

WŁAŚCIWOŚCI ANTYALKOHOLOWE IZOFLAWONOIDÓW ZAWARTYCH

W KORZENIU KUDZU *PUERARIA LOBATA*

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

Akademia Medyczna we Wrocławiu

50 386 Wrocław, ul Chałubińskiego 10

Wrocław 10 .2011

mgr inż. Agnieszka Bronowicka-Szydełko

Kudzu Vine (ołownik łątkowaty *Pueraria lobata*) należy do szybko rosnących pnączy z rodziny bobowatych. Dzięki szybkiemu wzrostowi systemu korzeniowego roślina ta jest wykorzystywana do użyzniania gleby i do ochrony gleby przed erozją. Łatwość prowadzenia uprawy kudzu oraz wartości odżywcze tego pnącza sprawiły, że roślina ta służy głównie do żywienia zwierząt hodowlanych [1]. Oprócz szerokiego zastosowania w rolnictwie ekstrakt z kudzu wykorzystywany jest także w medycynie, głównie do leczenia zatrucia alkoholowego i alkoholizmu. Ponadto ma on właściwości przeciwgorączkowe, przeciwbiegunkowe i przeciwwymiotne, a także zapobiega udarowi mózgu [1].

Właściwości terapeutyczne kudzu wynikają z obecności związków tzw. izoflawonoidów w korzeniu (*Radix puerariae*) jak i kwiecie (*Flos puerariae*) tej rośliny. Głównymi izoflawonoidami korzenia kudzu są pueraryna, daidzeina, daidzina oraz genisteina. Ich stężenie w ekstrakcie z korzenia wynosi od 1% do 3% [2]. Daidzeina, daidzina i genisteina działają poprzez receptory estrogenowe, natomiast mechanizm działania pueraryny jest ciągle niezny. Wiadomo, że pueraryny stymulują proces tworzenia się kości [3], działają jak czynnik wzrostu [4], powodują rozszerzenie się naczyń krwionośnych [5, 6] i polepszają lipidogram [7, 8]. Zauważono również, że biorą one udział w kontrolowaniu glikemii. Badania przeprowadzone przez Hsu i wsp. pokazują, że suplementacja puerarynami obniża poziom glukozy w osoczu u szczurów (szczep: *Wistar Kyoto*) i podwyższa poziom glukozy w mięśniach szkieletowych [9]. Wyniki te sugerują, że pueraryny ułatwiają wychwyt glukozy u szczurów z cukrzycą, a właściwość ta może być wykorzystana również u zwierząt bez cukrzycy. Badania przeprowadzone przez Meezan i wsp. sugerują, że zastosowanie pueraryn u myszy z nadwagą (tzw. ob/ob mice) polepsza tolerancję glukozy u tych zwierząt [10]. Najprawdopodobniej ekstrakt z korzeni ołownika łątkowatego może regulować poziom glukozy w osoczu, oddziałując na ekspresję transporterów glukozy, np. SGLT-1 i GLUT-2, w jelicie lub poprzez aktywację receptora PPAR-gamma, który odgrywa kluczową rolę w kontroli ekspresji i różnicowaniu genów związanych z tkanką tłuszczową (wpływa np. na różnicowanie się preadipocytów). Ponadto pueraryny polepszają pamięć i łagodzą dokuczliwe objawy menopauzalne, postmenopauzalne i andropauzalne, co potwierdziły badania przeprowadzone przez Zhao i wsp. [11, 12].

