

Wpływ kurkuminy na detoksykacyjne i antyoksydacyjne mechanizmy w wątrobie szczurów podczas starzenia*)

MARZENA GUTOWICZ, MAŁGORZATA CHOŁOJCZYK, JUSTYNA PYRZANOWSKA*, EWA WIDY-TYSZKIEWICZ*, ANNA BARAŃCZYK-KUŻMA

Katedra i Zakład Biochemii AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

*Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej AM, Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-325 Warszawa

Gutowicz M., Chołojczyk M., Pyrzanowska J., Widy-Tyszkiewicz E., Barańczyk-Kużma A.

Effect of curcumin on antioxidant and detoxification mechanisms in the livers of aging rats

Summary

Curcumin (diferuloylmethane), a yellow polyphenol pigment isolated from rhizome of *Curcuma longa*, has been used throughout Asia for several thousands of years. Beside giving curry dishes their color, curcumin has been reported as an agent used in the treatment of various disorders. The aim of this study was to determine the effect of chronic curcumin administration on enzymatic and nonenzymatic protective mechanisms in the livers of aging rats. The liver was isolated from Wistar Albino Glaxo rats, age 6 and 22 months. All rats were fed a standard chow diet. Two groups of older animals were given a standard diet supplemented either with 10 mg/kg b.w. or with 50 mg/kg b.w. of curcumin powder for 10 weeks before their sacrifice. Malondialdehyde level, reduced glutathione, the activity of catalase, glutathione S-transferase, and arginase were determined. Increased lipid peroxidation was observed in old rat livers, elevated catalase and arginase activities, as well as the level of reduced glutathione in curcumin fed animals. No changes in glutathione S-transferase activity were found. It may be concluded that curcumin administered in a diet exerts an antioxidant effect and protects the liver against ammonia intoxication.

Keywords: curcumin, liver, aging, oxidative stress, detoxification

Kurkumina [1,7-bis-(4-hydroksy-3-metoksyfenilo)-1,6 heptadien 3,5-dion] to żółty barwnik wyizolowany z kłączy ostryżu indyjskiego *Curcuma longa*. W krajach azjatyckich używana jest od pięciu tysięcy lat jako przyprawa (składnik curry). W staroindyjskiej medycynie ajurwedyjskiej stosowano ją jako lek przeciwzapalny, antybakteryjny i żółciopędny (11, 14). Stwierdzono, że podawanie kurkuminy obniża poziom cholesterolu, łagodzi objawy astmy, obniża ciśnienie krwi. Wykazano również, że kurkumina obniża aktywność enzymów biorących udział w nowotworzeniu, stymuluje enzymy detoksykacyjne oraz enzymy i czynniki antyoksydacyjne, obniża poziom wolnych rodników, hamuje utleniające działanie jonów żelaza i zmniejsza peroksydację lipidów (1, 5, 16). Potwierdzono ochronne działanie kurkuminy u myszy z rakiem skóry, żołądka i jelita grubego, poprzez hamowanie ekspresji cyklooksygenazy 2, kinaz białkowych, czynników wzrostowych oraz indukcję apoptozy o nietypowym przebiegu (6, 10, 12).

*) Badania były finansowane z Projektu Promotorskiego Akademii Medycznej w Warszawie, nr 1WK/WP1/06.

W procesie starzenia coraz większą rolę przypisuje się działaniu toksycznych związków chemicznych, w tym wolnym rodnikom tlenowym, które, dążąc do sparowania wolnego elektronu, powodują peroksydację lipidów, utlenienie białek i kwasów nukleinowych.

Przewaga wytwarzania wolnych rodników nad zdolnością komórki do ich zubożenia prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego, który może być przyczyną wielu przewlekłych chorób, a także przedwczesnego starzenia i śmierci (8).

Głównym narządem uczestniczącym w procesach detoksykacji jest wątroba. Charakteryzuje się ona wysoką aktywnością enzymów katalizujących zarówno reakcje I, jak i II fazy biotransformacji (4). W wątrobie bardzo wysoką aktywność wykazuje także arginaza, ostatni enzym cyklu mocznikowego, w którym zubożeniu ulega powstający endogennie amoniak.

