

HCL-indukowana hemoliza erytrocytów w ocenie potencjału antyoksydacyjnego wyciągu z liści *Begonia foliosa* Kunth (Begoniaceae)

Streszczenie: Celem przeprowadzonych przez nas badań była analiza *in vitro* oporności erytrocytów przy wykorzystaniu metody HCL-indukowanej hemolizy w ocenie potencjału antyoksydacyjnego wyciągu z liści *Begonia foliosa* Kunth przy inkubacji z suspensją (zawiesiną) erytrocytów krwi koni. Materiał do badań zebrano w Narodowym Ogródku Botanicznym im. M.M. Gryshko (NOB) Państwowej Akademii Nauk Ukrainy (Kijów, Ukraina). Świeżo zebrane liście umyto, zważono i rozdrobniono w homogenizatorze w 96% etanolu (w proporcji 1:19) w temperaturze pokojowej. W celu oznaczenia właściwości antyoksydacyjnych, w kolejnym etapie inkubowano ekstrakt z suspensją erytrocytów. W wyniku naszych badań zaobserwowaliśmy wyższy poziom HCL-indukowanej hemolizy erytrocytów koni po inkubacji z wyciągiem z liści *B. foliosa*. Znaczące zmniejszenie oporności erytrocytów na działanie kwasu solnego po inkubacji z wyciągiem z liści *B. foliosa* wskazuje na działanie prohemolityczne i toksyczność ekstraktu w badanej dawce (500 mg/mL). Przypuszczamy, że efekt prohemolityczny wyciągu z liści *B. foliosa* jest spowodowany wysoką dawką ekstraktu, ponieważ składniki fitochemiczne roślin z rodzaju *Begonia* są znane jako związki odpowiedzialne za różne działania, takie jak przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwnowotworowe. Otrzymane przez nas wyniki są dobrym fundamentem do kontynuowania badań w celu dokładniejszego poznania właściwości leczniczych begonii. Przyszłe prace będą interesujące pod względem poznania składu chemicznego i lepszego zrozumienia mechanizmów działania antyoksydacyjnego, które wykazują ekstrakty różnych gatunków roślin tropikalnych i subtropikalnych do opracowania jako leki do zastosowania profilaktycznego i terapeutycznego w medycynie i weterynarii.

Wstęp

Tropikalne i subtropikalne rośliny zawierające przeciwutleniacze stały się w ostatnim czasie obszarem badań naukowych, ponieważ wykazują znaczące korzyści zdrowotne przy różnych działaniach farmakologicznych. *Begonia* L. to bardzo mocno zróżnicowany rodzaj zawierający ponad 1800 gatunków, z bardzo wysokim odsetkiem mikroendemii i źródeł różnorodności w Andach i Azji Południowo-Wschodniej [Hughes i in. 2018]. Pierwszy gatunek begonii został spro-

wadzony do Europy w XVIII wieku, a następnie wprowadzono ponad 400 gatunków naturalnych dla ogrodnictwa i opracowano wiele odmian [Tebbutt 2005]. Begonie są jednymi z najpopularniejszych roślin ozdobnych na świecie dzięki dużym, efektownym i długotrwałym wielokolorowym kwiatom, od białego do różowego, czerwonego i żółtego [Twyford i in. 2014]. Są one używane jako rośliny ogrodowe i rośliny doniczkowe, w wiszących koszach i jako kwiaty szklarniowe, a także jako zioła lub warzywa liściaste w wielu częściach świata. Wiadomo, że korzenie i bulwy niektórych gatunków mają działanie przeciwdrobnoustrojowe i są stosowane w leczeniu różnych dolegliwości [Sakhanokho i in. 2013]. W naszych poprzednich badaniach [Tkachenko i in. 2016, 2017, Buyun i in. 2018] dokonaliśmy oceny właściwości antybakteryjnych etanolowych ekstraktów z liści niektórych gatunków begonii (*B. solimutata* L.B. Sm. & Wassh., *B. goegoensis* N.E.Br., *B. foliosa* Kunth, *Begonia* × *bunchii* L.H. Bailey, *B. thiemei* C.DC., *B. peltata* Otto & Dietr., *B. heracleifolia* Cham. & Schltldl., *B. dregei* Otto & Dietr., *B. mexicana* G. Karst. ex Fotsch.) wobec Gram-dodatnich i Gram-ujemnych szczepów bakterii oraz właściwości antyoksydacyjnych w modelach krwi koni i tkanki mięśniowej pstrąga tęczowego [Tkachenko i in. 2017, Buyun i in. 2018].

