 20 °C. Fiecare serie experimentală s-a desfășurat pe câte trei loturi de câte cinci preparate din același țesut: un lot de control (martor) netratat, menținut în RN fără agenți, un lot tratat cu FMP și altul tratat cu FEP, în concentrații de câte 1,5 mg substanță uscată/mL RN. Consumul respirator de oxigen s-a determinat prin metoda micromanometrică Warburg [11] la un volum constant, timp de 90 de minute, citirea valorilor manometrice și calculul consumului de oxigen făcându-se la intervale de 15–30 minute.

Rezultatele au fost exprimate în $\text{mm}^3 \text{ O/g țesut/h}$ și au fost calculate statistic conform testului Student, prin raportare la cantitatea de țesut proaspăt analizat (g) și la lotul de control, netratat cu polifenoli.

Pentru aprecierea compoziției fracțiilor polifenolice studiate s-a înregistrat spectrul lor de absorbție în UV. Spectrele au fost trasate cu ajutorul unui spectrometru UV-Vis Analitic Jena UV-Vis 200 PC cu un slit (fanta de lumină) de 5 nm și o viteză de scanare de 1 nm/s, raportarea făcându-se la apă, în cuve de 2 mm din cuarț. Masa uscată a fost dizolvată în apă și apoi s-a filtrat printr-un filtru de nylon steril de 0,45 μm .

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din rezultatele obținute se constată o reactivitate respiratorie a țesuturilor studiate, față de acțiunea produșilor polifenolici, diferită în funcție de tipul de țesut, natura fracțiilor polifenolice și intervalele de timp la care s-au realizat măsurătorile consumului celular de oxigen.

Astfel, la **țesutul hepatic**, de la lotul de control, netratat, se înregistrează o reducere treptată a intensității consumului de oxigen pe durata de 90 de minute, de la 1,773 $\text{mm}^3 \text{ O/g/h}$ (100%), până la 0,919 $\text{mm}^3 \text{ O/g/h}$ după 90 de minute (51,8%), aceasta reprezentând dinamica normală a respirației celulare hepatice în condițiile noastre experimentale (tab. 1), diminuarea intensității respirației fiind cel mai probabil datorată reducerii rezervelor energetice celulare *in vitro*.

La tratarea preparatelor hepatice cu fracțiile polifenolice se înregistrează o dinamică a respirației celulare diferită, în funcție de natura fracției studiate (Tabelul 1). Astfel, fracția metanolică (FMP) induce o creștere treptată în timp a intensității consumului de oxigen, pe când fracția etanolică (FEP) determină, chiar de la începutul măsurătorilor, o reducere a consumului respirator de oxigen, care se menține pe toată durata experimentului. Dar, raportând valorile loturilor tratate la cele ale lotului martor din fiecare moment al măsurătorilor, considerate ca

100%, se constată că, de fapt, ambele fracții polifenolice stimulează respirația, comparativ cu lotul de control netratat (tab. 1). Efectul de stimulare este însă diferențiat în funcție de natura agenților polifenolici. Astfel, FMP induce o stimulare mai timpurie (la 30 de minute) și mai puternică, la 90 de minute respirația fiind mai intensă cu 154% decât cea de la martor, iar la FEP stimularea este mai târzie (min. 60) și mai slabă (cu 60,2%), acest aspect fiind semnat și într-o lucrare anterioară [9].

Tabelul 1

Dinamica intensității respirației celulare ($\text{mm}^3 \text{O}_2/\text{g/h}$) sub influența agenților polifenolici la ficat, mușchi striat și mușchi neted