Celem badań było określenie wpływu kurkuminy na skuteczność enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych w wątrobie starzejących się szczurów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na dorosłych szczurach, samcach rasy Wistar Albino Glaxo w wieku 6 miesięcy o masie ciała 350-400 g (grupa kontrolna I, n = 8) i 22 miesięcy o masie ciała 600-800 g (grupa kontrolna II, n = 7, grupy badane III i IV, po 8 zwierząt). Zwierzęta znajdowały się w stałych warunkach (temp. 20°C, wilgotność wzgl. powietrza 60%, rytm dobowy światło/ciemność 12 godz.). Wszystkie były karmione do woli wodą i dietą standardową (LSM, Motycz). Dziesięć tygodni przed dekapitacją grupa III otrzymywała dietę standardową wzbogaconą kurkumina w ilości 10 mg/kg m.c., a grupa IV 50 mg/kg m.c. Natychmiast po dekapitacji izolowano wątrobę, którą homogenizowano we właściwym buforze, wirowano (12 000 × g przez 15 min.), a otrzymany supernatant stosowano do badań.

Poziom dialdehydu malonowego (MDA) oznaczano wg Okhawa i wsp. (13), zredukowanego glutationu (GSH) wg Sedlak i wsp. (15), aktywność katalazy (CAT) wg Góth (7), transferazy S-glutationowej (GST) wg Habig i wsp. (9), stosując 1-chloro-2,4-dinitrobenzen jako substrat elektrofilowy, arginazy (ARG) wg Chinard (3), stężenie białka metodą Bradford (2).

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta, stosując program Statistica 6.0 StatSoft Inc. (St. Tulsa USA).

Badania przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Akademii Medycznej w Warszawie.

Wyniki i omówienie

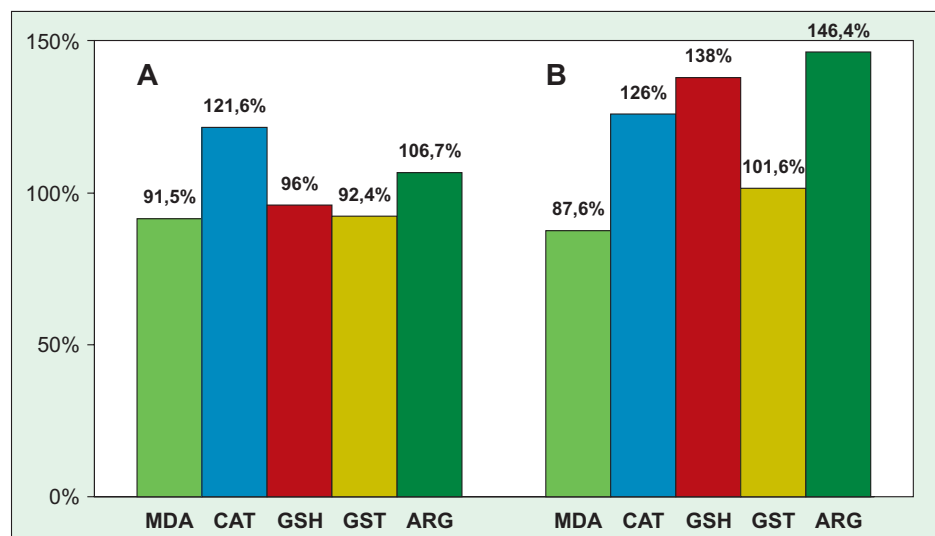
W wątrobie starych 22-miesięcznych szczurów będących na diecie standardowej bez kurkuminy stężenie MDA było znacznie wyższe niż u zwierząt 6-miesięcznych ($p < 0,01$) (tab. 1). Podawanie kurkuminy 22-miesięcznym szczurom nie miało istotnego wpływu na wyrażony stężeniem dialdehydu malonowego poziom peroksydacji lipidów (grupy III i IV) (ryc. 1, 2).

