

JOANNA TOMCZYK, ANNA OLEJNIK, KATARZYNA KOWALSKA,
WOJCIECH BIAŁAS, WŁODZIMIERZ GRAJEK

OCENA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ EKSTRUDATÓW FASOLOWO-KUKURYDZIANYCH WZGLĘDEM NOWOTWOROWYCH KOMÓREK NABŁONKA JELITOWEGO

Streszczenie

Przedmiotem pracy było określenie właściwości cytotoksycznych i genotoksycznych ekstrudatów fasolowo-kukurydzianych (EFK) wytworzonych z fasoli odmiany Red Kidney względem nowotworowych komórek nabłonka jelitowego Caco-2 i HT-29 MTX. W celu odzwierciedlenia warunków panujących *in vivo* badany produkt poddano działaniu czynników trawiennych i mikroflory jelitowej, symulując jego pasaż przez przewód pokarmowy. Potencjał cytotoksyczny EFK przed i po procesie trawienia określano poprzez oznaczenie szybkości proliferacji komórek metodą hemocytometryczną oraz przeżywalności komórek testem MTT. Ponadto zbadano wpływ EFK na stopień uszkodzeń DNA komórek nabłonka jelitowego stymulowanych i niestymulowanych H₂O₂. Wyniki doświadczeń wykazały silną aktywność antyproliferacyjną EFK zależną od jego stężenia. Wyznaczone dawki IC₅₀ dla Caco-2 i HT-29 MTX wynosiły odpowiednio 9,24 i 3,55 % (m/v). Trawienie EFK w sztucznym przewodzie pokarmowym, z wydłużonym czasem oddziaływania mikroflory jelitowej, spowodowało znaczny wzrost aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek HT-29 MTX. Wyniki testu kometowego wykazały, że EFK nie indukuje uszkodzeń DNA w komórkach jelitowych, lecz ma działanie ochronne wobec oksydacyjnych uszkodzeń DNA generowanych przez 100 μM H₂O₂ w komórkach HT-29 MTX.

Słowa kluczowe: ekstrudat fasolowo-kukurydziany, fasola Red Kidney, cytotoksyczność, Caco-2, HT-29 MTX

Wprowadzenie

W ostatnich latach większą uwagę zwraca się na prozdrowotne oddziaływanie spożywanych produktów. Prowadzone badania ukierunkowuje się na wyjaśnianie istoty oddziaływań na organizm człowieka substancji biologicznie aktywnych dostarczanych wraz z pożywieniem. Jednak ze względu na ograniczony dostęp do ludzkiego

Mgr inż. J. Tomczyk, dr inż. A. Olejnik, mgr K. Kowalska, dr inż. W. Białas, prof. dr hab. W. Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

przewodu pokarmowego dominują badania modelowe na zwierzętach lub kulturach komórkowych *in vitro* [4]. Wśród wielu linii komórkowych stosowanych do oceny przeciwnowotworowego oddziaływania składników pokarmowych najczęściej wykorzystywane są komórki przewodu pokarmowego, bezpośrednio ekspozowane na spożywane substancje [7, 8]. Z tego względu w przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano komórki nowotworowe nabłonka jelitowego Caco-2 i HT-29 MTX.

Przedmiotem zainteresowania w odniesieniu do żywności jest wiele jej składników o zdefiniowanych właściwościach biologicznych. Polifenole występujące w owocach i warzywach, ze względu na ich aktywność antyoksydacyjną, stanowią grupę składników poddawanych obszernym badaniom *in vitro*. Bogatym źródłem związków polifenolowych są nasiona roślin strączkowych. W odmianach fasoli o kolorowych nasionach dominują skondensowane taniny (proantocyjanidyny) oraz antocyjanidyny – cyjanidyna i delfinidyna zlokalizowane przede wszystkim w okrywkach nasiennych. Wśród flawonoidów w ekstrakcie z nasion czerwonej fasoli stwierdzono obecność kwercetyny i jej glikozydowych pochodnych oraz kamferolu [9]. Badania Remiszewskiego i Kulczaka [15] oraz Remiszewskiego i wsp. [16] potwierdzają dominujący udział kwercetyny zarówno w wymienionym surowcu, jak i w półproduktach na poszczególnych etapach obróbki technologicznej. Poza tym autorzy wskazują na obecność w fasoli odmiany Red Kidney również luteoliny oraz kwasów fenolowych [10, 15]. Bogactwo związków polifenolowych o wysokiej aktywności przeciwutleniającej w odmianach fasoli o kolorowych nasionach świadczy o potencjalnych możliwościach ich wykorzystania do ochrony przed stresem oksydacyjnym oraz w prewencji chorób nowotworowych.

W dotychczasowych badaniach *in vitro* dowiedziono, że wymienione składniki istotnie spowalniają proces nowotworzenia poprzez wiele mechanizmów, m.in. przez bezpośredni udział w reakcjach unieczynniania wolnych rodników, ale także w sposób bardziej złożony: poprzez oddziaływanie na białka zaangażowane w regulowanie procesów proliferacji i apoptozy [12] czy modulowanie aktywności enzymów kluczowych przy detoksykacji kancerogenów [3, 20].

Wiele prowadzonych analiz dotyczy związków fenolowych występujących w czystej postaci, niezwiązanych z matrycą substancji. Z uwagi na to, że składniki te są związane w materiale roślinnym i rzadko występują jako aglikony, natomiast częściej tworzą formy glikozydowe [13], a ponadto po obróbce technologicznej i przedostaniu się do przewodu pokarmowego ulegają licznym przemianom, większego znaczenia nabierają badania z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych bądź surowców wyjściowych [16]. Biorąc pod uwagę te uwarunkowania, w badaniach usiłuje się odtworzyć warunki panujące w naturze, poprzez poddanie odpowiednich próbek procesom imitującym trawienie jelitowe.