Țesut	Agent	Indici	Durata (minute)			
			15 ($\pm\%$ C)	30 ($\pm\%$ C)	60 ($\pm\%$ C)	90 ($\pm\%$ C)
Ficat (FIC)	Control (C)	$\bar{X}$	1,773 (100%)	1,628 (100%)	1,061 (100%)	0,919 (100%)
		$\pm\text{ES}$	0,613	0,458	0,283	0,144
		CV%	37,374	32,908	39,268	34,997
	FMP	$\bar{X}$	1,492 (-15,9)	1,996 (+22,6)	2,398* (+126,0)	2,335* (+154,1)
		$\pm\text{ES}$	0,084	0,497	0,391	0,452
		CV%	13,820	30,992	39,396	43,317
	FEP	$\bar{X}$	1,580 (-10,9)	1,435 (-11,9)	1,531* (+44,3)	1,472* (+60,2)
		$\pm\text{ES}$	0,328	0,380	0,408	0,320
		CV%	40,981	34,991	35,431	38,622
Mușchi (MS)	C	$\bar{X}$	1,912 (100%)	2,340 (100%)	1,839 (100%)	1,172 (100%)
		$\pm\text{ES}$	0,046	0,231	0,144	0,271
		CV%	5,414	27,810	17,489	25,324
	FMP	$\bar{X}$	2,190 (+14,7)	1,646 (-29,7)	1,376 (-25,2)	0,943 (-19,6)
		$\pm\text{ES}$	0,369	0,488	0,382	0,293
		CV%	37,732	36,388	32,100	29,730
	FEP	$\bar{X}$	1,776 (-7,2)	1,980 (-15,4)	1,780 (-3,2)	1,842* (+57,1)
		$\pm\text{ES}$	0,445	0,338	0,109	0,131
		CV%	36,088	38,272	13,766	15,917
Stomac (ST)	C	$\bar{X}$	0,738 (100%)	1,197 (100%)	1,101 (100%)	0,990 (100%)
		$\pm\text{ES}$	0,150	0,099	0,023	0,038
		CV%	45,601	18,534	4,702	8,596
	FMP	$\bar{X}$	1,570* (+112,7)	1,895* (+58,3)	1,690* (+53,5)	1,618* (+63,4)
		$\pm\text{ES}$	0,110	0,161	0,166	0,145
		CV%	15,699	19,017	22,064	22,068
	FEP	$\bar{X}$	0,967 (+31,0)	0,890 (-25,7)	0,835 (-24,2)	0,896 (-9,5)
		$\pm\text{ES}$	0,236	0,199	0,125	0,146
		CV%	34,781	43,347	33,634	36,521

$\bar{X}$ = valoarea medie; ES = eroarea standard; CV = coeficientul de variabilitate; C = control (martor); FMP = fracția metanolică a polifenolilor; FEP = fracția etanolică a polifenolilor; * = semnificativ față de C

La **mușchiul striat**, dinamica respirației prezintă unele aspecte diferite față de cea de la ficat (tab. 1). Astfel, la lotul de control, netratat, respirația înregistrează o intensificare la minutul 30, cu 22,4% față de minutul 15 ($1,912 \text{ mm}^3 \text{O/g/h}$; 100%), după care se reduce treptat, ca și în cazul ficatului, până la $1,172 \text{ mm}^3 \text{O/g/h}$ (cu 38,4% față de minutul 15) la minutul 90.

Tratamentul mușchiului striat cu FMP determină o dinamică descendentă a valorilor consumului respirator de oxigen, de la 2,190 mm³ O/g/h la minutul 15, până la 0,943 mm³ O/g/h (cu 56,9% față de min. 15), după 90 de minute de experiment. Comparativ cu valorile de la lotul martor (100%) se constată că FMP induce o inhibare moderată a proceselor respiratorii cu 29,7% la minutul 30 și cu 19,6% la minutul 90, deși inițial (la minutul 15) are loc o ușoară stimulare a respirației (cu 14,7%).

Fracția etanolică (FEP) are însă un efect invers față de cea metanolică (FMP), determinând o diminuare a intensității respirației celulare în primele 60 de minute (cu 3,2–15,4% față de control), urmată de o stimulare (cu 57,1%) după 90 de minute.

Se constată astfel că reactivitatea celulelor musculare striate la acțiunea fracțiilor polifenolice este diferită de cea a celulelor hepatice, datorită caracteristicilor lor structural-funcționale, cele musculare fiind celule excitabile, contractile, iar cele hepatice fiind de tip metabolic [6].

Celulele de **mușchi neted** stomacal prezintă o dinamică respiratorie mai diversă la acțiunea agenților polifenolici (tab. 1), având unele asemănări atât cu celulele musculare striate, cât și cu hepatocitele, dar și deosebiri față de acestea. Astfel, la lotul de control, spre deosebire de ficat și mușchiul striat, condițiile experimentale *in vitro* impun o intensificare a respirației celulare pe toată perioada măsurărilor, după 90 de minute consumul de oxigen fiind cu 34,1% mai intens decât la 15 minute.

