GDAŃSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
FACULTY OF CHEMISTRY

Imię i nazwisko autora rozprawy: Izabela Koss-Mikołajczyk
Dyscyplina naukowa: CHEMIA

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: **Porównanie składu fitozwiązków i wybranych aktywności biologicznych warzyw i owoców o różnej pigmentacji. Poszukiwanie zależności między zawartością substancji bioaktywnych a potencjałem prozdrowotnym roślin jadalnych.**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: The comparison of phytochemical composition and chosen biological activities of differently pigmented fruits and vegetables. Searching for the relationships between the content of bioactive compounds and health-promoting potential of edible plants.

Promotor *podpis*	Promotor pomocniczy *podpis*
dr hab. Inż. Agnieszka Bartoszek-Pączkowska	<dr inż. Barbara Kusznierewicz>

Gdańsk, 2017

STRESZCZENIE

Celem projektu była próba znalezienia zależności pomiędzy składem bioaktywnych fitozwiązków a aktywnością biologiczną dla wybranych roślin jadalnych. Do badań wykorzystane zostały pary owoców lub warzyw należące do tego samego gatunku, ale różniące się zasadniczo zawartością określonych grup związków o wysokim potencjale biologicznym. Były to następujące odmiany roślin jadalnych: żółta, pomarańczowa i czerwona opuncja figowa, biały i czerwony burak, żółta i czerwona malina, białe i czerwone winogrona, biała i czarna morwa, biała, czerwona i czarna porzeczka, biała i czerwona kapusta oraz biały i fioletowy kalafior, zawierające lub nie fitozwiązki z grupy odpowiednio betalain lub antocyjanów. Założono, że rośliny należące do tego samego gatunku będą się charakteryzowały podobną matrycą roślinną i poprzez porównanie odmian będzie można wnioskować o roli różniącego je składnika dla wykazywanej przez daną roślinę aktywności biologicznej.

Ocenione zostały właściwości biochemiczne w systemach bezkomórkowych i biologiczne w hodowli komórkowej, uznawane za wskazujące na chemoprewencyjny potencjał, a zatem także możliwość wykorzystania danego składnika żywności w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. Na podstawie wyników badań podjęto próbę określenia zależności pomiędzy składem chemicznym a aktywnością biologiczną badanych roślin. Wykazano, że w przeciwieństwie do badań prowadzonych z użyciem wyizolowanych fitozwiązków, w przypadku rzeczywistych pokarmów roślinnych nie istnieje prosta zależność pomiędzy zawartością składnika aktywnego a efektem biologicznym. Poznanie interakcji pomiędzy różnymi składnikami wpływającymi na końcowe działanie zdrowotne ma bardzo duże znaczenie tak dla formułowania rekomendacji żywieniowych, jak i w projektowaniu żywności funkcjonalnej oraz skutecznych suplementów diety.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

ABSTRACT

The aim of this project was the attempt to find the relationship between the composition of bioactive phytochemicals and biological activity for selected edible plants. For this purpose, pairs of fruits or vegetables belonging to the same species but with different content of selected phytochemicals exhibiting high biological potential, were chosen. The following pairs of plants were used: yellow, orange and red prickly pear, white and red beetroot, yellow and red raspberry, white and red grapes, white and black mulberry, white, red and black currant, white and red cabbage and white and purple cauliflower, that did or did not contain compounds from betalain or anthocyanin group, respectively. It was assumed that plants belonging to the same species would be characterized by a similar plant matrix and by comparing such varieties, the role of bioactive phytochemicals in the biological activity of tested plants can be assessed.

Biochemical and biological activities, recognized as representative of chemopreventive properties exhibited by studied plants, were tested. Based on the results of this research, the attempt to find the relationship between the chemical composition and the biological activity of tested plants has been made. The results showed that in contrast to purified bioactive phytochemicals, in the case of actual plant foods, no simple relationship occurs. Understanding the interactions between different food components, which affect their biological activity is very important so as to formulate dietary recommendations, as well as in the design of functional foods and effective dietary supplements.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE **1**