Metabolizm alkoholu w organizmie przebiega z udziałem enzymu: dehydrogenazy alkoholowej, która katalizuje reakcję przemiany etanolu do aldehydu octowego w wątrobie. Aldehyd ten jest od 10 do 30 razy bardziej toksyczny dla organizmu od etanolu i wywołuje objawy zatrucia, spadek ciśnienia tętniczego, duszności, arytmii i wymioty. Patologiczne gromadzenie się bardzo reaktywnego aldehydu octowego na skutek spożycia zbyt dużej ilości alkoholu umożliwia tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy aldehydem i białkami błonowymi, co w konsekwencji może powodować uszkodzenie lub śmierć komórek. Powstający aldehyd po pewnym czasie jest utleniany w mitochondriach przez dehydrogenazę acetaldehydową do kwasu octowego, a powstający produkt jest włączany w cykl Krebsa. Reakcja tworzenia kwasu octowego z aldehydu jest jednak znacznie wolniejsza od reakcji powstawania aldehydu z etanolu i w

związku z tym stężenie aldehydu octowego utrzymuje się dość długo w organizmie, a stan ten nazywany jest w języku kolokwialnym: kacem. Długotrwałe spożywanie etanolu prowadzi do alkoholizmu, czyli uzależnienia psychicznego, w którym w centralnym układzie nerwowym (CUN) dochodzi do stymulacji procesów wywołujących subiektywne doznanie przyjemności, zmniejszenie poczucia strachu, efekt antystresowy. Efekt ten jest stymulowany w mózgu w tzw. „systemie nagrody” i odbywa się na skutek oddziaływania neurotransmiterów: dopaminy i serotoniny z receptorami GABA-ergicznymi w neuronach. Etanol poprzez oddziaływanie z receptorami GABA powoduje uwalnianie dopaminy i endorfin, co odpowiada za powstawanie uczucia „nagrody” w mózgu. Podobne działanie tzn. zdolność do oddziaływania z receptorami GABA wykazują inne używki takie jak: kokaina, morfina, nikotyna, opioidy i również one powodują uwalnianie dopaminy i endorfin, a w konsekwencji „stan nagrody”.

Właściwości antytoksykacyjne ekstraktu z *Pueraria lobata* są znane od wielu lat. Badania przeprowadzone przez różne laboratoria potwierdzają wpływ pueraryny, daidzeiny i daidziny na farmakokinetykę alkoholową i zachowanie osób będących pod wpływem alkoholu.

Szczury, którym podaje się dużą ilość etanolu doprzętykowo lub jego niewielką dawkę dootrzewnowo szybko tracą zdolność do normalnych odruchów, kładą się na plecach, a tym samym są w stanie upojenia alkoholowego. Badania przeprowadzone przez Instytut Henan Medical w Chinach pokazują, że podawanie myszom surowego ekstraktu z *P. lobata* lub czystej daidziny, czy daidzeiny znacznie skraca czas upojenia alkoholowego. Czas upojenia alkoholowego u szczurów, którym podawano etanol w dawce 7g/kg masy ciała trwa 4.5h. Gdy tę samą dawkę alkoholu zmiesza się z daidzeiną (30mg/kg masy ciała) to czas upojenia alkoholowego skraca się do 3h [13]. Pomiary zmian stężeń alkoholu we krwi (BAC - blood alcohol concentration) w kilku odstępach czasowych wskazują na odmienne osiąganie maksimum BAC u szczurów, którym podawano sam alkohol i u tych, którym podawano alkohol zmieszany z daidzeiną. Stężenie to szybko rośnie w pierwszych 30 minutach w grupie kontrolnej i utrzymuje się na maksymalnym poziomie przez 4.5h, a następnie gwałtownie spada do wartości mniejszej niż 40% wartości szczytowej (w 5h po spożyciu alkoholu). W przeciwieństwie do grupy kontrolnej u szczurów, którym oprócz alkoholu podaje się również daidzeinę, stężenie alkoholu we krwi rośnie wolniej i wzrost ten trwa 90 min. Następnie spadek tego stężenia następuje znacznie wolniej niż w grupie kontrolnej [13]. Badania te wykazały, że daidzeina jest skuteczna w zwalczaniu upojenia alkoholowego poprzez hamowanie zmian stężenia alkoholu we krwi poprzez opóźnianie opróżniania żołądka, ale nie poprzez zwiększanie klirensu etanolu w krążeniu.

