

Maria SŁOTWIŃSKA

Wpływ saponin lucerny na hodowle komórek L *in vitro*

Влияние сапонина люцерны на культуру клеток *in vitro*

The Effect of Alfalfa Saponins on L-cells Culture *in vitro*

Saponiny są związkami występującymi u wielu gatunków roślin (3, 6). Zbudowane są z części węglowodanowej i aglikonowej. Aglikonem może być steryd o 27 atomach węgla lub trójterpen o 30 atomach węgla (2).

Saponiny mogą być toksyczne zarówno dla zwierząt, jak i roślin. Stosuje się je w preparatach przeciwwgrzybiczych, do zwalczania szkodników, jako składnik leków itd. (3, 5, 11, 12). Obserwowano zahamowanie wzrostu kurcząt i nieśności kur karmionych paszą z dużą zawartością saponin (1). Według Miszustina i Naumowej saponina z korzenia lucerny jest toksyczna dla kiełkujących nasion bawełny.

Najsilniejsze działanie toksyczne saponin zaobserwowano po wprowadzeniu drogą parenteralną (4, 5, 7). Związki te podane *per os* wykazują dużo niższą toksyczność, gdyż wchłanianie ich z przewodu pokarmowego jest małe (4). Saponiny charakteryzują się działaniem toksycznym, uszkadzając narządy mięsiste, głównie nerki i wątrobę (4, 8). Wykazują również silne własności hemolityczne.

Niektórzy autorzy sugerują, że hemolityczne działanie saponin poprzedza proces ich hydrolizy do wielocukrów i aglikonów. Segal i Schlösser (11) uważają, że rozpad saponin powoduje znajdujący się w błonie komórki erythrocytu enzym glikozydaza, który uwalnia aglikony. Aglikony odpowiedzialne za hemolizę łączą się z cholesterolem, fosfolipidami i proteinami obecnymi w błonie erythrocytu, zwiększając jej przepuszczalność, co może doprowadzić do znacznego uszkodzenia komórki (9, 10). Segal i Milo-Goldweig zaobserwowali, że inhibitory β -glikozydaz są jednocześnie inhibitorami hemolitycznego działania saponin.

Stwierdzono, że najbardziej aktywne z saponin lucerny są glikozydy kwasu medikagenowego, natomiast glikozydy sojasapogenoli odznaczają się znacznie mniejszą aktywnością biologiczną (4, 5, 8).

Celem niniejszej pracy było przebadanie wpływu saponin lucerny na morfologię, żywotność, przyrost, gęstość i indeks mitotyczny hodowli komórek L.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem doświadczalnym były 24-godzinne hodowle komórek L. Podłożem odżywczym dla komórek był płyn Eagle'a (MEM) wzbogacony 10% surowicą cielęcą. Do podłoża dodawano również streptomycynę 50 $\mu\text{g/ml}$ i penicylinę 100 j/ml pożywki.

Zawiesinę o stężeniu 5×10^4 komórek/ml i żywotności ok. 83% wysiewano do naczyń Leightona. Po upływie 24 godz. inkubacji w temp. 37°C zmieniano płyn hodowlany na pożywkę z dodatkiem 10, 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$ soli sodowej glikozydu sojasapogenoli, soli sodowej kwasu medikagenowego, glikozydu kwasu medikagenowego albo też na pożywkę kontrolną. Do badań indeksu mitotycznego i gęstości populacji hodowlę prowadzono na szkiełkach nakrywkowych w naczyniach Leightona. Badania przeprowadzono w 9 seriach, łącznie założono 360 hodowli. Komórki hodowano w ciągu 24 i 48 godz.

Celem określenia zmian morfologicznych komórek L preparaty utrwalono alkoholem metylowym, barwiono hematoksyliną Harrisa oraz eozyną. W tych samych preparatach obliczano indeks mitotyczny (IM) i gęstość populacji na szkle. Indeks mitotyczny obliczano na podstawie ilości podziałów przypadających na 1000 komórek. Gęstość populacji i indeks mitotyczny komórek L określano w polu widzenia mikroskopu przy powiększeniu $480\times$. Żywotność komórek oceniano po zabarwieniu 0,5% roztworem błękitu trypanu i 0,04% czerwieni obojętnej, a przyrost komórek określano licząc komórki w komorze Bürkera.

W celu porównania wyników zastosowano test χ^2 , przyjmując jako kryterium znamienności $p < 0,05$.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Komórki hodowli L pod wpływem soli sodowej kwasu medikagenowego i glikozydu kwasu medikagenowego traciły swój wrzecionowaty kształt, a ich wypustki ulegały skróceniu. Nieznacznie wzrósł odsetek komórek wielojądrzastych i olbrzymich. Natomiast dodanie soli sodowej glikozydu sojasapogenoli nie wpłynęło na zmianę kształtu komórek L.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że najsilniejsze działanie toksyczne wywierała sól sodowa kwasu medikagenowego, obniżając wskaźnik mitotyczny, gęstość populacji, żywotność i przyrost komórek. Saponina ta w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ nie powodowała widocznych zmian w hodowli, natomiast w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ i 200 $\mu\text{g/ml}$ hamowała

namnażanie się komórek oraz ich przeżywalność. Liczba dzielących się komórek w hodowlach doświadczalnych była niższa o ok. 50% w porównaniu z hodowlą kontrolną. Zmniejszyła się również liczba żywych komórek (tab. 1).