Celem przedstawionej pracy było określenie oddziaływania ekstrudatów fasolowo- kukurydzianych (EFK) z mączki wytworzonej z nasion fasoli odmiany Red Kidney i mąki kukurydzianej zmieszanych w proporcji 1 : 1. na wzrost i aktywność metaboliczną jelitowych komórek nowotworowych linii Caco-2 i HT-29 MTX w hodowlach *in vitro* oraz genotoksyczności EFK i jego ewentualnych właściwości ochronnych przed oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA komórek Caco-2 i HT-29 MTX indukowanymi H₂O₂.

Material i metody badań

Przygotowanie produktu

Przedmiotem badań były ekstrudaty otrzymane z mąki fasolowej (fasola kolorowa odmiany „Red Kidney”) po fermentacji bakteryjnej (*Lactobacillus plantarum* T-106) z dodatkiem mąki kukurydzianej w stosunku 1:1. Ekstrudaty otrzymano z Zakładu Fermentacji i Biosyntezy Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Ogólna zawartość polifenoli oznaczona metodą Folina-Ciocaltau’a według metody Singletona i Rossiego [18] wyrażona w przeliczeniu na mg kwasu galusowego wynosiła 2,44 (± 0,09) mg/g produktu. Aktywność przeciwutleniająca badanych ekstrudatów oznaczona wobec ABTS* (2,2’-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) według metody Re i wsp. [14] wyrażona w przeliczeniu na mg Troloxu wynosiła 10,74 (± 0,12) mg Tx/g produktu.

Przygotowanie ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego do badań polegało na jego zmieleniu, następnie zawieszeniu w pożywce do hodowli komórkowych, wytrząsaniu w temperaturze 37 °C przez 20 min, wirowaniu (3000 x g, 10 min) i filtracji przez membranę o porowatości 0,22 µm (Millipore).

Przedmiotem badań były również ekstrudaty poddawane *in vitro* procesom imitującym przebieg trawienia *in vivo*. Symulację trawienia w żołądku prowadzono przez dodanie pepsyny (P7000, Sigma) w ilości 300 U/ml oraz obniżenie pH do wartości 2,0 za pomocą 1 M HCl. Ten etap trawienia prowadzono przez 4 h w temp. 37 °C. Ruchy perystaltyczne imitowano poprzez mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego. W celu symulacji drugiego etapu trawienia, zachodzącego w jelicie cienkim, pH podnoszono do wartości 6,0, stosując 1M NaHCO₃ i dodawano 10 ml ekstraktu trzustkowo-jelitowego (0,02 g ekstraktu trzustkowego - P1750 Sigma, 0,12 g soli żółciowych – B8381 Sigma, 0,1 M NaHCO₃). Następnie pH podnoszono do 7,4 przez dodanie 1M NaHCO₃ i wprowadzano wystandaryzowaną mikroflorę jelitową (10⁶ jtk/ml treści pokarmowej) wyizolowaną z kału ludzkiego. Proces prowadzono przez 2 h w temp. 37 °C. W celu symulacji pasażu produktu przez jelito grube pH podnoszono do 8,0 za pomocą 2 M NaHCO₃ i dalsze trawienie prowadzono w warunkach beztlenowych przez 18 h.

Ekstrakt uzyskany w wyniku trawienia *in vitro* filtrowano przez membranę o porowatości 0,22 μm (Millipore) i rozcieńczano w pożywce przeznaczonej do hodowli komórkowych.

Hodowla komórek Caco-2 i HT-29 MTX

Komórki nowotworowe linii Caco-2 i HT-29 MTX, pochodzące z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC), hodowano na płytkach 24-dołkowych o powierzchni 1,9 cm^2 /dołek (Nunc) w 1 ml pożywki DMEM (D 6429, Sigma), zawierającej 1-procentowy dodatek niezbędnych aminokwasów (M7145, Sigma), wzbogaconej w inaktywowaną (56 $^{\circ}\text{C}$, 30 min) płodową surowicę bydlęcą (10106-169, Gibco) w ilości 10 % w przypadku HT-29 MTX oraz 20 % w przypadku Caco-2. Testowane kultury komórkowe hodowano w temp. 37 $^{\circ}\text{C}$, w atmosferze 5 % CO_2 i 95 % przez 72 h.

Badanie cytotoksyczności produktu w stosunku do komórek Caco-2 i HT-29 MTX

Przygotowane roztwory EFK przed i po trawieniu *in vitro* wprowadzono do 24-godzinnych hodowli komórek Caco-2 i HT-29 MTX założonych przy inokulum wynoszącym odpowiednio: $0,5 \times 10^5$ kom/ cm^2 i $0,25 \times 10^5$ kom/ cm^2 ($9,50 \times 10^4$ kom/ml i $4,75 \times 10^4$ kom/ml). Ekspozycję kultur na badane produkty prowadzono przez 48 h w standardowych warunkach hodowli. Bezpośrednio po zakończeniu hodowli określano gęstość komórek i ich aktywność metaboliczną.

Gęstość komórek Caco-2 i HT-29 MTX oznaczano metodą hemocytometryczną, natomiast ich aktywność metaboliczną za pomocą testu MTT, w którym wykorzystuje się reakcję redukcji żółtych rozpuszczalnych w wodzie soli tetrazolowych do purpurowego nierozpuszczalnego formazanu, prowadzoną przez dehydrogenazę mitochondrialną. Zdolność do metabolizowania substratu mają tylko żywe, aktywne metabolicznie komórki, a ich liczba jest proporcjonalna do intensywności powstałego zabarwienia, mierzonego jako absorbancja przy długości fali 570 nm.

