

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Tadeusz Krzaczek

Anna SOKOŁOWSKA-WOŹNIAK

**Badanie aktywności cytostaticznej frakcji laktonowej
Alchemilla pastoralis Bus.**

Исследование цитостатической активности лактоновой фракции
Alchemilla pastoralis Bus.

Investigations in the Cytostatic Activity of Lacton Fraction
of *Alchemilla pastoralis* Bus.

Alchemilla pastoralis Bus. dostarcza surowca zielarskiego rzadko obecnie używanego w leczeniu w postaci ziela, zawierającego garbniki i substancje gorzkie (1). W r. 1974 firma Gradstein Irene Fr. Demande (2) patentuje preparat dermatologiczny, w skład którego wchodzi wyciąg z przywrotnika.

Badania skriningowe wyciągów z ziela *Alchemilla micans* Bus., a zwłaszcza wyciągu acetonowego, wskazują na wysoką aktywność cytostaticzną i sugerują poszukiwanie laktonów (3, 4) w rodzaju *Alchemilla*. Dane te uzasadniają poszukiwanie frakcji czynnych cytostaticznie w ziele przywrotnika pasterskiego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło wysuszone ziele przywrotnika w ilości 1523 g. Izolowanie frakcji laktonowej przeprowadzono według metody Mabry'ego (5). Rozdrobniony surowiec odtłuszczono w aparacie Soxhleta dwusiarczkiem węgla, następnie ekstrahowano w aparacie Soxhleta chloroformem. Ekstrakt chloroformowy odparowano do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w 500 cm³ etanolu absolutnego i zmieszano z 550 cm³ 4% wodnego roztworu octanu ołowowego. Po 24 godz. wytrącony osad odsączono przez bibułę filtracyjną. Z przesączu w wyparce próżniowej usunięto etanol, po czym odtłuszczono dodatkowo eterem naftowym. Następnie wymyło wyczerpująco chloroformem. Ekstrakt chloroformowy odparowano w wyparce próżniowej do sucha. Otrzymano 4,450 g suchej pozostałości — frakcja laktonowa (5, 6).

Analizę jakościową otrzymanych laktonów wykonano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym G Merck (7). Badania przeprowadzono jednocześnie w 2 układach rozpuszczalników:

I — eter etylowy,

II — chloroform — aceton (9:1).

Do wywoływania chromatogramów zastosowano 5 odczynników selektywnie barwiących laktony (7, 8):

A — 1% metanolewy roztwór rezorcyny + 5% H_3PO_4 (1:1),

B — 2% metanolewy roztwór rezorcyny + 2% H_2SO_4 (1:1),

C — 1% metanolewy roztwór fruktozy + 2% H_2SO_4 (1:1),

D — 0,05 cz. $FeCl_3$ + 62,5 cz. H_3PO_4 + 37,5 cz. H_2SO_4 ,

E — 0,5% metanolewy roztwór $NaNO_2$ + 10% H_2SO_4 (1:1).

Wywołane chromatogramy ogrzewano 2—4 min. w temp. 110°C. Wyniki podano w tab. 1.

Tab. 1. Wyniki chromatografii cienkowarstwowej frakcji laktonów *Alchemilla pastoralis* Bus.

Results of thin layer chromatography of lactons fractions *Alchemilla pastoralis* Bus.

$R_f \times 100$		Zabarwienie plam po spryskaniu odczynnikami				
eter	chloroform aceton	A	B	C	D	E
45	-	z	r	r	f	f
36	-	-	-	-	ż	r
34	-	r	-	sz	-	b
-	32	ż	-	-	-	f
28	-	-	-	-	p	b
-	25	r	r	r	ż	r
22	-	p	-	f	-	r
-	20	-	-	-	r	br
18	-	-	p	n	br	br
-	17	-	-	-	r	f
-	15	b	ż	z	r	br
-	13	-	-	f	-	sztr
11	-	-	szz	szr	szbr	szf
-	10	p	p	szr	z	-
-	7	-	sz	szz	szbr	-
5	-	szbr	-	szf	-	-
-	4	szz	szz	szbr	p	-

Objaśnienia: z — zielone, r — różowe, ż — żółte, f — fioletowe, br — brązowe, sz — szare, p — pomarańczowe, szbr — szarobrązowe, szz — szarozielone, szf — szarofioletowe, szr — szaroróżowe, b — beżowe, n — niebieskie.