Ekstrakty z wielu roślin również mogą indukować tworzenie się methemoglobiny i powodować hemolizę erytrocytów przez działanie związków, które powstają na skutek degradacji utlenionych lipidów i białek. Testy *in vitro* stosowane w wielu badaniach [Boyer i in. 2002, Walter i in. 2014] dostarczają przydatnej metody diagnostycznej do szybkiej identyfikacji czynników utleniających z różnych źródeł.

Celem przeprowadzonych przez nas badań była analiza *in vitro* oporności erytrocytów wykorzystując metodę HCl-indukowanej hemolizy w ocenie potencjału antyoksydacyjnego wyciągu z liści *Begonia foliosa* Kunth przy inkubacji z suspensją (zawiesiną) erytrocytów krwi koni.

Materiały i metody badań

Zbiór materiału roślinnego. Liście roślin *Begonia foliosa* Kunth (ryc. 1), uprawiane w warunkach szklarniowych w Narodowym Ogrodzie Botanicznym im. M. M. Gryshko, który należy do Narodowej Akademii Nauk Ukrainy, pobrane zostały w kwietniu 2017 roku. Wszystkie zasoby roślin tropikalnych i subtropikalnych (w tym begonie) posiadają Status Dziedzictwa Narodowego Ukrainy. Wszystkie zebrane liście zostały wykorzystane do laboratoryjnych badań *in vitro* oceniających ich działanie antyoksydacyjne i antyhemolityczne.



Ryc. 1. Zdjęcie liście *Begonia foliosa* Kunth wykorzystane w ocenie *in vitro* ich właściwości antyhemolitycznych. Wszystkie próbki roślin są uprawiane w warunkach szklarniowych w Narodowym Ogrodzie Botanicznym im. M.M. Gryshko Państwowej Akademii Nauk Ukrainy (Kijów, Ukraina). Zdjęcie: L.I. Buyun.

Przygotowanie ekstraktów roślinnych. Wyciągi z umytych i rozdrobnionych w homogenizatorze liści przygotowano na 0,1M buforze fosforanowym (pH 7,4) w stosunku 1:19. W kolejnym etapie ekstrakty zostały przefiltrowane. Do momentu użycia wszystkie wyciągi przechowywano w temperaturze -20°C.

Pobranie próbek krwi koni. Do badań wykorzystano próbki krwi osiemnastu zdrowych, dorosłych koni (średnia wieku $9,5 \pm 2,4$ lata) z prywatnej stajni koni w Strzelinku koło Słupska, gdzie znajduje się stajnia "Pod Żelazną Podkówną" – Dolina Charlotty (Pomorze Środkowe). Krew do badań pobierano do probówek z K₃-EDTA z żyły szyjnej koni rano, 90 minut po karmieniu, podczas gdy konie były w stajni (między 8:30 a 10 rano). Krew po pobraniu wirowano przy 3000 obr./min w czasie 15 min. Suspensję erytrocytów otrzymano po trzykrotnym przepłukaniu osadu schłodzonym 0,1M buforem fosforanowym (pH 7,4).

Określenie właściwości antyhemolitycznych wyciągów roślin. W celu oznaczenia właściwości pro- lub antyoksydacyjnych wyciągów z liści roślin, suspensje erytrocytów inkubowano z wyciągiem z liści *Begonia foliosa* (w stosunku objętościowym 9:1) przez 60 min. Próby kontrolne inkubowano z 0,1M buforem fosforanowym (pH 7,4). Po 60-minutowej inkubacji w 37°C w zawiesinie erytrocytów została indukowana hemoliza kwasowa.