Do oceny toksyczności EFK w stosunku do nowotworowych komórek Caco-2 HT-29 MTX zastosowano model matematyczny w postaci funkcji [21]:

$$Y_{obl.} = \frac{Y_{max.}}{\left(1 + \left(\frac{[C]}{IC_{50}}\right)^s\right)} + Y_{min.}$$

gdzie: $Y_{min.}$ i $Y_{max.}$ to odpowiednio minimalna i maksymalna wartość liczbowa badanej cechy estymowana przez wyznaczony model, IC_{50} odpowiada stężeniu EFK powodującego 50 % redukcję aktywności metabolicznej komórek (punkt przegięcia krzywej), podczas gdy s wyznacza nachylenie krzywej. Poprawne wyznaczenie wielkości licz-

bowych poszczególnych współczynników w modelu, ze względu na jego nieliniowy charakter, wymagało zastosowania tzw. metod iteracyjnych, spośród których najbardziej efektywna okazała się metoda Quasi-Newtona. Wszystkie obliczenia wykonano w programach MS Excel 2003 i Statistica 6.0 PL.

Dawki IC₅₀ stanowiące stężenie EFK, przy którym następuje 50 % zmniejszenie aktywności enzymów mitochondrialnych badanych komórek wyznaczano na podstawie wymienionego wyżej modelu matematycznego.

Badanie wpływu EFK na poziom uszkodzeń DNA w komórkach Caco-2 i HT-29 MTX

W badaniach wpływu EFK na poziom jednoniciowych uszkodzeń DNA komórek Caco-2 i HT-29 MTX wykorzystano elektroforezę pojedynczych komórek zwaną testem kometowym. Analizowano wpływ 24-godzinnej ekspozycji wymienionych komórek nabłonka jelitowego na EFK w stężeniach odpowiadających wyznaczonym dawkom IC₅₀.

Po inkubacji monowarstwę komórek przemywano buforem fosforanowym (PBS/pH 7,4) i poddawano procesowi trypsynizacji przy użyciu roztworu trypsyno-wersenu (T4049, Sigma). Komórki po trypsynizacji przemywano buforem PBS o temp. 4 °C i zawieszano w takiej objętości PBS, aby gęstość komórek wynosiła 1×10⁶ komórek/ml. Zawiesinę komórek o objętości 60 µl dodawano do 150 µl płynnej 0,5-procentowej agarozy o niskiej temperaturze topnienia i nakrapiano po 60 µl na szkiełka pokryte 1-proc. agarozą o normalnej temperaturze topnienia. Następnie przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiano przez 10 min w temp. 4 °C. Po zestaleniu agarozy szkiełka nakrywkowe usuwano, a szkiełka podstawowe z komórkami zanurzano w buforze lizującym (100 mM EDTA, 5,5 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 % Triton X-100/pH 10) i inkubowano przez 1 h. w temp. 4 °C. Po lizie szkiełka umieszczano na 30 min w aparacie elektroforetycznym wypełnionym buforem do elektroforezy (300 mM NaOH, 1 mM EDTA/pH>13) o temp. 4 °C. Następnie prowadzono elektroforezę przy napięciu 230 V przez 40 min, w temp. 4 °C. Po elektroforezie szkiełka płukano kolejno wodą i buforem neutralizującym (0,4 M TRIS/pH 7,5), po czym w celu odwodnienia zanurzano na 5 min w 70-procentowym etanolu.

DNA komórek po elektroforezie wybarwiano barwnikiem SYBRGold (Molecular Probes) i analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Zeiss Axiovert 200. Wyniki opracowano za pomocą programu komputerowego CometScore™. Do analizy brano pod uwagę minimum 80 komórek z każdej próby. Stopień uszkodzeń DNA wyrażano poprzez procentową zawartość DNA w ogonie komety.

W celu określenia ochronnych właściwości EFK przed oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA, komórki Caco-2 i HT-29 MTX były preinkubowane przez 24 h z EFK w stężeniach stanowiących IC₅₀, a następnie poddawane działaniu stresu oksydacyjnego.

go. Stres oksydacyjny generowano za pomocą 100 μM H_2O_2 w temp. 4 °C przez 30 min. Test kometowy prowadzono według metody opisanej powyżej.

Do każdego z doświadczeń przygotowano próby kontrolne, które stanowiły komórki hodowane w standardowej pożywce niezawierającej ekstraktu z EFK.

Analiza statystyczna

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a prezentowane wyniki badań stanowią ich średnią arytmetyczną. Do oszacowania poziomu istotności różnic między próbami wykorzystano testy t-Studenta i Tukey'a. Analizę statystyczną wyników badań wykonano za pomocą programu Statistica 6.0 PL.