Fracția metanolică prezintă un efect respirator destul de asemănător cu cel de la ficat, dar deosebit față de cel de la mușchiul striat, impunând o creștere a intensității respirației celulare pe toată durata determinărilor, mai accentuată în prima fază, cu 112,7% față de martor, după 15 minute și moderată ulterior (cu 63,4% după 90 de minute).

Fracția etanolică provoacă un efect diferit, având doar o slabă asemănare cu cel de la mușchiul striat, impunând o ușoară intensificare respiratorie după 15 minute (cu 31% față de martor), urmată de o depresie pe toată perioada determinărilor, la 90 de minute scăderea fiind cu 9,5% față de control (tab. 1).

Se observă astfel că celulele musculare netede stomacale prezintă o reactivitate diferită la acțiunea fracțiilor polifenolice, comparativ cu cele striate, deși sunt tot celule excitabile contractile. Ele prezintă însă unele deosebiri structural-funcționale față de cele striate, exprimate în special printr-un automatism bioelectric și contractil care determină o activitate contractilă ritmică, ceea ce implică și unele particularități metabolice diferite de alte tipuri celulare [6] și, ca urmare, un metabolism energetic diferit, ce impune un anumit dinamism al proceselor respiratorii celulare.

În același sens este explicabil și răspunsul respirator al celulelor hepatice, care reprezintă sediul unor procese metabolice multiple, ce implică un anumit consum de oxigen în cadrul proceselor ciclului Krebs al respirației celulare aerobe [6, 7].

Comparând valorile consumului respirator de oxigen la loturile martor, se constată însă că țesutul muscular striat prezintă o intensitate mai mare a respirației celulare, care se corelează cu procesele fosforilării oxidative, generând un bilanț energetic superior [6, 7].

Acțiunea fracțiilor polifenolice asupra celor trei tipuri de celule investigate interferează cu procesele respirației aerobe ale acestora și, implicit, cu procesele energetice, corelate cu reacțiile de oxidoreducere și de fosforilare oxidativă din cadrul ciclului Krebs [6, 7], efectele fiind în funcție de caracteristicile tipului celular și natura polifenolilor analizați.

De altfel, efecte caracteristice ale celor două tipuri de fracții polifenolice au fost semnalate și asupra metabolismului intermediar glucidic, lipidic și protidic al celulelor tumorale, corelate cu o stimulare a respirației celulare și cu proprietățile lor citostatice [3, 5, 8, 9, 12-15].

Diferențele dintre efectele celor două tipuri de fracții polifenolice derivă din compoziția chimică diferită, evidențiată și de spectrele lor de absorbție în UV. Din spectrul UV-Vis se poate observa existența unei zone de emisie continuă care se datorează unei fluorescențe destul de pronunțate pe întreaga domeniul UV. Natura spectrală a acestor extracte alcoolice, care sunt puternic fluorescente (până la patru unități de absorbantă), indică faptul că ei nu sunt de tip antocianic, ci înclină mai mult spre compuși de tip polifenolchinolici.

O analiză mai detaliată a unor fracții similare a evidențiat diferențele de compoziție chimică dintre ele, prin determinarea spectrofotometrică a polifenolilor, conținutul total fiind exprimat în acid galic (0,76 g/L), datele fiind cuprinse în tabelul 2 [5].

Tabelul 2

Compoziția fracțiilor polifenolice

Compușii	Fracția metanolică	Fracția etanolică
Polifenoli totali	19%	20%
Flavone	10%	12–15%
Catechine	2%	2,5%
Antociani	9%	10%

Prin cromatografie în strat subțire s-au evidențiat: rutin, cvercitol (flavone), glucoză, manoză, acid palmitic, stearic, linolic, linolenic și arahidonic, precum și substanțe steroidale (β -sistosterol, heterozide arahidonice) în proporții diferite, în cele două fracții [5].

O astfel de compoziție chimică explică efectele biologice multiple ale agenților polifenolici și diferențele dintre diferitele fracții studiate și, totodată, justifică o continuare a cercetărilor în vederea stabilirii proprietăților lor farmacologice și a mecanismului specific de acțiune.