ABSTRACT **3**

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW **5**

I. CEL I ZAKRES PRACY **7**

II.CZĘŚĆ TEORETYCZNA **9**

II.1. ZAGROŻENIE CHOROBAMI CYWILIZACYJNYMI 9

II.2. STRES OKSYDACYJNY W ETIOLOGII CHORÓB CYWILIZACYJNYCH 12

II.3. HOMEOSTAZA REDOKSOWA 16

II.4. OWOCE I WARZYWA JAKO CZYNNIK CHEMOPREWENCYJNY 18

II.5. POSZUKIWANIE FITOZWIĄZKÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA AKTYWNOŚĆ CHEMOPREWENCYJNĄ OWOCÓW I WARZYW 20

II.6. WARZYWA I OWOCE A IZOLOWANE BIOAKTYWNE FITOZWIĄZKI 27

II.7. KONCEPCJA FOOD SYNERGY 29

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA **32**

III.1. ZASTOSOWANA APARATURA I ODCZYNNIKI 32

III.1.1. Odczynniki chemiczne *32*

III.1.2. Aparatura badawcza *34*

III.1.3. Przygotowanie roztworów i buforów *35*

III.1.4. Materiał badawczy *37*

III.2. OPIS STOSOWANYCH PROCEDUR BADAWCZYCH 41

III.2.1. Przygotowanie ekstraktów roślinnych *41*

III.2.2. Oznaczanie zawartości substancji odżywczych w badanych roślinach *41*

III.2.3. Charakterystyka badanych par warzyw i owoców pod kątem zawartości substancji biologicznie aktywnych *44*

III.2.4. Charakterystyka aktywności biologicznej esktraktów z owoców i warzyw *55*

III.3. WYNIKI I WNIOSKI 64

III.3.1. Wprowadzenie *64*

III.3.2. Określenie zawartość substancji odżywczych w badanych roślinach jadalnych *67*

III.3.3. Charakterystyka bioaktywnych fitozwiązków zawartych w badanych roślinach *73*

III.3.4. Aktywność biologiczna ekstraktów z badanych roślin *98*

IV. PODSUMOWANIE **118**

WYKAZ LITERATURY **120**

DOROBEK NAUKOWY **135**

PUBLIKACJE 135

MONOGRAFIE I DRUKI ZWARTE: 135

KOMUNIKATY USTNE 135

DONIESIENIA KONFERENCYJNE 137

GRANTY 138

STAŻE ZAGRANICZNE I SZKOLENIA 138

WYRÓŻNIENIA I STYPENDIA 139

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

skrót/akronim	pełna nazwa	
	termin w języku angielskin	**termin w języku polskim**
λ	wavelength	długość fali
2AA	2-aminoanthracene	2-aminoantracen
2-NF	2-nitrofluorene	2-nitrofluor
3-MTPITC	3-(methylthio)propyl isothiocyanate	izotiocyjanian 3-metylotiopropylu
4-NQO	4-nitroquinoline oxide	tlenek 4-nitrochinoliny
ABTS	2,2'-azynobis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonate)	2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)
ACN	acetonitrile	acetonitryl
AITC	allyl Isothiocyanate	izotiocyjanian allilu
ATCC	American Type Culture Collection	American Type Culture Collection
ATP	adenosine triphosphate	adenozynotrifosforan
AUC	area under curve	pole pod powierzchnią krzywej
BITC	benzyl isothiocyanate	izotiocyjanian benzylu
CAA	Cellular Antioxidant Activity	test mierzący komórkową aktywność przeciwutleniająca
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CUPRAC	cupric ion reducing antioxidant capacity	metoda oznaczania zdolności do redukowania jonów miedzi (II)
DAD	diode array detector	detektor z matrycą fotodiodową
DCF	dichlorofluorescein	dichlorofluoresceina
DCFH	2',7'-dichlorofluorescin	2'7'- dichlorofluorescyna
DCFH-DA	2',7'-dichlorofluorescin diacetate	dioctan 2',7'- dichlorofluorescyny
DCPIP	2,6-dichloroindophenol disodium salt	Sól disodowa 2,6-dichloroindofenolu
DIM	3,3'diindolylemethane	3,3'-diindolometan
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetylosulfotlenek
DNA	deoxyribonucleic acid	kwas deoksyrybonukleinowy
DNS	dinitrosalicilic acid	kwas 3,5-dinitrosalicylowy
DPPH	2,2-diphenylo-1-picrylohydrazyl	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	kwas etylenodiaminotetraoctowy
ESI	electrospray ionization	elektrorozpylanie
FBS	Foetal bovine serum	płodowa surowica bydlęca
FC	Folin Ciocalteu	Folin Ciocalteu
FID	flame ionization detector	detektor płomieniowo-jonizacyjny
FLD	fluorescence detector	detektor fluorescencyjny
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power	metoda oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza (III)
GLS	glucosinolates	glukozynolany
GSH	glutathione	glutation
GST	glutathione S-transferases	S-transferazy glutationowe