Wyniki i dyskusja

Wpływ EFK na wzrost i przeżywalność komórek Caco-2 i HT-29 MTX

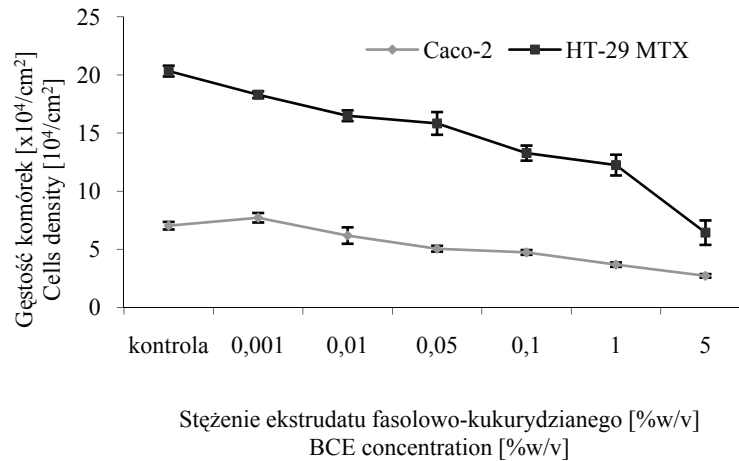
W doświadczeniach wykorzystano młode kultury komórek Caco-2 i HT-29 MTX będące w fazie wzrostu logarytmicznego. Analiza gęstości hodowli po 48 h ekspozycji na EFK wykazała, że dodatek EFK do hodowli komórek nowotworowych jelita grubego linii Caco-2 i HT-29 MTX spowodował ograniczenie proliferacji komórek w sposób zależny od stężenia (rys. 1). Komórki linii Caco-2 wykazały większą tolerancję na obecność EFK w pożywce hodowlanej. O ile EFK w stężeniach 0,001 i 0,01 % (m/v) nie wpływał na wzrost komórek wymienionej linii w sposób statystycznie istotny, to inhibicja wzrostu komórek HT-29 MTX następowała już przy najmniejszej dawce EFK wynoszącej 0,001 % (m/v). Większą wrażliwość komórek HT-29 MTX na obecność EFK w pożywce potwierdzono również przy najwyższym badanym stężeniu. EFK w ilości 5 % (m/v) spowodował 70-proc. ograniczenie gęstości komórek HT-29 MTX oraz 60-proc. spadek stężenia komórek Caco-2 w stosunku do prób kontrolnych.

Działanie antyproliferacyjne EFK w stosunku do nowotworowych komórek nabłonka jelitowego znalazło odzwierciedlenie w ograniczeniu ich aktywności metabolicznej, co zostało wykazane w teście MTT. Uzyskane wyniki sygnalizują możliwość hamowania wzrostu komórek nowotworowych przy użyciu EFK.

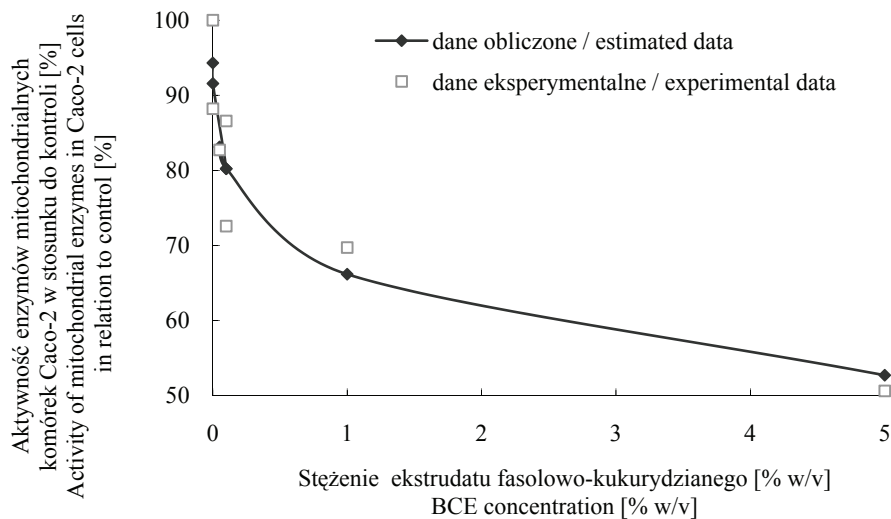
Wyniki analizy MTT jako względne wartości aktywności enzymów mitochondrialnych w komórkach eksponowanych na EFK w stosunku do próby kontrolnej przedstawiono na rys. 2. i 3.

Na podstawie danych doświadczalnych oraz przy użyciu modelu matematycznego przedstawionego w podrozdziale *Badanie cytotoksyczności produktu w stosunku do komórek Caco-2 i HT-29 MTX*, wyznaczono dawki IC_{50} wyrażające stężenia EFK, przy których następowało 50-proc. obniżenie aktywności enzymów mitochondrialnych. Obliczone dawki IC_{50} dla komórek Caco-2 i HT-29 MTX wynosiły odpowiednio 9,24

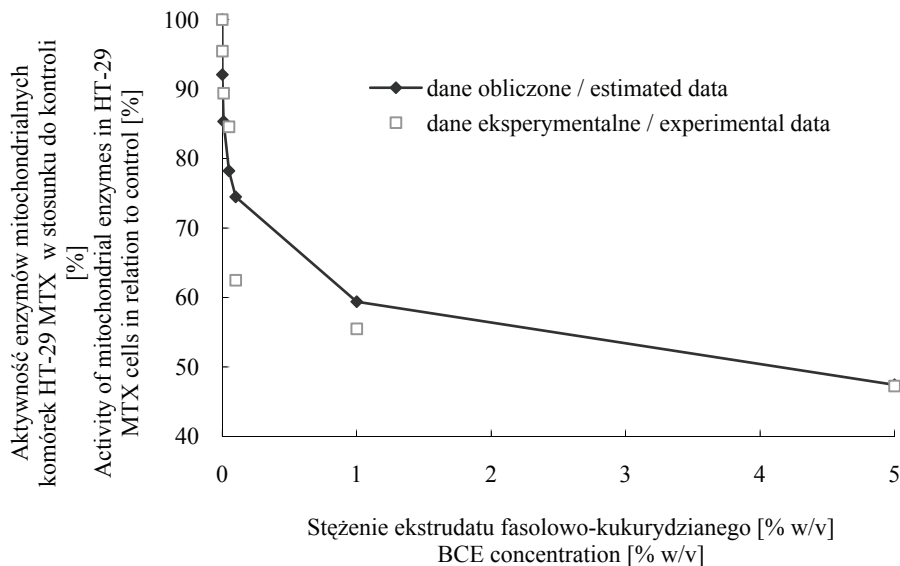
i 3,55 % (m/v), co również wskazuje na większą podatność komórek linii HT-29 MTX na cytotoksyczne działanie EFK.



Rys. 1. Wpływ ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego na wzrost komórek Caco-2 i HT-29 MTX.
Fig. 1. Effect of bean-corn extrudate (BCE) on the growth of Caco-2 and HT-29 MTX cells.