Nieznacznie słabsze działanie na wskaźnik mitotyczny i przeżywalność komórek wywierał glikozyd kwasu medikagenowego (tab. 2).

Różnice wskaźników pomiędzy hodowlą kontrolną a zawierającą sól sodową glikozydu sojasapogenoli nie były znamienne statystycznie (tab. 3).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono publikacji na temat wpływu saponin na hodowlę komórkowe lub tkankowe. Natomiast jest wiele prac nad działaniem saponin na bakterie, grzyby, a przede wszystkim na zwierzęta (1, 4, 11, 12).

Tab. 1. Wpływ soli sodowej kwasu medikagenowego na hodowlę komórek L
Influence of medicagenic acid sodium salt on L-cells culture

Wskaźniki Indices	Czas inkubacji godz. Time of in- cubation hrs.	Kontrola Control	10 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Żywotność Vitality %	24	85,9	83,3	74,8 [*]	68,1 ^{**}
	48	93,4	90,0	75,4 [*]	61,0 ^{**}
Przyrost komórek Growth of cells %	24	243,8	230,4	179,6 [*]	143,4 ^{**}
	48	353,9	335,4	176,4 [*]	133,6 ^{**}
Indeks mitotyczny Mitotic index %	24	91,2	86,7	68,9 [*]	48,6 ^{**}
	48	88,1	87,4	53,1 [*]	39,0 ^{**}
Gęstość populacji na szkle Population density on glass	24	64,1	60,9	54,2 [*]	43,4 ^{**}
	48	89,8	82,7	47,5 [*]	37,3 ^{**}

Różnice statystycznie znamienne w stosunku do kontroli: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.
Statistically significant differences in relation to control: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

Tschesche i Wulff (12) zaobserwowali, że z 15 przebadanych przez nich saponin cyklamina i primulina wykazywały przeciwgrzybicze i bakteriostatyczne własności. Pedersen i wsp. (2) stwierdzili, że saponiny soi hamują wzrost grzyba *Trichoderma* sp. Segal i Schlösser (11) zaobserwowali, że hederyna, digitonina i tomatyna powodują uszkodzenie błony komórek grzybów *Botritis cinera* i *Rhizoctonia solani*. Natomiast cyklamina wyraźnie uszkadzała błony komórkowe grzyba *Rhizoctonia solani*, ale nie wpływała na zmianę przepuszczalności błon grzyba *Botritis cinera*.

Tab. 2. Wpływ glikozydu kwasu medikagenowego na hodowle komórek L
Influence of medicagenic acid glycoside on L-cells culture

Wskaźniki Indices	Czas inkubacji godz. Time of incubation hrs.	Kontrola Control	10 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Żywotność Vitality	24	85,9	83,2	70,5 ^{**}	63,3 ^{**}
%	48	93,4	89,1	69,5 ^{**}	60,1 ^{**}
Przyrost komórek Growth of cells	24	243,9	225,8	169,7 ^{**}	146,0 ^{**}
%	48	353,9	327,2	164,6 ^{**}	114,7 ^{**}
Indeks mitotyczny Mitotic index	24	91,2	89,1	70,1 ^{**}	50,8 ^{**}
%	48	88,1	84,8	65,2 ^{**}	40,2 ^{**}
Gęstość populacji na szkle Population density on glass	24	64,1	62,2	56,1 ^{**}	45,6 ^{**}
	48	89,8	87,7	51,9 ^{**}	40,8 ^{**}

Różnice statystycznie znamienne w stosunku do kontroli: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.
Statistically significant differences in relation to the control: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

Tab. 3. Wpływ soli sodowej glikozydu sojasapogenoli na hodowle komórek L
Influence of sovasapogenol glycoside sodium salt on L-cells culture

Wskaźniki Indices	Czas inkubacji godz. Time of incubation hrs.	Kontrola Control	10 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Żywotność Vitality	24	85,9	83,7	81,2	80,0
%	48	93,4	90,0	89,6	87,2
Przyrost komórek Growth of cells	24	243,8	231,2	230,9	227,3
%	48	353,9	347,3	330,8	326,7
Indeks mitotyczny Mitotic index	24	91,2	89,4	88,0	87,6
%	48	88,1	84,5	83,2	81,9
Gęstość populacji na szkle Population density on glass	24	64,1	63,3	63,5	61,9
	48	89,8	87,4	82,4	82,0

W licznych pracach dotyczących działania saponin zawartych w paszy wykazano wyraźnie negatywny wpływ na rozwój hodowli zwierząt (1, 6, 8).

Według Andersona i wsp. (1), zawartość saponin w karmie przekraczająca 0,2% wpływała hamująco na wzrost i produktywność zwierząt jednożołądkowych.