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

GTL	glucotrapeolin	glukotrapeolina
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	Hank's Balanced Salt Solution
HPLC	high performance liquid chromatography	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPTLC	High performance thin layer chromatography	Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa
I3AA	indole-3-acetic acid	kwas indolo-3-octowy
I3ACN	indole-3-acetonitrile	indolo-3-acetonitryl
I3C	indole-3-methanol	indolo-3-metanol
ITC	isothiocyanates	izotiocyjaniany
KT	fatty acids	kwasy tłuszczowe
LMP	low melting point	niska temp. topnienia
MITC	methyl isothiocyanate	izotiocyjanian metylu
MPF	microplate format	format mikropłytkowy
MS	Mass spectrometer	spektrometr mas
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide	formazan błękitu tiazolowego
NAC	N-acetyl-L-cysteine	N-acetylocysteina
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	fosforan dinukleotydu nikotynoaminoadeninowego
NMP	normal melting point	normalne temp. topnienia
NQO1	Quinone oxidoreductase	oksydoreduktaza chinonowa
PBS	phosphate buffered saline	sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PCA	Principal Component Analysis	Analiza Głównych Składowych
PEITC	phenylethyl isothiocyanate	izotiocyjanian fenyletylu
PITC	phenyl isothiocyanate	izotiocyjanian fenylu
pNPG	p-nitrophenylo-α-D-glucopiranozyd	p-Nitrofenylo-α-D-glukopiranozyd
RFT	reactive oxygen species	reaktywne formy tlenu
SD	standard deviation	odchylenie standardowe
SFN	sulforaphane	sulforafan
SIP	Accumulated Survival Index	Skumulowany Indeks Przeżywalności
SPE	solid phase extraction	ekstrakcja do fazy stałej
TE	Trolox equivalent	równoważnik Troloksu
TLC	thin layer chromatography	chromatografia cienkowarstwowa
TOF	Time of Flight	analizator czasu przelotu
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pirydyl)-s-triazine	2,4,6-tri-pirydylo-S-triazyna
QTRAP		Pułapka jonowa
USDA	United States Department of Agriculture	Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I. CEL I ZAKRES PRACY

Raport Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, 2014) pokazał, że tzw. choroby cywilizacyjne, do których zaliczane są m.in. choroby układu krążenia, nowotwory czy cukrzyca typu 2, stanowią obecnie bezpośrednią przyczynę ponad 50 % wszystkich zgonów na świecie (Health Statistics, 2009). Badania ostatnich 20 lat dowiodły, że sposób odżywiania, a przede wszystkim ilość spożywanych pokarmów roślinnych, ma kluczowe znaczenie dla rozwoju tych schorzeń (Cooke i in., 2005; Dudley i in., 2008). Chemoprewencyjne działanie warzyw i owoców kojarzone jest obecnie przede wszystkim ze zdolnością obecnych w nich bioaktywnych fitozwiązków do przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu, który obserwowany jest u osób dotkniętych wymienionymi schorzeniami. Od czasu odkrycia roli przeciwutleniaczy w przeciwdziałaniu chorobom powiązanym ze stresem oksydacyjnym panuje przekonanie, że ciemne odmiany owoców i warzyw, bogate w barwniki z grupy antocyjanów, betalain czy karotenoidów są zdrowsze od odmian jasnych, pozbawionych tych substancji. Jednakże dostępne są wyniki badań dowodzące, że jasne odmiany również mogą wykazywać aktywność biologiczną.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było porównanie potencjału prozdrowotnego odmian roślin jadalnych o różnej pigmentacji oraz poszukiwanie zależności między składem bioaktywnych fitozwiązków a aktywnością biologiczną tych roślin i próba wnioskowania na tej podstawie o czynnikach decydujących o ich potencjale prozdrowotnym.