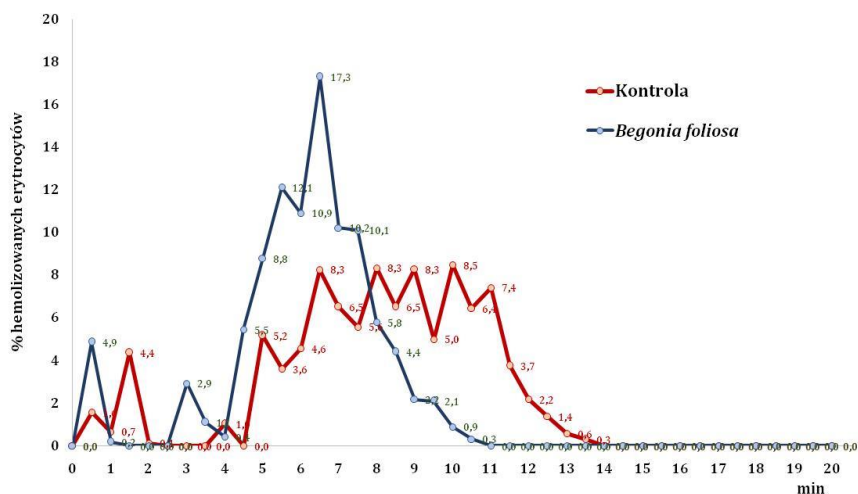
HCl-indukowaną hemolizę (kwasowa odporność erytrocytów) mierzono spektrofotometrycznie [Terskov i Hitelzon 1957]. Oceniono również rozmiar, kształt i wybarwienie erytrocytów krwi obwodowej, metodą panoptyczną Pappenheima, z wykorzystaniem barwnika Maya i Grünwalda (jest równocześnie

utrwalaczem) oraz barwnika Giemsy (zmodyfikowany barwnik Romanowskiego) [Demińska-Kieć i Naskalski 2013].

Analiza statystyczna wyników badań. Otrzymane wyniki przeanalizowano statystycznie programem STATISTICA 8.0 (StatSoft, Polska). Normalność rozkładu danych sprawdzono za pomocą kryteriów Shapiro-Wilka i Lillieforsa oraz testu Kołmogorowa-Smirnowa ($p > 0,05$). Obliczono średnią i błąd statystyczny średniej [Zar 1999].

Wyniki badań i dyskusja

Erytrogramy HCl-indukowanej hemolizy erytrocytów krwi koni po inkubacji w wyciągu z liści *B. foliosa* przedstawione na ryc. 2.



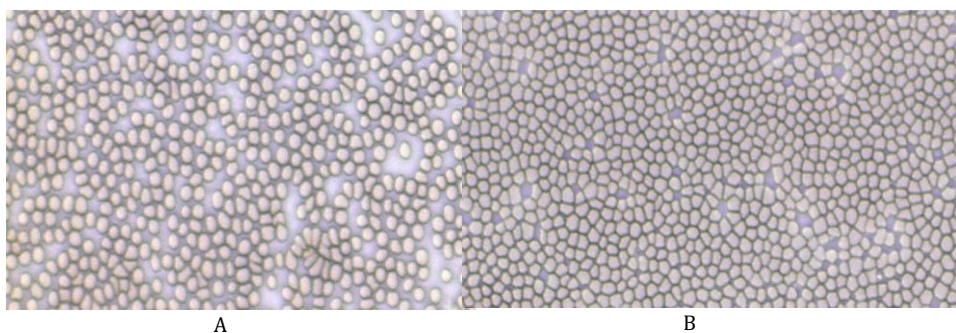
Ryc. 2. HCl-indukowana hemoliza erytrocytów w jednostce czasu krwi koni po inkubacji z wyciągiem z liści *Begonia foliosa*.

Źródło: opracowanie własne.