Izoflawonoidy zawarte w korzeniu kudzu wpływają również na zmniejszenie ilości spożywanego alkoholu przez alkoholików. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono następujące doświadczenie, do którego użyto zmodyfikowaną genetycznie linię szczurów, mocno uzależnionych od alkoholu [14]. W eksperymencie tym szczury miały do dyspozycji dwie butelki: jedną z wodą i drugą z 10% etanolem. Szczury były trzymane w oddzielnych klatkach. Używane izoflawonoidy były ważone i mieszane z 1 g wilgotnego pożywienia. Mieszaninę tę granulowano i suszono na powietrzu. Podobnie granulowano i suszono mieszaninę bez izoflawonoidu. Pierwszego dnia z każdej z klatek zostało zabrane rano jedzenie i 12 godzin później (wieczorem) szczurom podano 1 g odpowiedniego granulatu. W ciągu ok. 2 min. zwierzęta zjadały granulaty i następnie wstawiano do każdej klatki z powrotem koszyk z jedzeniem, tak by zwierzęta miały wolny dostęp do żywności, wody i 10% alkoholu. Eksperyment ten powtarzano przez kilkanaście dni. Od 14 dnia wszystkim zwierzętom podawano przez kolejne 7 dni tylko kontrolny granulaty (bez izoflawonoidu). Miało to na celu sprawdzenie, czy nastąpi odwrotne działanie leku. Żaden z izoflawonoidów (daidzin, daidzeina i pueraryna) nie powodowały toksycznego działania, zwierzęta normalnie przybierały na wadze aż do 21 dnia. Doświadczenie pokazało, że przed zastosowaniem terapii zwierzęta spożywały dziennie od 6 do 9 g etanolu/kg masy ciała. Dzielne spożycie alkoholu znacznie spadło gdy zwierzętom zaczęto podawać daidzeinę i daidzinę. Już pierwszego dnia od podania jednego z tych izoflawonoidów zauważono spadek spożycia alkoholu. Spadek spożycia alkoholu wiązał się ze zwiększeniem ilości spożywanej wody, dziennie spożycie płynów pozostawało więc wciąż na tym samym poziomie. Doświadczenie to wskazuje również na fakt, że spadek spożycia alkoholu nie jest związany ze spadkiem

zapotrzebowania na płyny (pragnieniem). Zaprzeszanie podawania granulatu z izoflawonoidem powodowało powrót do nałogu. Zwierzęta spożywały wówczas tyle samo alkoholu, co przed rozpoczęciem leczenia. Dzielne spożywanie pokarmów przez cały okres trwania doświadczenia nie ulegało zmianom. Pueraryna również powodowała zmniejszenie ilości spożywania alkoholu, ale wykazywała ona ten efekt dopiero przy dużej dawce (większej niż 30 mg/kg masy ciała). Gdy zwierzętom podawano izoflawonoidy w dawce 100 mg/kg masy ciała ich efektywność zmniejszania spożywania alkoholu zachodziła w następującym porządku daidzeina > daidzina > pueraryna [14].

Badania przeprowadzone przez Maria P. Arofo wykazały zdolność daidzinu do hamowania dehydrogenazy-2 aldehydowej (ALDH-2), enzymu wątrobowego odpowiedzialnego za usuwanie produktu przemiany etanolu tzw. aldehydu octowego. W momencie inhibicji tego enzymu następuje gromadzenie się aldehydu octowego, a w konsekwencji pojawienie się tzw. „kaca” i spadek zainteresowania dalszym spożywaniem alkoholu [15].