Porównywanie zawartości związków bioaktywnych oraz aktywności biologicznej różnokolorowych odmian owoców i warzyw nie jest podejściem zupełnie nowym, gdyż w literaturze często spotykane są publikacje poświęcone różnym odmianom danej rośliny. Zazwyczaj jednak prace te mają ograniczony zakres i skupiają się na porównaniu składu znanych fitozwiązków bioaktywnych oraz aktywności przeciwutleniającej (Määttä i in., 2001; Zhou i in., 2007; Cejudo-Bastante i in., 2014). Znacznie rzadziej zdarzają się publikacje, w których badacze zajęli się problemem bardziej kompleksowo, szukając powiązań między zawartością związków bioaktywnych, a aktywnością biologiczną badanych odmian z wykorzystaniem różnych testów służących oznaczeniu aktywności istotnych dla profilaktyki chorób cywilizacyjnych (Shon i in., 2004; Kim i in., 2011; Garcia-Lafuente i in., 2014).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W badaniach prowadzonych przeze mnie w ramach projektu doktorskiego wykorzystałam pary owoców lub warzyw należące do tego samego gatunku, ale różniące się zasadniczo zawartością określonych grup związków o wysokim potencjale biologicznym. Do badań wybrano następujące rośliny jadalne: żółta pomarańczowa, i czerwona odmiana opuncji figowej, biała i czerwona odmiana buraka, żółta i czerwona odmiana maliny, biała i czerwona odmiana winogron, biała i czarna odmiana morwy, biała, czerwona i czarna odmiana porzeczki, biała i czerwona odmiana kapusty oraz biała i fioletowa odmiana kalafiora, zawierające lub nie fitozwiązki z grupy odpowiednio betalain lub antocyjanów.

W ramach badań porównana została zawartość substancji odżywczych w badanych parach owoców i warzyw (zawartość cukrów, białka, tłuszczu, wody, oraz witaminy C), jak również wykonane zostały profile biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych z grupy antocyjanów i betalain oraz glukozynolanów wraz z produktami ich rozpadu. Przeprowadzono również ocenę następujących właściwości biologicznych o potencjalnym działaniu chemoprewencyjnym w systemach bezkomórkowych i modelu ludzkiej linii nowotworowej HT29 w hodowli komórkowej:

- aktywność przeciwutleniająca,
- wpływ na wzrost komórek eukariotycznych,
- aktywność mutagenna,
- działanie genotoksyczne oraz zdolność do ochrony DNA przed uszkodzeniami indukowanymi przez stres oksydacyjny
- zdolność do stymulacji/inhibicji wybranych aktywności enzymatycznych.

Wyniki przeprowadzonych badań wykorzystano do próby powiązania aktywności biologicznych wykazywanych przez badane odmiany roślin z ich składem chemicznym.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