Rys. 2. Aktywność mitochondrialna komórek Caco-2 hodowanych w obecności ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego (EFK).
Fig. 2. Activity of mitochondrial enzymes in Caco-2 cells cultured in the presence of bean-corn extrudate (BCE).



Rys. 3. Aktywność mitochondrialna komórek HT-29 MTX hodowanych w obecności ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego (EFK).

Fig. 3. Mitochondrial enzymes activity in HT-29 MTX cells cultured in presence of bean-corn extrudate (BCE).

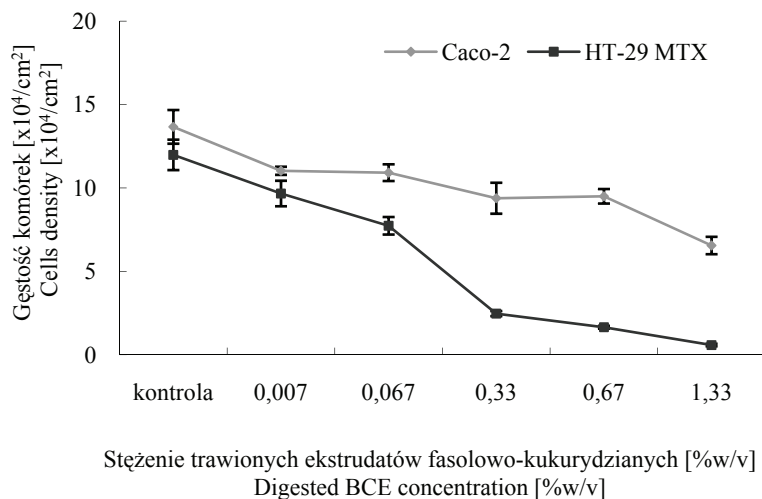
Aktywność cytotoksyczna EFK po trawieniu in vitro

Trawienie EFK w sztucznym przewodzie pokarmowym przeprowadzono w dwóch wersjach różniących się czasem oddziaływania mikroflory jelitowej w końcowej fazie procesu. W pierwszej procedurze trawienie *in vitro* zakończono na etapie jelita cienkiego, poddając EFK 2-godzinemu działaniu bakterii kałowych. W drugiej procedurze trawienie wydłużono o 18-godzinną ekspozycję na działanie mikroflory jelitowej, mającą imitować przejście treści pokarmowej przez jelito grube.

Uwzględniając funkcjonalne i strukturalne podobieństwo komórek Caco-2 do komórek nabłonka jelita cienkiego oraz właściwości kultur komórkowych HT-29 MTX zbliżone do nabłonka jelita grubego, EFK poddany krótszej – 2-godzinnej inkubacji z bakteriami jelitowymi testowano w stosunku do komórek Caco-2, natomiast wpływ EFK na komórki linii HT-29 MTX określano po 21 h inkubacji w obecności mikroflory jelitowej.

Przeprowadzone pomiary gęstości komórek po 48 h hodowli w obecności EFK trawionych w sztucznym przewodzie pokarmowym dowiodły, że pomimo procesu trawienia EFK zachowały antyproliferacyjny potencjał w stosunku do komórek nowotworowych Caco-2 i HT-29 MTX. Wykres zależności stężenia komórek Caco-2 i HT-29 MTX w hodowli od dawki trawionych EFK przedstawiono na rys. 4.

Zaobserwowano, że hamowanie wzrostu komórek Caco-2 i HT-29 MTX nasila się wraz ze zwiększaniem dodatku poddanych trawieniu EFK do pożywki hodowlanej. Obserwowane zmiany były bardziej dynamiczne w przypadku komórek HT-29 MTX aniżeli komórek linii Caco-2 (rys. 4).



Rys. 4. Wpływ ekstraktów fasolowo-kukurydzianych poddanych trawieniu *in vitro* na wzrost komórek Caco-2 i HT-29 MTX.

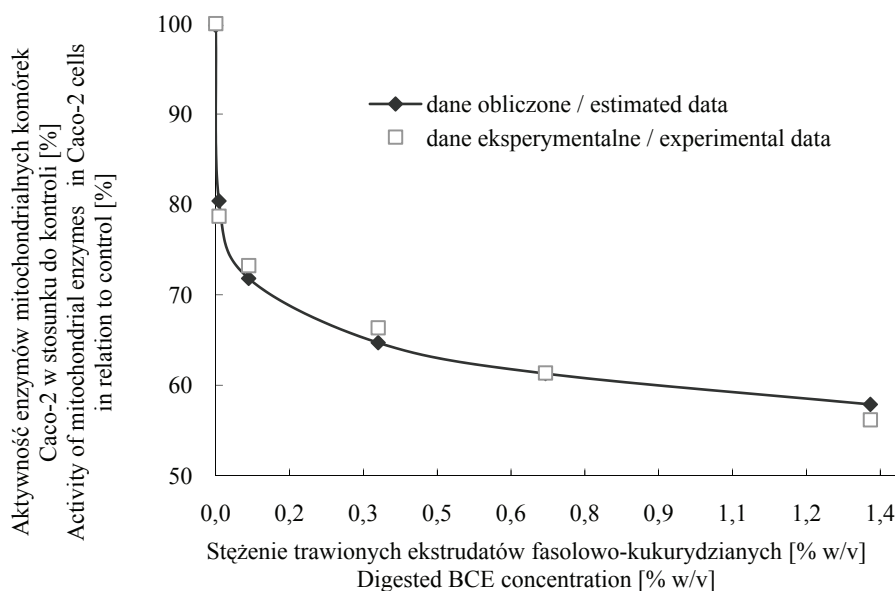
Fig. 4. Effect of bean-corn extrudates (BCE) after the *in vitro* digestion on the growth of Caco-2 and HT-29 MTX cells.