Explanation: z — green, r — pink, ż — yellow, f — violet, br — brown, sz — grey, p — orange, szbr — grey-brown, szz — grey-green, szf — grey-violet, szr — grey-pink, b — beige, n — blue.

Do badań aktywności cytostatycznej przygotowano roztwory laktonów o stężeniach: 0,03, 0,05, 0,075, 0,1, 0,3 i 0,5%. Aktywność badanych roztworów określano przy pomocy testu fitobiologicznego Levana (9), wykorzystując korzenie przybyszowe cebuli *Allium cepa* L., wyrosłe w kulturze wodnej. Cebule z korzeniami, długości 1—2 cm, dzielono podłużnie na połowy, jedną umieszczano w roztworze (grupa doświadczalna), drugą — w wodzie wodociągowej (grupa kontrolna). W tych warunkach cebule pozostawały przez 24 godz. Następnie badano przebieg mitozy. Kontrolowano również trwałość inhibicyjnego działania powyższych roztworów, przeprowadzając 24-godziną postinkubację. Badano także wpływ roztworów na wzrost liniowy korzeni, mierząc ich długość przed doświadczeniem i po 24 godz.

Do badań cytologicznych przygotowano preparaty rozgniatane, po 10 dla każdej grupy doświadczalnej i kontrolnej. Barwienie przeprowadzono metodą Feul-

gena (10). Obliczono indeks mitotyczny (IM), wyrażony średnią arytmetyczną ze średnim błędem dla każdej serii badań, oraz IM_{50} , czyli wartość stężenia roztworów, które obniżają o 50% ilość podziałów mitotycznych w porównaniu z kontrolą (11).

Wyzolowane laktony z ziela *Alchemilla pastoralis* B. u. s. poddano próbie smakowej na zawartość goryczy (FP IV).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki chromatografii cienkowsarstwowej izolowanej frakcji z ziela *Alchemilla pastoralis* B. u. s. wskazują na obecność w niej laktonów. Na chromatogramach, wywołanych odczynnikami selektywnie barwiącymi laktony, otrzymano co najmniej 10 plam o różnym zabarwieniu, wskazujących na ich laktonowy charakter (tab. 1). Przeprowadzone badania smakowe (FP IV) na zawartość goryczy dały negatywne wyniki. Można więc przypuszczać, że otrzymane substancje nie są laktonami gorzkimi.

Zbadano antymitotyczne właściwości laktonów, stosując wodne roztwory o stężeniach: 0,03, 0,05, 0,075, 0,1, 0,3, 0,5%. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że laktony hamują wzrost liniowy oraz wywołują zaburzenia w podziałach mitotycznych. Korzenie przybyszowe *Allium cepa* L., inkubowane przez 24 godz. w badanych roztworach, nie zmieniły swojej barwy ani turgoru. Wystąpiło natomiast bardzo wyraźne zahamowanie wzrostu korzeni na długość, tym większe, im wyższe było stężenie (tab. 2). Działanie antymitotyczne laktonów również zależało od stężenia roztworów, w miarę jego zwiększania bowiem obniżał się indeks mitotyczny (tab. 2).

Najmniej aktywne okazało się najniższe stężenie laktonów — 0,03%. Zahamowanie przyrostu korzeni wynosiło 45%, a mitoz — 9%. Obrazy wszystkich figur mitotycznych były prawidłowe, nie odbiegające od kon-

Tab. 2. Wpływ laktonów z ziela *Alchemilla pastoralis* B. u. s. na wzrost liniowy (a) i podziały mitotyczne (b) w korzeniach *Allium cepa* L.
The effect of lactons from the herb *Alchemilla pastoralis* B. u. s. on the linear growth (a) and mitotic division (b) in roots of *Allium cepa* L.