CONCLUZII

Fracțiile polifenolice extrase din frunzele de *Asclepias syriaca* influențează în mod specific intensitatea respirației celulare, stimulând sau inhibând consumul celular de oxigen în funcție de natura fracției (metanolică sau etanolică) și tipul celulelor (hepatice, musculare striate sau musculare netede) studiate.

Rezultatele indică interferența agenților polifenolici cercetați cu procesele metabolismului intermediar și energetic celular și permit aprecierea proprietăților farmacologice utile ale acestor compuși.

BIBLIOGRAFIE

1. Bodea C. (coord), 1965 - *Tratat de biochimie vegetală*. vol II, Ed. Academiei Române, București, 768, 784
2. Cotea V. D., 1985 - *Tratat de oenologie*, vol. I. Ed. Ceres, București, 224-250
3. Crăciun V., Crăciun M., Agrigoroaei Ș., Neacșu I., Rotinberg P., Kelemen S., 1995 - *The specific action of some polyols and polyphenolic fractions on the $Na^+ - K^+ - ATP$ -ase activity*. Rev. Roum. Biol.-Biol. Anim., **40**, 2, 141-144
4. Gonzales-Lebrero R. M., Kaufman S. B., Garrahan P. J., Rossi R. C., 2003 - *The sidedness of the direct route of occlusion of K^+ in the $Na^+/K^+ - ATPase$* . Ann. N.Y. Acad. Sci., 986, 301-303
5. Grănescu M., 2004 - *Interacțiunea unor noi bioproduși cu celula eucariotă normală și tumorală. Teză de doctorat*, Univ. "Al. I. Cuza" Iași
6. Karp G., 1996 - *Cell and Molecular Biology*. John Wiley and Sohns Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 177-205, 675
7. Lehninger A. L., 1987 - *Biochimie*, vol. II. Ed. Tehnică, București, 473-503
8. Neacșu I., Agrigoroaei Ș., Crăciun V., Crăciun M., Rotinberg P., Kelemen S., Nuță V., Oiță N., 1996 - *Bioelectrical effects of some polyolic and polyphenolic compounds in normal medium conditions*, Rev. Roum. Biol.-Biol. Anim., **41**, 2, 165-169
9. Neacșu I., Rotinberg P., Gherghel D., Mihai C., Gireadă O., 2004 - *Influența unor produși polifenolici asupra respirației celulare la ficatul de broască*. Bul. Soc. Nat. Biol. Cel., **32**, 190
10. Nenițescu C. D., 1968 - *Chimie chimie organică*, ed. a 6-a, vol. II. Ed. Didactică și Pedagogică, București, 24
11. Nuță G., Bușneag C., 1977 - *Investigații biochimice*. Ed. Didactică și Pedagogică, București, 283-286
12. Rotinberg P., Gherghel D., Neacșu I., Rotinberg H., Mihai C., 2004 - *The interference of some active cytostatic autochthonous polyphenolic biopreparations with membranary $Na^+ - K^+ - ATP$ -ase activity of the tumoral cells*. Anal. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, s. Genet. și Biol. Molec., **V**, 44-50
13. Rotinberg P., Neacșu I., Gherghel D., Grănescu M., Mihai C., 2005 - *Reactivitatea respirației celulare la celulele tumorale sub acțiunea unor noi agenți citostatici de natură polifenolică*. Bul. Soc. Nat. Biol. Cel., **33**, 197
14. Rotinberg P., Gherghel D., Neacșu I., Rotinberg H., Mihai C., 2004 - *Effect of some active cytostatic vegetable extracts of polyphenolic nature upon membrane bioelectric potential of tumoral cells*. Anal. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, s. Genet. și Biol. Molec., **V**, 51-56
15. Rotinberg P., Gherghel D., Grănescu M., Mihai C., Neacșu I., Hefco V., Rotinberg H., 2005 - *The reactivity of the metabolic processes of the Hep-2p tumoral cells to the action of some active cytostatic biopreparations of polyphenolic nature*. Anal. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, s. Genet. și Biol. Molec., **VI**, 75-82
16. Ursini F., Sevanian A., 2002 - *Wine polyphenols and optimal nutrition*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 957, 200-209