II.1. Zagrożenie chorobami cywilizacyjnymi

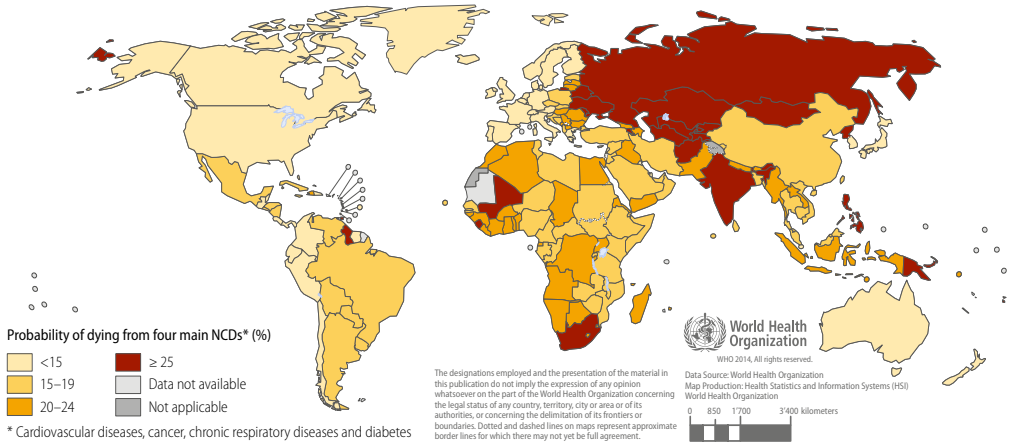
W ciągu ostatnich kilku dekad przewlekłe choroby niezakaźne, nazywane również cywilizacyjnymi, wyprzedziły choroby zakaźne, stając się główną przyczyną zgonów w większości krajów na świecie. Jako wyjaśnienie tego zjawiska najczęściej wskazuje się nie tylko na postępujący rozwój medycyny, który pozwolił skuteczniej zwalczać choroby infekcyjne, ale również na niekorzystne zmiany w trybie życia i sposobie odżywiania większości społeczeństw (WHO, 2014). Pod pojęciem chorób cywilizacyjnych kryją się takie schorzenia jak cukrzyca typu 2, otyłość, udar mózgu, choroby układu krążenia (nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, zawał serca, miażdżyca), przewlekłe choroby układu oddechowego (astma oskrzelowa, gruźlica), alergie, kamica nerkowa, osteoporoza, AIDS, choroby psychiczne oraz nowotwory (WHO, 2014). Do ich rozwoju przyczyniają się przede wszystkim osiadły tryb życia, złe nawyki żywieniowe, palenie papierosów czy nadużywanie alkoholu (Alemanno i in., 2013). W związku z charakterem czynników sprzyjających rozwojowi tych chorób można podejrzewać, że profilaktyka w ich przypadku powinna być bardzo skuteczna.

Choroby cywilizacyjne do niedawna kojarzone były głównie z krajami wysokorozwiniętymi, jednakże w ostatnich latach stały się główną przyczyną przedwczesnych zgonów również w krajach rozwijających się (Nugent, 2008). Niezdrowy tryb życia przestał być zależny od poziomu dochodów. W krajach biedniejszych obserwuje się znaną wcześniej z rejonów o wysokim poziomie rozwoju cywilizacyjnego zmianę sposobu odżywiania (ang. nutrition transition), w wyniku której społeczeństwo zaczyna spożywać więcej tłuszczu, soli, cukru, produktów wysokoprzetworzonych i mniej błonnika, co znacznie zwiększa zagrożenie chorobami cywilizacyjnymi (Popkin i Nielsen, 1993). Powodem takiego stanu rzeczy jest przystępna cena i powszechna dostępność produktów żywnościowych niskiej jakości, wysokoprzetworzonych, a przy tym wysokokalorycznych, przez co stały się one preferencyjnym wyborem ludzi o średnich i niskich dochodach (Popkin, 2003).

W 2014 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) opublikowała raport „Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014", w którym wykazała, że choroby cywilizacyjne stanowią jedno z największych wyzwań XXI wieku (WHO, 2014). Rysunek 1 przedstawia prawdopodobieństwo zgonu w wyniku chorób cywilizacyjnych

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

w różnych regionach świata szacowane na podstawie danych z 2012 roku. Zgodnie z przewidywaniami, największego zagrożenia związanego z tymi chorobami można oczekiwać w krajach byłego Związku Radzieckiego, Indiach, Gujanie, Indonezji, Nowej Gwinei i Republice Południowej Afryki. Natomiast stosunkowo niskiego w krajach Ameryki Północnej, Europie Zachodniej i Środkowej oraz Australii (WHO, 2014).