Stężenie roztworu %	Przyrost korzeni cm	IM	Procent zahamowania	
			a	b
0,030	0,62	6,70 ± 2,07	45	9
0,050	0,51	4,98 ± 2,33	57	30
0,075	0,45	5,34 ± 0,99	63	54
0,100	0,12	1,62 ± 0,87	78	77
0,300	0,09	0,57 ± 0,16	88	91
0,500	0,02	—	97	100
woda	1,13	7,36 ± 2,06		
IM_{50}		0,0602 - 0,0605		

trolnych. Również przy stężeniu 0,05% zahamowanie przyrostu korzeni wynosiło 57%, a zahamowanie mitoz 30%. Większą aktywność wykazał roztwór o stężeniu 0,075%. W grupie tej procent zahamowania przyrostu liniowego korzeni cebuli wynosił 63, a hamowania mitoz 64. W preparatach mikroskopowych większość stadiów podziałowych pozostawała nie zmieniona. Tylko sporadycznie występowały figury, których wygląd różnił się od kontrolnych. Spotykano anafazy z charakterystycznymi mostkami chromosomowymi.

Roztwór 0,1% hamował już wzrost korzeni o 78%, wyraźnie wzrósł również procent hamowania mitoz do 77. Preparaty mikroskopowe tej grupy wykazują zaburzenia w przebiegu podziałów mitotycznych, przejawiające się zmienionymi obrazami stadiów podziałowych. Obserwowane zaburzenia obejmowały poszczególne etapy mitozy. W profazie występowały często chromosomy skrócone i pogrubiłe, natomiast w metafazie zdarzała się fragmentacja i skrócenie chromosomów (ryc. 1a). Najwięcej było widocznych zaburzeń w anafazie, spowodowanych najczęściej zakłóceniami wrzeczona kariokinetycznego (12). Wynikające z tego nieprawidłowości dawały obrazy zwane tropokinezą. Obserwowano zmienione obrazy anafazy, wynikające z niewłaściwego ułożenia chromosomów, zwane pseudoanafazą.

Wysoką aktywnością odznaczał się roztwór o stężeniu 0,3% laktonów. Stwierdzono, że 24-godzinne działanie tego roztworu zahamowało przyrost korzeni na długość — 88%, a mitoz — 91%. W preparatach tej grupy pojawiły się bardzo licznie komórki dwujądrowe połączone ze sobą, dając obraz pseudomitozy (ryc. 1c). Ich obecność świadczy o zakłóceniach w przebiegu cytokinezy. Spotykano telofazy z mostkiem chromosomowym oraz skrócone i pogrubiłe chromosomy w profazie (ryc. 1b).

Najaktywniejszym z badanych roztworów laktonów okazał się roztwór 0,5%, w którym wzrost korzeni uległ zahamowaniu w 97%. W preparatach cytologicznych stwierdzono całkowity brak podziałów, występowały jedynie komórki dwujądrowe.

Sprawdzono trwałość inhibicyjnego działania stężeń: 0,075, 0,1, 0,3%, przenosząc cebule po 24-godzinnym działaniu roztworu na następne 24 godz. do wody wodociągowej. Okazało się, że korzenie inkubowane uprzednio w roztworach 0,075 i 0,1% odzyskiwały zdolność do wzrostu i podziałów. Indeksy mitotyczne były tu podobne jak w grupach kontrolnych, a stadia mitotyczne — normalne, bez zaburzeń. Roztwór 0,3% prowadził do zmian trwałych, nie stwierdzono podziałów po 24-godzinnej postinkubacji w wodzie.

Obliczona wartość IM_{50} , wynosząca 0,0602—0,0605, wskazuje, jakie roztwory badanej frakcji laktonowej powodują obniżenie mitoz o 50%.

W porównaniu z innymi substancjami, jak kwas usninowy (13), o wartości IM_{50} równej 0,00021 lub z IM_{50} pipobromanu — 0,0107—0,0124 (14), aktywność cytostatyczna badanej frakcji laktonowej jest znacznie niższa.