Aktywność CAT, enzymu rozkładającego nadtlenuk wodoru, w grupie szczurów starych nie karmionych kurkumina była niższa niż w grupie młodszej, a także niższa niż w wątrobie zwierząt karmionych kurkumina (tab. 1). W grupach zwierząt karmionych kurkumina obserwowano ponad 20% wzrost aktywności CAT w stosunku do szczurów kontrolnych (grupa II) (ryc. 1, 2). W grupie IV wzrost był istotny statystycz-

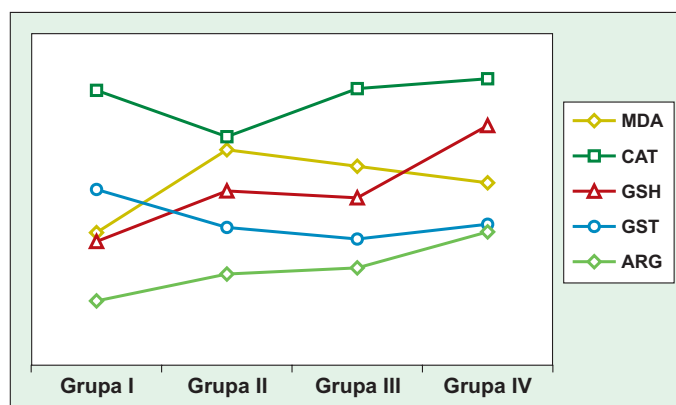
Tab. 1. Porównanie parametrów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych w wątrobie szczurów w zależności od wieku i dawki kurkuminy

Grupa	MDA nmol/mg	CAT U/mg	GSH nmol/mg	GST μmol/min/mg	ARG μmol/min/mg
I	0,08 ± 0,01	16,62 ± 5,46	7,46 ± 0,98	1,06 ± 0,10	3,87 ± 0,45
II	0,13 ± 0,04 ^a	13,76 ± 2,30	10,51 ± 2,03 ^a	0,83 ± 0,18	5,49 ± 0,85 ^a
III	0,12 ± 0,03 ^b	16,73 ± 2,69	10,09 ± 1,61 ^b	0,76 ± 0,08	5,86 ± 1,77 ^b
IV	0,11 ± 0,02 ^b	17,34 ± 5,60 ^c	14,47 ± 3,38 ^{bc}	0,84 ± 0,17	8,04 ± 1,35 ^{bc}

Objaśnienia: Grupa I: szczury 6-miesięczne; grupa II: szczury 22-miesięczne; grupa III: szczury 22-miesięczne karmione kurkumina w ilości 10 mg/kg m.c.; grupa IV: szczury 22-miesięczne karmione kurkumina w ilości 50 mg/kg m.c. Różnice znamienne statystycznie: a – grupa II wobec grupy I; b – grupy III i IV wobec grupy I; c – grupy III i IV wobec grupy II



Ryc. 1. Procentowy rozkład badanych parametrów w wątrobie szczurów 22-miesięcznych otrzymujących kurkumina w dawce 10 mg/kg m.c. (A) i 50 mg/kg m.c. (B). Za 100% przyjęto wartości dla szczurów 22-miesięcznych na diecie standardowej bez kurkuminy (grupa II)



Ryc. 2. Profil zmian badanych parametrów w wątrobie szczurów

nie ($p < 0,05$). Obniżenie aktywności katalazy z wiekiem może być efektem hamującego działania nadmiaru powstającego nadtlenuk wodoru, a jej podwyższenie u zwierząt karmionych kurkumina wskazuje na możliwość wymiatania wolnych rodników tlenowych przez ten związek.

Stężenie GSH, głównego nieenzymatycznego antyoksydanta i kofaktora GST, było znamienne niższe ($p < 0,01$) w wątrobie 6-miesięcznych szczurów (grupa I) w porównaniu do grupy 22-miesięcznej pozostającej na diecie standardowej bez kurkuminy (grupa II). Niskie stężenie kurkuminy w diecie (10 mg/kg m.c.) nie wpływało, natomiast wyższe (50 mg/kg m.c.) znamienne podnosiło poziom GSH w wątrobie starych zwierząt ($p < 0,01$) (tab. 1). W grupie IV stężenie GSH było około 40% wyższe niż w grupie II oraz dwukrotnie wyższe niż w grupie I (tab. 1, ryc. 1, 2).