Mechanizm hamowania spożywania alkoholu przez te izoflawonoidy jest niepoznany. Chociaż opóźnienie opróżniania żołądka może częściowo być wynikiem spadku spożywania etanolu, to uzupełnianie płynów poprzez spożywanie wody i brak wpływu na spożywanie pokarmów sugeruje, że nie ma to większego znaczenia. Powrót do nałogu po przestaniu stosowania izoflawonoidów sugeruje, że nieprawdziwa jest hipoteza mówiąca, że związki zawarte w ekstrakcie z kudzu powodują wyłącznie niechęć „smakową” do spożywania alkoholu. Być może efekt ten jest bardziej etanolo-specyficzny, tzn. związki te powodują zmiany czynników smakowych lub wpływają na centralny system nerwowy i hamują neurotransmitteromodulujący system odpowiedzi na etanol w tzw. „systemie nagrody” [16]. Najprawdopodobniej więc ekstrakt z korzenia kudzu jest skuteczny nie tylko w walce z alkoholizmem, ale również z innymi używkami takimi jak: nikotyna, opioidy, kokaina, które poprzez oddziaływanie z receptorami GABA i uwalnianie endorfin wpływają na „system nagrody” w mózgu.

[1] Keung WM, Vallee BL. Kudzu root: an ancient Chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry* 1998;47(4):499–506.

[2] Fang C, Wan X, Tan H, Jiang C. Separation and determination of isoflavonoids in several kudzu samples by high-performance capillary electrophoresis (HPCE). *Ann Chim* 2006;96(1–2):117–124.

[3] Zhang Y, Zeng X, Zhang L, Zheng X. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/Akt pathway in rat calvaria osteoblasts. *Planta Med* 2007;73(4):341–347.

[4] Chen HT, Yao CH, Chao PD, Hou YC, Chiang HM, Hsieh CC, et al. Effect of serum metabolites of *Pueraria lobata* in rats on peripheral nerve regeneration: In vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007

[5] Sun XH, Ding JP, Li H, Pan N, Gan L, Yang XL, et al. Activation of large-conductance calcium-activated potassium channels by puerarin: the underlying mechanism of puerarin-mediated vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323(1):391–397.

[6] Yeung DK, Leung SW, Xu YC, Vanhoutte PM, Man RY. Puerarin, an isoflavonoid derived from *Radix puerariae*, potentiates endothelium-independent relaxation via the cyclic AMP pathway in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol* 2006;552(1–3):105–111.

[7] Yan LP, Chan SW, Chan AS, Chen SL, Ma XJ, Xu HX. Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Life Sci* 2006;79(4):324–330.

[8] Guan L, Yeung SY, Huang Y, Chen ZY. Both soybean and kudzu phytoestrogens modify favorably the blood lipoprotein profile in ovariectomized and castrated hamsters. *J Agric Food Chem* 2006;54(13):4907–4912.

[9] Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod* 2003;66(6):788–792.

- [10] Meezan E, Meezan EM, Jones K, Moore R, Barnes S, Prasain JK. Contrasting effects of puerarin and daidzin on glucose homeostasis in mice. *J Agric Food Chem* 2005;53(22):8760–8767.
- [11] Xu XH, Zhao TQ. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23(7):587–590.
- [12] Xu X, Zhang Z. Effects of puerarin on synaptic structural modification in hippocampus of ovariectomized mice. *Planta Med* 2007;73(10):1047–1053.
- [13] Xie C-I, Lin RC, Antony V, et al. Daidzin, an antioxidant isoflavonoid, decreases blood alcohol levels and shortens sleep time induced by ethanol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994;18:1443–7.
- [14] Li TK, Lumeng L, Doolittle DP. Selective breeding for alcohol preference and associated responses. *Behav Genet* 1993;23:163–70.
- [15] Alcoholism, Clinical and Experimental Research; Suppression of Heavy Drinking and Alcohol Seeking by a Selective ALDH-2 Inhibitor; Arolfo MP et al.; 2009
- [16] Lin RC, Li TK. Effects of isoflavones on alcohol pharmacokinetics and alcohol-drinking behavior in rats. *Am J Clin Nutr* 1998;68(suppl):1512S–5S.