Erytrogram ma kształt dwufazowy. Hemoliza puli "starych" erytrocytów w próbce krwi inkubowanej z wyciągiem z liści *B. foliosa* następuje po upływie 30 sekund od początku HCl-indukowanej hemolizy (procent hemolizowanych erytrocytów wynosił 4,9%). Procent hemolizowanych "starych" erytrocytów w próbce kontrolnej zaobserwowano na niższym poziomie: 30 sekund – 1,6%, 1,5 minuty – 4,4%. Druga faza hemolizy próbki krwi inkubowanej z wyciągiem liści *B. foliosa* charakteryzowała się 2,9% hemolizowanych erytrocytów (3 min.), procent hemolizowanych erytrocytów w fazie drugiej w próbce kontrolnej zaob-

serwowano na dużo niższym poziomie: 4 minuta – 1,0%. Trzecia faza HCl-indukowanej hemolizy w próbce kontrolnej charakteryzowała się maksymalnym procentem hemolizowanych erytrocytów 8,5% (10 minuta) oraz 8,3% (6,5 oraz 8 i 9 minuta). Maksymalny procent hemolizowanych erytrocytów (17,3%) zaobserwowano w 6,5 minuty od początku hemolizy. Natomiast znacznie niższy procent maksymalnej hemolizy (10,02%) zaobserwowano w 7 minucie HCl-indukowanej hemolizy. Koniec hemolizy w próbce krwi po inkubacji z wyciągiem z liści *B. foliosa* nastąpił w 11 minucie, a w próbce kontrolnej – w 13,5 minucie. Wyciąg z liści *B. foliosa* po inkubacji z zawiesiną erytrocytów krwi końskiej powoduje większy odsetek hemolizy (17,3%) w porównaniu do próbki kontrolnej (8,5%), hemoliza w której następuje wcześniej o 2,5 minuty (ryc. 2).

Morfologia krwi koni po inkubacji z wyciągiem z liści *B. foliosa* nie wykazała zmian kształtu i wielkości erytrocytów (ryc. 3).



Ryc. 3. Morfologia erytrocytów krwi koni (A) oraz po inkubacji z wyciągiem z liści *B. foliosa*
Źródło: opracowanie własne.

Uzyskane wyniki jednoznacznie ukazują, że użyta dawka wyciągu z liści *Begonia foliosa* (500 mg/mL) wywołuje hemolizę erytrocytów krwi koni. *B. foliosa* w użytej dawce ekstraktu wykazuje działanie prohemolityczne. W związku z tym powinny być prowadzone dalsze badania, które pozwolą na weryfikację idealnej dawki, ponieważ składniki fitochemiczne roślin z rodzaju *Begonia* są znane jako związki odpowiedzialne za działania przeciwutleniające. Otrzymane przez nas wyniki są dobrym fundamentem do kontynuowania badań w celu dokładniejszego poznania właściwości leczniczych begonii.

Literatura

Boyer J.D., Breeden D.C., Brown D.L. 2002: *Isolation, identification, and characterization of compounds from acer rubrum capable of oxidizing equine erythrocytes*. Am. J. Vet. Res., 63(4): 604-610.