Aktywność unieczyniającej toksyczne związki elektrofilowe GST była podobna we wszystkich badanych grupach zwierząt i niezależna od wieku czy stężenia kurkuminy w diecie (tab. 1, ryc. 1, 2).

Aktywność zaangażowanej w inaktywację amoniaku ARG w wątrobie 22-miesięcznych szczurów kontrolnych była znamienne wyższa niż w wątrobie zwierząt młodszych ($p < 0,01$). Podawanie kurkuminy w dawkach 10 mg/kg m.c. nie zmieniało aktywności arginazy w wątrobie starych szczurów, natomiast w dawkach 50 mg/kg m.c. istotnie podnosiło aktywność tego enzymu ($p < 0,01$) (tab. 1, ryc. 1, 2). Podwyższenie aktywności arginazy w wątrobie starych zwierząt w porównaniu do grupy młodszej może być spowodowane wzrostem katabolizmu białek, natomiast dalszy wzrost obserwowany przy wysokich dawkach kurkuminy mógł być efektem indukcji tego enzymu prowadzącej do bardziej skutecznego unieczyniania amoniaku w cyklu mocznikowym.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że kurkumina podawana w diecie wykazuje działanie antyoksydacyjne, wpływając na aktywność katalazy i poziom zredukowanego glutationu w wątrobie. Wpływa także korzystnie na metabolizm azotowy.

Piśmiennictwo

1. Bala K., Tripathy B. C., Sharma D.: Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 2006, 7, 81-89.

2. Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
3. Chinard F. P.: Photometric estimation of prolin and ornithine. *J. Biol. Chem.* 1952, 199, 91-95.
4. Devasena T., Rajasekaran K. N., Menon V. P.: Bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione (a curcumin analog) ameliorates DMH-induced hepatic oxidative stress during colon carcinogenesis. *Pharmacol. Res.* 2002, 46, 39-45.
5. Frank N., Knauff J., Amelung F., Nair J., Wesch H., Bartsch H.: No prevention of liver and kidney tumors in Long-Evans Cinnamon rats by dietary curcumin, but inhibition at other sites and of metastases. *Mutation Res.* 2003, 523-524, 127-135.
6. Goel A., Boland C. R., Chauhan D. P.: Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2001, 172, 111-118.
7. Góth L.: A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.* 1991, 196, 143-152.
8. Gutowicz M., Sadurska B., Cholojczyk M., Pokorska-Lis M., Siwińska-Ziółkowska A., Barańczyk-Kuźma A.: Antioxidant status in different regions of heroin addicts' brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006, 21, 80-85.
9. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B.: Glutathione S-transferases; the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 7130-7139.
10. Jaruga E., Bielak-Żmijewska A., Sikora E., Skierski J., Radziszewska E., Piwocka K., Bartosz G.: Glutathione-independent Mechanism of Apoptosis Inhibition by Curcumin in Rat Thymocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1998, 56, 961-965.
11. Kelloff G. J., Crowell J. A., Hawk E. T., Steele V. E., Lubert R. A., Boone C. W., Covey J. M.: Strategy and planning for chemopreventive drug development: Clinical development plans II. *J. Cell Biochem.* 1996, 26, 54-71.
12. Narayan S.: Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cell by targeting β -catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways. *J. Mol. Histol.* 2004, 35, 301-307.
13. Okhawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979, 95, 351-358.
14. Piper J. T., Singhal S. S., Salameh M. S., Torman R. T., Awasthi Y. C., Awasthi S.: Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver S. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998, 30, 445-456.
15. Sedlak J., Lindsay R. H.: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's Reagent. *Anal. Biochem.* 1968, 25, 192-205.
16. Sreepriya M., Bali G.: Effects of administration of Embelin and Curcumin on lipid peroxidation, hepatic glutathione antioxidant defense and hematopoietic system during N-nitrosodiethylamine/Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2006, 284, 49-55.

Adres autora: prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: akuzma@amwaw.edu.pl