PIŚMIENNICTWO

1. Ożarowski A.: Ziołolecznictwo. PZWL, Warszawa 1982.
2. Gradstein I. i wsp.: Phytotherapeutic Product with Dermatological Action. Chem. Abstr. 95873 z, 1977.
3. Grzycka K. i wsp.: Badanie aktywności biologicznej wybranych gatunków roślin kwiatowych. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D 33, 275, 1978.
4. Krzaczek T. i wsp.: Badanie aktywności cytostatycznej frakcji octanowej i etanolowej. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D 36, 125, 1981.
5. Mabry T. J.: Phytochemical Phylogeny. Ed. J. B. Harborne, Academic Press, London 1970.
6. Harborne J. B.: Phytochemical Methods. Champan and Hall, London 1978.
7. Błoszyk E., Drożdż B.: Sesquiterpene Lactones. Part XXII. Sesquiterpene Lactones in Species of the Genus *Chrysanthemum*. Acta Soc. Bot. Polon. 47 (1—2), 3, 1978.
8. Drożdż B.: Sesquiterpene Lactones. Part IV. Isolation of Cynarolide, a New Sesquiterpenic Lactone from the Leaves of *Cynarascolymus* L. Dissert. Pharm. Pharmacol. 20, 217, 1968.
9. Levan A.: The Effect of Colchicine on Root Mitoses in *Allium*. Hereditas 24, 471, 1938.
10. Broda B.: Metody histochemii roślinnej. PZWL, Warszawa 1971.
11. Broda B.: Przewodnik do obliczeń statystycznych w biologii. Akad. Med., Łódź 1976.
12. Goleniewska-Furmanowa M.: Działanie antymitotyczne związków zasadowych i wyciągów z liści *Cabombaceae*, *Namphaceae* i *Nelumbonaceae*. Acta Polon. Pharm. 26, 389, 1969.
13. Grzycka K.: Badanie aktywności biologicznej niektórych składników plechy *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. Acta Polon. Pharm. 36 (4), 481, 1979.
14. Andrzejewska-Golec E. i wsp.: Wpływ pipobromanu i innych pochodnych piperazyny na mitozę i kwasy nukleinowe w merystemie korzeniowym pszenicy (*Triticum aestivum* L.). Acta Polon. Pharm. 34, 531, 1977.

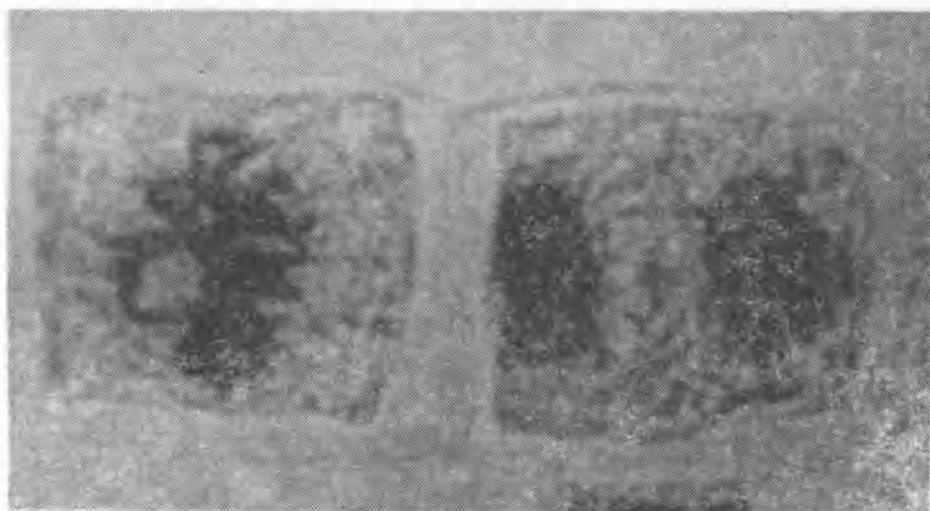
Otrzymano 12 IX 1984.