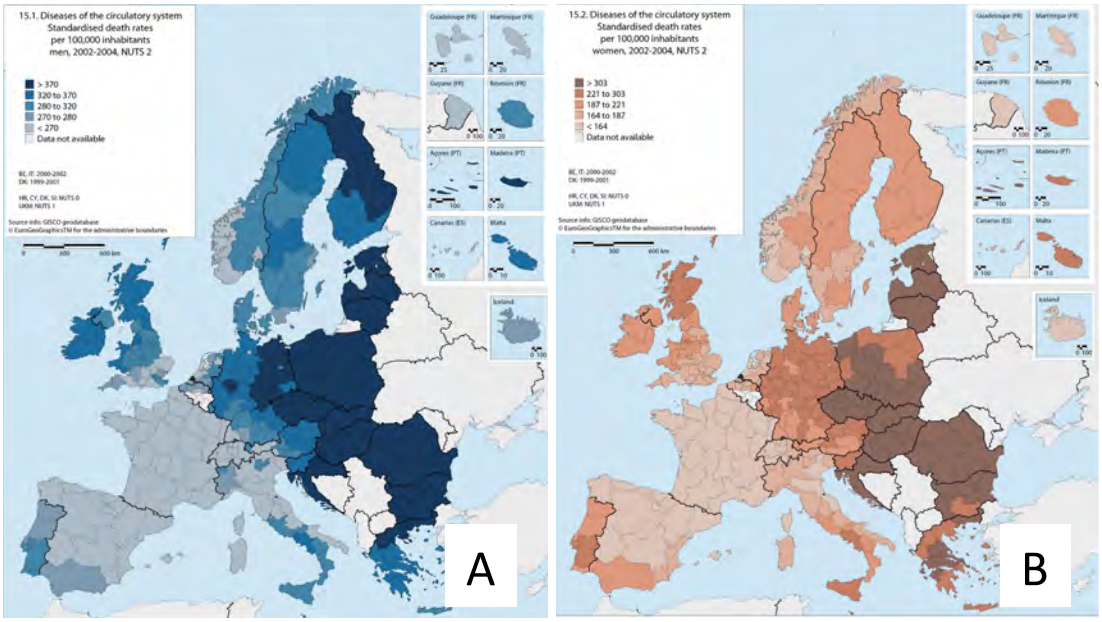
Rys. 1. Prawdopodobieństwo zgonu z powodu jednej z czterech najpowszechniejszych chorób cywilizacyjnych (chorób układu krążenia, nowotworów, chronicznych chorób układu oddechowego i cukrzycy) osób w wieku 30-70 lat szacowane na podstawie danych z 2012 roku (źródło WHO 2014).

Według danych statystycznych, zgromadzonych przez WHO w 2012 r. z 56 mln odnotowanych zgonów aż 38 mln było spowodowanych chorobami cywilizacyjnymi, co stanowiło o 7 mln przypadków więcej niż w roku 2000. Jeśli takie tempo utrzyma się to prognozy wskazują, że w roku 2030 liczba zgonów spowodowanych tymi chorobami może osiągnąć poziom 52 mln. Według danych z 2012 roku 46,2 % wszystkich zgonów w wyniku chorób cywilizacyjnych stanowiły te spowodowane chorobami układu krążenia, 21,7 % - nowotworami, 10,7 % - chorobami układu oddechowego i 4 % - cukrzycą typu 2 (WHO, 2014).

W krajach europejskich, główną przyczyną przedwczesnych zgonów są choroby układu krążenia oraz nowotwory. Uważa się, że występowanie tych chorób jest ściśle uzależnione od czynników dietetycznych (WHO, 2014). Na rysunku 2 porównano liczbę zgonów wśród mężczyzn i kobiet w Europie spowodowanych chorobami układu krążenia. Zarówno wśród mężczyzn, jak i wśród kobiet, zdecydowanie najbardziej zagrożeni są mieszkańcy krajów Europy Środkowo-Wschodniej, a najmniej mieszkańcy krajów skandynawskich oraz obszaru Morza Śródziemnego (Health Statistics, 2009). Jednym z czynników odpowiedzialnych za taki stan rzeczy, poza lepiej rozwiniętą

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

medycyną, może być w tym drugim przypadku tzw. dieta śródziemnomorska, która jest obecnie uważana za jeden z najzdrowszych i najlepiej zbilansowanych sposobów odżywiania na świecie (De Longeril i in., 1999; Dinu i in., 2017).