- Buyun L., Tkachenko H., Osadowski Z. 2018: *In vitro* assessment of antioxidant effect of *Begonia rex* Putz. leaf extract on oxidative stress biomarkers in the equine erythrocytes model. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, (2): 94-110.321.
- Dembińska-Kieć A., Naskalski J. 2013: *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*. Elsevier Urban&Partners, Wrocław.
- Hughes M., Peng C.I.2, Lin C.W., Rubite R.R., Blanc P., Chung K.F. 2018: *Chloroplast and nuclear DNA exchanges among Begonia sect. Baryandra species (Begoniaceae) from Palawan Island, Philippines, and descriptions of five new species*. *PLoS One*, 13(5): e0194877.
- Sakhanokho H.F., Pounders C.T., Blythe E.K. 2013: *Alginate encapsulation of Begonia microshoots for short-term storage and distribution*. *ScientificWorldJournal*, 2013: 341568.
- Santos-Buelga C., Scalbert A. 2000: *Proantocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 1094-1117.
- Tebbitt M.C., 2005: *Begonias: cultivation, natural history and identification*. Portland, Timber Press.
- Terskov I.A., Gitelson I.I. 1957: *Method of chemical (acid) erythrograms*. *Biofizika*, 2: 259-266.
- Tkachenko H., Buyun L., Osadowski Z. 2017: *The antimicrobial properties of extracts obtained from Begonia goegoensis N.E.Br. leaf against Pseudomonas aeruginosa isolates*. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*, 1: 454-460.
- Tkachenko H., Buyun L., Osadowski Z., Belayeva Y. 2016: *In vitro* microbiological investigation of ethanolic extracts obtained from leaves of various *Begonia* species against *Escherichia coli*. *Słupskie Prace Biologiczne*, 13: 277-294.
- Tkachenko H., Buyun L., Witaszek M., Pażontka-Lipiński P., Osadowski Z. 2017: *Hemolysis of equine erythrocytes from exposure to leaf extracts obtained from various Begonia L. species*. *Słupskie Prace Biologiczne*, 14: 253-270.
- Twyford A.D., Kidner C.A., Ennos R.A. 2014: *Genetic differentiation and species cohesion in two widespread Central American Begonia species*. *Heredity (Edinb)*, 112(4): 382-390.
- Walter K.M., Moore C.E., Bozorgmanesh R., Magdesian K.G., Woods L.W., Puschner B. 2014: *Oxidant-induced damage to equine erythrocytes from exposure to Pistacia atlantica, Pistacia terebinthus, and Pistacia chinensis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 26(6): 821-826.
- Zar J.H. 1999: *Biostatistical Analysis*, 4th ed., Prentice Hall Inc., New Jersey.

HCL-induced hemolysis of erythrocytes in evaluating the antioxidant potential of the *Begonia foliosa* Kunth leaf extract (Begoniaceae)

Summary: The aim of our research was the *in vitro* analysis of erythrocyte resistance using the HCL-induced hemolysis method in assessing the antioxidant potential of the *Begonia foliosa* Kunth leaf extract when incubated with the suspension of equine blood erythrocytes.

The leaves of *B. foliosa* plants, cultivated under glasshouse conditions, were sampled at M.M. Gryshko National Botanical Garden (NBG), National Academy of Science of Ukraine. Freshly leaves were washed, weighted, crushed, and homogenized in 0.1M phosphate buffer saline solution (pH 7.4) (in proportion 1:19, w/w) at room temperature. Blood was drawn from jugular veins of the horses in the morning, 90 minutes after feeding, while the horses were in the stables (between 8:30 and 10 AM). Blood was stored into tubes with sodium citrate and held on the ice until centrifugation at 3,000 rpm for 5 min. Erythrocytes aliquots were used in the study. To evaluate the extract' potential to cause hemolysis in equine erythrocytes, a hemolysis assay based on the spectrophotometric measurement of hemoglobin in the supernatant was performed. A volume of 0.1 ml of the extract was added to 1.9 ml of clean equine erythrocytes. After incubation the mixture at 37°C for 60 min with continuous stirring. The anti-hemolytic activity was assessed by measuring the absorbance at 540 nm. For positive control (phosphate buffer) were used. In our study, a higher level of HCl-induced hemolysis of equine erythrocytes after incubation with *B. foliosa* leaf extract was observed. Significant reduction of erythrocyte resistance to hydrochloric acid after incubation with *B. foliosa* leaf extract indicates hemolytic effect and toxicity of the extract at the tested dose (500 mg per mL). We suppose that the hemolytic effect of *B. foliosa* leaf extract is caused by a high dose of extract because the phytochemical ingredients of *Begonia* plants are known as compounds responsible for various activities, i.e. antioxidative, antibacterial, antifungal and antineoplastic. The results obtained are a good foundation for continuing our research. Further studies aimed at the isolation and identification of active substances from the various species of *Begonia* genus, as well as an assessment of the hemolysis in the equine erythrocytes' model, could also disclose compounds with better therapeutic value and doses. We believe that screening of all the investigated plants for other biological activities including antimicrobial and antioxidant activities is essential and may be effective for searching the preventive agents in the pathogenesis of some metabolic diseases.

Keywords: antioxidant potential, *Begonia foliosa* Kunth, leaf extract