Wyniki testu MTT przedstawione na rys. 5. i 6. wskazują na cytotoksyczny potencjał EFK po trawieniu *in vitro* w stosunku do komórek nowotworowych jelita grubego.

Oszacowano, że dawki IC_{50} powodujące 50-proc. redukcję aktywności metabolicznej komórek Caco-2 wynoszą w przypadku EFK niepoddawanego trawieniu 9,24 % natomiast trawionego EFK 6,8 % (m/v) i nie mieszczą się w obszarze badanych stężeń.

W przypadku EFK poddanego 2-godzinnemu trawieniu w obecności mikroflory jelitowej zauważono znaczny wzrost aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek linii HT-29 MTX w porównaniu z EFK nietrawionym. Wartości IC_{50} w przypadku EFK przed i po procesie trawienia wynosiły odpowiednio 3,55 i 0,12 % (m/v). Krzywa obrazująca zmiany względnej aktywności enzymów mitochondrialnych komórek HT-29 MTX indukowanych EFK po trawieniu (rys. 6) wskazuje na gwałtowne obniżenie tego parametru już przy stosunkowo niskich dawkach produktu po trawieniu (0,067 – 0,67 %). Zależność ta jest związana z silnym ograniczeniem wzrostu komórek w tym zakresie stężeń. Trawiony EFK obecny w hodowli komórek HT-29 MTX w stężeniach

powyżej 0,33 % (m/v) całkowicie hamował ich proliferację (rys. 4). Średnia gęstość komórek poddawanych działaniu produktu w tych dawkach nie przekraczała ich stężenia w inokulum.



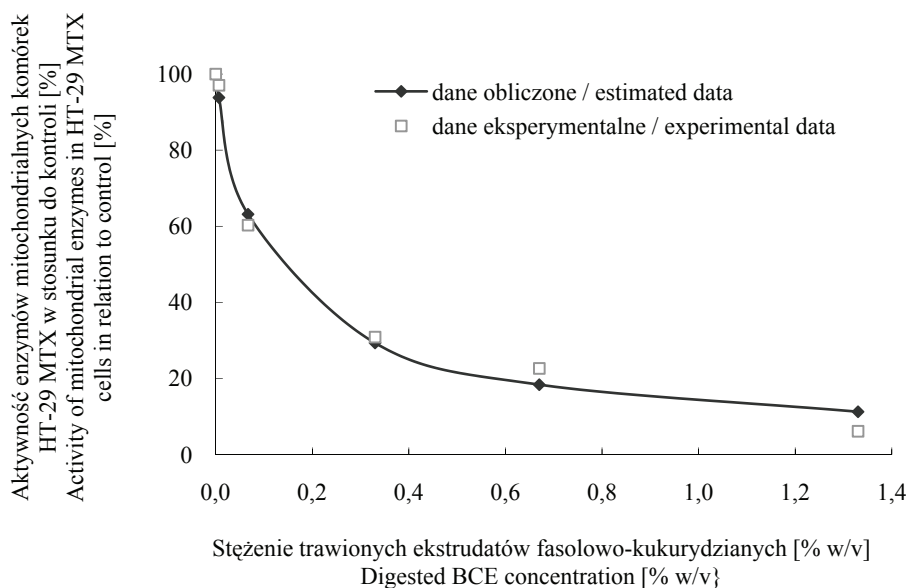
Rys. 5. Aktywność enzymów mitochondrialnych w komórkach Caco-2 hodowanych w obecności trawionego ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego.

Fig. 5. Activity of mitochondrial enzymes in Caco-2 cells cultured in the presence of digested bean-corn extrudate (BCE).

Wzrost właściwości cytotoksycznych EFK poddanych trawieniu świadczy o intensywnych przemianach substancji aktywnych obecnych w EFK prowadzonych przez mikroorganizmy bytujące w jelicie. Prawdopodobnie mikroflora jelitowa powoduje takie modyfikacje tych związków, które podnoszą ich inhibicyjną aktywność. Wzrost cytotoksyczności EFK zaobserwowano głównie w stosunku do komórek HT-29 MTX traktowanych EFK poddanych 21-godzinnemu trawieniu z udziałem mikroflory jelitowej.

Opisywane zjawisko może być związane z metabolizmem związków należących do antocyjanin. Badania Tsudy i wsp. [19] wskazują na udział bakterii jelitowych wyposażonych w β -glukozydazę w hydrolizie glikozydowych form antocyjanin do aglikonów – antocyjanidyn. Bakterie te są również wyposażone w ramnozydazę, a hydroliza ramnozydowych form flawonoidów odbywa się jedynie przy ich udziale [17]. Praca autorstwa Koide i wsp. [6] wskazująca, że w ekstrakcie z czerwonej fasoli dominują cyjaniny połączone z ramnozą doprowadziła do wyjaśnienia prawdopodobnej przyczyny

ny wzrostu oddziaływania trawionych EFK. Być może w toku metabolizmu EFK pod wpływem działania mikroflory jelitowej ramnozydowe postaci tych flawonoidów ulegają przemianom do aglikonów. Przypuszczenie to wydaje się znajdować potwierdzenie w doświadczeniach Zhanga i wsp. [22], którzy stwierdzili silniejszy potencjał antyproliferacyjny wolnych form antocyjanin.



Rys. 6. Aktywność enzymów mitochondrialnych w komórkach HT-29 MTX hodowanych w obecności trawionego ekstraktu fasolowo-kukurydzianego.