Badania nasze wykazały, że saponiny zawierające kwas medikagenowy w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ powodują wyraźne zmiany, a 200 $\mu\text{g/ml}$ — zahamowanie rozwoju komórek i częściowe zniszczenie hodowli. Natomiast sól sodowa glikozydu sojasapogenoli, nie zawierająca kwasu medikagenowego, nawet w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ tylko nieznacznie obniża żywotność, indeks mitotyczny, gęstość i przyrost komórek. Przy czym różnice tych wartości po 48 godz. działania saponiny w porównaniu z kontrolą zbliżają się do różnic znamiennych: $p < 0,05$.

Modelem doświadczalnym w przeprowadzonych badaniach były komórki zwierzęce hodowane *in vitro*. W dostępnych pracach eksperymentalnych nad toksycznością saponin nie znaleziono zastosowania podobnego modelu doświadczalnego. Z przedstawionych badań wynika, że najbardziej toksyczne z saponin lucerny są te, które w części aglikonowej zawierają kwas medikagenowy. Obserwacje te pokrywają się z doniesieniami innych autorów, którzy badali działanie saponin na innych modelach doświadczalnych (4, 5, 8).

WNIOSKI

1. Najbardziej toksycznie na komórki *L* działa sól sodowa kwasu medikagenowego oraz glikozyd kwasu medikagenowego.

2. Sól sodowa glikozydu sojasapogenoli, nie zawierająca w części aglikonowej kwasu medikagenowego, nawet w dużym stężeniu nie wywiera toksycznego działania na komórki *L in vitro*.

Wyrażam podziękowanie drowi Marianowi Jurzyście z Zakładu Biochemii i Fizjologii Roślin IUNG w Puławach za udostępnienie preparatów saponin.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson J. O.: Effect of Alfalfa Saponins on the Performance of Chicks and Laying Hens. *Poultry Sci.* **36**, 873—876 (1957).
2. Brik Y.: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Editor Liener I. E., Academic Press, Now York 1969.
3. Cebo B. i współprac.: Własności farmakologiczne frakcji saponinowych z surowców krajowych: *Saponaria officinalis*, *Primula officinalis*, *Aesculus hippocastanum*. *Herba Polonica* **2**, 154—162 (1976).

4. Górski M., Kukielka E., Górski P. M.: Zmiany we krwi oraz narządach wewnętrznych szczurów szczepu Wistar po parenteralnym podaniu saponin lucerny. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C* **35**, 167—179 (1980).
5. Jankowska-Chadaj E., Górski M., Górski P. M., Jurzysta M.: Wpływ saponin lucerny na niektóre wskaźniki biochemiczne krwi i wątroby szczurów szczepu Wistar przy podaniu parenteralnym. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska* **34**, 175—185 (1979).
6. Lindahl J. L., Davis R. E., Tertell R. T.: Alfalfa Saponins Studies on Their Chemical, Pharmacological and Physiological Properties in Relation to Ruminant Bloat. *Dept. Agr. Tech. Bull.* **1161**, 60—63 (1957).
7. Ożarowski A.: Ziółolecznictwo. PZWL, Warszawa 1976.
8. Reshef G., Gestetner B., Brik Y., Bondi A.: Effect of Alfalfa Saponins on the Growth and Some Aspects of Lipid Metabolism of Mice and Quails. *J. Sci. Fd. Agric.* **27**, 63—72 (1976).
9. Schlösser E.: Sterol Dependent Membranlytic Action of Saponins. *Phytopath. Z.* **74**, 91—94 (1972).
10. Segal R., Mansour M., Zaitschek D. V.: Effect of Ester Groups on the Hemolytic Action of Some Saponins and Sapogenins. *Biochem. Pharmac.* **15**, 1411—1416 (1966).
11. Segal R., Schlösser E.: Role of Glycosidases in the Membranolytic Antifungal Action of Saponins. *Arch. Microbiol.* **104**, 147—150 (1975).
12. Tschesche R., Wulff G.: Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen. *Z. Naturforsch.* **20b**, 543—546 (1965).

РЕЗЮМЕ

К культуре клеток *L.* добавили сапонин люцерны концентрации 10, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{мл}$. Соль натрия медикагенной кислоты и гликозид этой же кислоты вызвали знаменательное снижение индекса, жизнеспособности, прироста и густоты клеток *L.* Соль натрия гликозида соясапогена не вызвала заметных изменений в культуре клеток *L.* На основании проведенных исследований следует подчеркнуть, что сапонины, содержащиеся в агликонной части медикагенную кислоту, оказывают токсическое действие как на культуры клеток, так и на организмы растений и животных.

SUMMARY

Alfalfa saponins in the concentration 10, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were administered to *L.*-cells culture. The medicagenic acid sodium salt and medicagenic acid glycoside have induced significant reduction of mitotic index, viability, growth and density of the cells. Instead soyasapogenol glycoside sodium salt caused no visible changes in cell cultures. The saponins which have medicagenic acid in aglyconic part have caused toxic changes in cell cultures as well as in the plants and the animals.