РЕЗЮМЕ

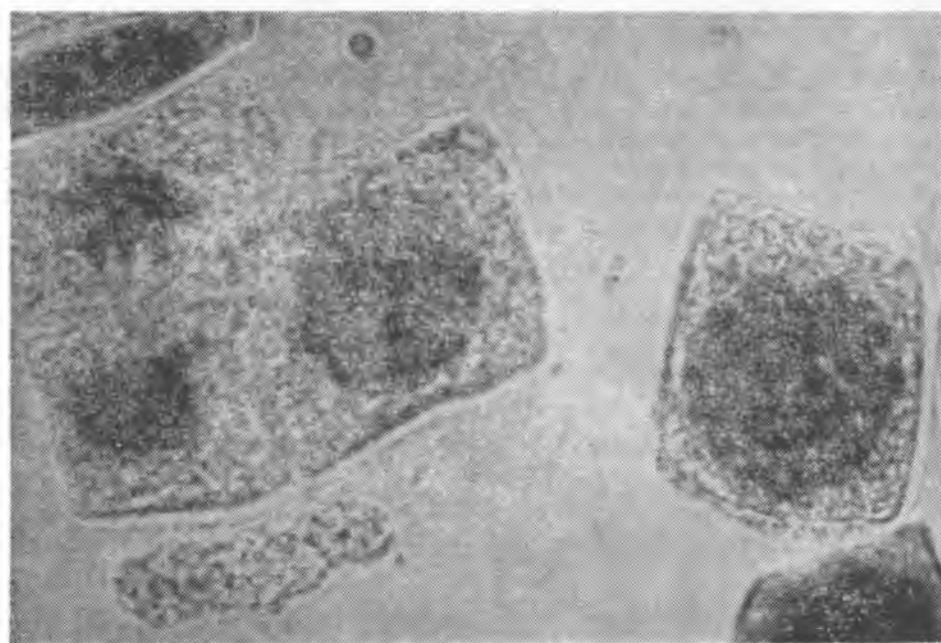
Из травы *Alchemilla pastoralis* Bus. выделено фракцию, в которой при помощи хроматического метода доказано наличие лактонов. Изучено влияние этой фракции на линейный рост корней в меристемах корней *Allium cepa* L. Показано, что она тормозит рост корней и митотическое давление, а в более высоких концентрациях добавочно нарушает ход митоза.

SUMMARY

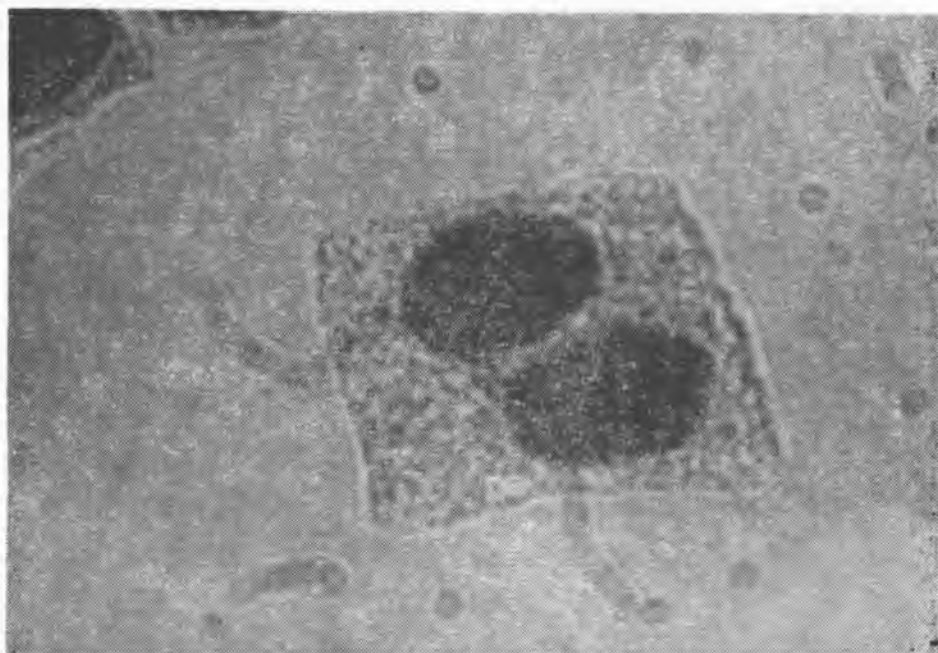
A fraction in which the presence of lactones was revealed chromatographically was isolated from the herb *Alchemilla pastoralis* Bus. The influence of this fraction on a linear growth of roots and mitosis course in meristems of *Allium cepa* L. was investigated. It was proved that this fraction inhibited the growth of roots and mitosis fissions, and in higher concentrations it additionally disturbed the mitosis course.



a



b



c

Ryc. 1. Zaburzenia mitozy pod wpływem frakcji laktonowej *Alchemilla pastoralis* Bus.: a — skrócenie chromosomów w metafazie, b — skrócenie chromosomów w profazie i zaburzenia telofazy, c — komórka dwujądrowa

Perturbations in mitosis under the influence of lacton fraction of *Alchemilla pastoralis* Bus.: a — shortening of chromosomes in metaphase, b — shortening of chromosomes in prophase and perturbations in telophase, c — binuclear cell