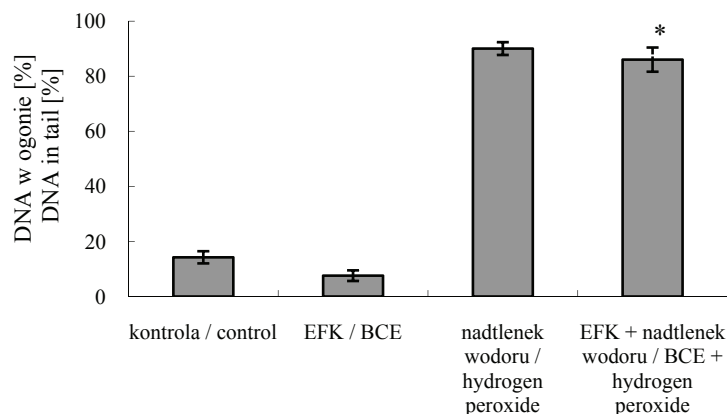
Fig. 6. Activity of mitochondrial enzymes in HT-29 MTX cells cultured in the presence of digested bean-corn extrudate (BCE).

Ponadto proces trawienia prawdopodobnie zwiększa uwalnianie składników z matrycy, w jakiej występują w gotowym produkcie spożywcym [2]. W trakcie trawienia może dochodzić do zwiększenia rozpuszczalności związków biologicznie aktywnych zawartych w EFK i w konsekwencji doprowadzać do ich silniejszego oddziaływania antyproliferacyjnego i cytotoksycznego. Prawdopodobnie za wzrost cytotoksyczności EFK, po trawieniu i pasażu przez jelito grube, odpowiedzialne są również metabolity wtórne wytwarzane przez rozwijającą się mikroflorę jelitową.

Wpływ CFK na stopień uszkodzeń DNA komórek Caco-2 i HT-29 MTX

Poziom uszkodzeń DNA w komórkach nabłonka jelitowego indukowanych przez EFK analizowano w 24-godzinnych hodowlach Caco-2 i HT-29 MTX eksponowanych

na badany produkt w stężeniach odpowiadających oznaczonym dawkom IC_{50} . W pracy posłużono się testem kometowym, umożliwiającym analizę stopnia uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczych komórek, na podstawie stopnia fragmentacji jego cząsteczki [5]. Podczas elektroforezy fragmenty nici DNA uwolnione ze struktur jądrowych w wyniku pęknięć, odznaczają się szybszą migracją i tworzą charakterystyczny „ogon komety”. Stopień degradacji materiału genetycznego określano na podstawie procentowej zawartości DNA w ogonie komety. Na rys. 7. i 8. przedstawiono średnie wartości tego parametru w komórkach Caco-2 i HT-29 MTX w poszczególnych próbach. Na podstawie analizy wyników stwierdzono, że EFK w badanych dawkach nie wykazuje działania genotoksycznego w stosunku do komórek linii Caco-2 i HT-29 MTX. Dodatek EFK do hodowli komórek Caco-2 spowodował niewielkie zmniejszenie jednoczyniowych uszkodzeń DNA w stosunku do próby kontrolnej (rys. 7).

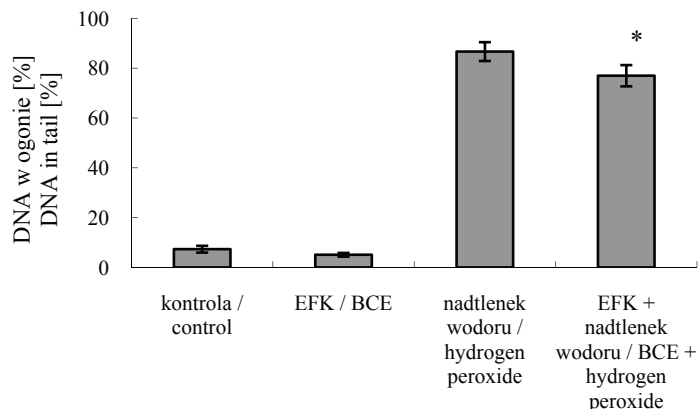


Rys. 7. Wpływ ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego (EFK) na stopień uszkodzeń DNA w komórkach Caco-2, różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli: * $p \leq 0,05$.

Fig. 7. Effect of bean-corn extrudate (BCE) on the DNA damage in Caco-2 cells, statistically significant differences compared to the control: * $p \leq 0.05$.

Komórki HT-29 MTX hodowane w obecności EFK, a następnie ekspozowane na działanie nadtlenku wodoru, jako czynnika indukującego oksydacyjne uszkodzenia DNA, charakteryzowały się mniejszym stopniem fragmentacji materiału genetycznego. Poziom pęknięć DNA w komórkach hodowanych z dodatkiem EFK w stężeniu 3 % (m/v) był o około 10 % mniejszy niż w próbach kontrolnych traktowanych H_2O_2 bez preinkubacji z EFK (rys. 8).

Natomiast w przypadku linii komórkowej Caco-2 EFK nie powodował statystycznie istotnych zmian w poziomie uszkodzeń DNA indukowanych $100 \mu M H_2O_2$, co wskazuje na brak potencjału ochronnego EFK w stosunku do tych komórek (rys. 7).



Rys. 8. Wpływ ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego (EFK) na stopień uszkodzeń DNA w komórkach HT-29 MTX, różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli: * $p \leq 0,05$

Fig. 8. Effect of bean-corn extrudate (BCE) on the DNA damage in HT-29 MTX cells, differences statistically significant from the control: * $p \leq 0.05$.

Wnioski

1. Przeprowadzane badania wykazały silne działanie cytotoksyczne EFK na jelitowe komórki nowotworowe Caco-2 i HT-29 MTX.
2. Trawienie *in vitro* zwłaszcza po wydłużonej ekspozycji na czynniki trawienne i działanie mikroflory jelitowej powodowało wzrost aktywności antyproliferacyjnej oraz cytotoksycznej EFK w stosunku do komórek HT-29 MTX.
3. Na podstawie analizy kometowej stwierdzono, że EFK nie indukują powstawania uszkodzeń DNA w komórkach nabłonka jelitowego.
4. Wyniki testu kometowego wskazują na ochronne działanie EFK względem oksydacyjnych uszkodzeń DNA generowanych przez H_2O_2 w komórkach HT-29 MTX.

Podziękowania

Autorzy pracy dziękują pani dr inż. Małgorzacie Gumiennej i prof. dr hab. Zbigniewowi Czarneckiemu z Zakładu Fermentacji i Biosyntezy Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu za dostarczenie ekstrudatu fasolowo-kukurydzianego i jego podstawową analizę.

Badania zrealizowano w ramach grantu PBZ-KBN nr 094/P06/2003/18.

Literatura

- [1] Beninger C.W., Hostfield G.L.: Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 7879-7883.
- [2] Boyer J., Brown D., Liu R.H.: *In vitro* digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by Caco-2 cell monolayer. *Nutr J.*, 2005, **4**:1.
- [3] Galijatovic A., Walle U.K., Walle T.: Induction of UDP-glucuronosyl-transferase by the flavonoids chrisin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharm Res.*, 2000, **17** (1), 21-26.
- [4] Grajek W., Olejnik A.: Modele *in vitro* do badań nad biodostępnością przeciwutleniaczy. W: *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne* - pod red. W. Grajka. WNT, Warszawa 2007, s. 334-339.
- [5] Jałoszyński P.: Analiza pęknięć nici DNA metodą elektroforezy pojedynczych komórek (comet assay). W: *Przykłady analiz DNA – pod red. R. Słomskiego*. Wyd. AR, Poznań 2004, 344-349.
- [6] Koide T., Hashimoto Y., Kamei H., Kojima T., Hasegawa M., Terabe K.: Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biother Radiopharm.*, 1997, **12** (4), 277-280.
- [7] Kuntz S., Wenzel U., Daniel H.: Comparative analysis of effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer lines. *Eur. J. Nutr.*, 1999, **38**, 133-142.
- [8] Kuo S.M.: Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.*, 1996, **110**, 41-48.
- [9] Lin L., Harnly J.M., Pastor-Corrales M.S., Luthria D.L.: The phenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.*, 2008, **107**, 399-410.
- [10] Madhujith T., Amarowicz R., Shahidi F.: Phenolic antioxidants in beans and their effects on inhibition of radical-induced DNA damage. *JAOCS*, 2004, **81**/7, 691-696.
- [11] Mathers J.C.: Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *Br. J. Nutr.*, 2002, **88**/3, 273-279.
- [12] Moskaug J.O., Carlsen H., Blomhoff R.: Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev.*, 2004, **125** (4), 315-324.
- [13] Murota K., Terao J.: Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys.*, 2003, **417**, 12-17.
- [14] Re R., Pregelgrini N., Proteggente A., Panala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, **26**, 1231-1237.
- [15] Remiszewski M., Kulczak M.: Obróbka hydrodynamiczna suchych nasion roślin strączkowych. W: *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne* - pod red. W. Grajka. WNT, Warszawa 2007, s. 484-487.
- [16] Remiszewski M., Przygoński K., Kulczak M., Jeżewska M.: Optymalizacja układu ekstrakcyjnego i ocena właściwości przeciwutleniających nasion wybranych roślin strączkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **1** (46) Supl., 127-135.
- [17] Scalbert A., Williamson G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 2000, **130**, 2073-2085.
- [18] Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphodphotungstics acid reagents. *Am. J. Etnol. Vitic.*, 1965, **16**, 144-158.
- [19] Tsuda T., Horio F., Osawa T.: Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett.*, 1999, **449** (2-3), 179-182.
- [20] Valerio L.G., Kepa J.K., Picwell G.V., Quattrochi L.C.: Induction in human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol Lett.*, 2001, **119**, 49-57.

- [21] Wyska E., Mager D.E., Krzyzanski W.: Methods of estimation of IC_{50} and SC_{50} parameters for indirect response models from single dose data. *J. Pharm. Sci.*, 2003, **92**, 1438-1454.
- [22] Zhang Y., Vareed S.K., Nair M.G.: Human tumor cell inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruit and vegetables. *Life Sci.*, 2005, **76**, 1465-1472.

ASSESSMENT OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF BEAN-CORN EXTRUDATES TOWARDS THE NEOPLASTIC CELLS IN HUMAN INTESTINAL EPITHELIUM

S u m m a r y

The objective of this paper was to determine cytotoxic and genotoxic properties of bean-corn extrudates (BCE) manufactured from a mixture of Red Kidney beanflour and cornflour towards Caco-2 and HT-29 MTX neoplastic cells in human intestinal epithelium. In order to reproduce the *in vivo* conditions, the product examined was subjected to actions of digestive agents and intestinal microflora by simulating its passage along the alimentary tract. The cytotoxic potential of BCE before and after the digestion was determined using a hemocytometer to estimate the proliferation rate, and an MTT assay to evaluate the viability of cells. Moreover, the effect of BCE was investigated on a level of DNA damage in intestinal epithelium cells that were either stimulated or not stimulated by H_2O_2 . The results obtained showed a high anti-proliferation activity of BCE that depended on its concentration level. The determined values of IC_{50} doses applied to Caco-2 and HT-29 MTX were 9.24 and 3.55% (w/v), respectively. The *in vitro* digestion process with a long term exposition of BCE to the action of intestinal microflora caused a significant increase in the cytotoxic effect on HT-29 MTX cells. The comet assay results showed that BCE did not induce DNA lesions in the intestinal cells, but it had a protective action towards the oxidative damages in DNA induced by 100 μM H_2O_2 in HT-29 MTX cells.

Key words: corn-bean extrudate, Red Kidney bean, cytotoxicity, Caco-2, HT-29 MTX ☒