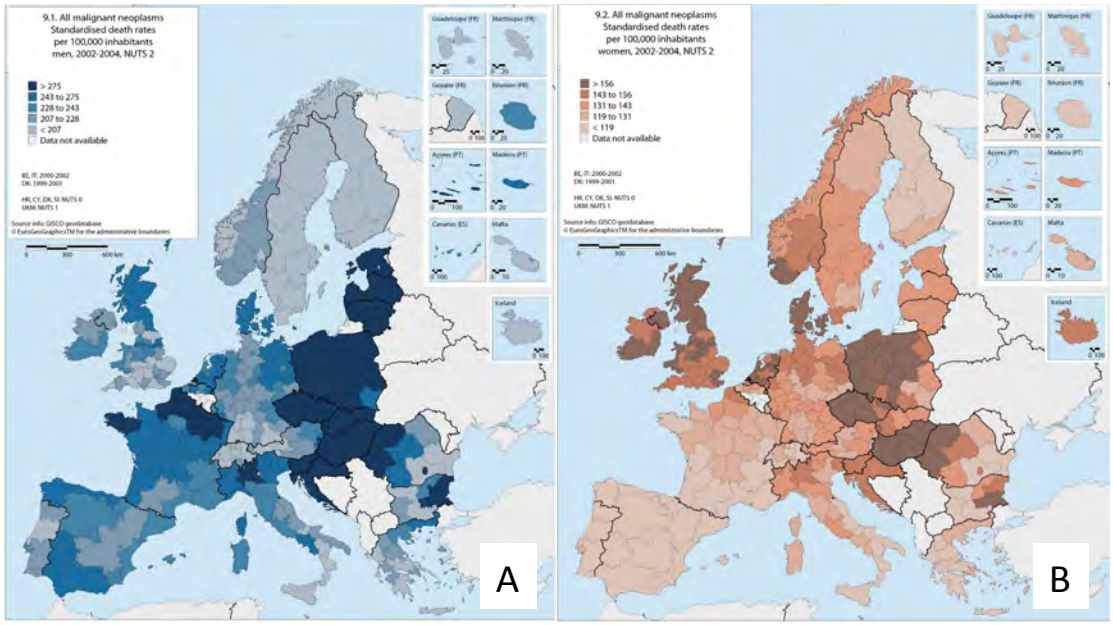
Rys. 2. Liczba zgonów spowodowanych chorobami układu krążenia w Europie u mężczyzn (A) i kobiet (B) (źródło: Health Statistics, 2009).

Podobną tendencję jak w przypadku śmiertelności z powodu chorób układu krążenia obserwuje się także dla nowotworów (Rys. 3). Również w tym przypadku największe zagrożenie występuje w krajach Europy Środkowo-Wschodniej, a najmniejsze w krajach skandynawskich oraz w krajach basenu Morza Śródziemnego (Health Statistics, 2009). Niestety w przeciwieństwie do spadkowej tendencji zagrożenia chorobami sercowo-naczyniowymi, w przypadku których dostępne są zarówno żywieniowe strategie profilaktyczne, jak i skuteczne leki, problem nowotworów pogłębia się z roku na rok. Corocznie na świecie z tej przyczyny notuje się prawie 7 mln zgonów. Przewiduje się, że do 2030 roku liczba ta w Europie może wzrosnąć nawet do 11 mln (Health Statistics, 2009). Problem rosnącej zapadalności na choroby nowotworowe stał się na tyle istotny w skali europejskiej, że Komisja Europejska zaleciła podjęcie zdecydowanych działań prowadzących do zmniejszenia zachorowalności na te choroby o 15 % do 2020 roku (Jelenc i in., 2012).

Kolejnym schorzeniem zaliczanym do grona chorób cywilizacyjnych, jeszcze silniej powiązanym ze sposobem odżywania, jest cukrzyca typu 2 (van Dam i in., 2002). Ryzyko zachorowania w tym przypadku zwiększa się wraz z wiekiem, chociaż w ostatnich latach, na cukrzycę coraz częściej zapadają ludzie młodzi. Według

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

szacunków WHO, obecnie na świecie na cukrzycę typu 1 i 2 cierpi około 175 milionów ludzi, a w roku 2025 liczba ta wzrośnie do około 350 milionów, co oznacza światową epidemię. W Polsce na cukrzycę chorych jest około 2 miliony osób, a International Diabetic Fund sugeruje, że liczba ta do roku 2025 wzrośnie o 10-15 % (Health Statistics, 2009).



Rys. 3. Liczba zgonów spowodowanych nowotworami w Europie u mężczyzn (A) i kobiet (B) (źródło: Health Statistics, 2009).

W związku z ogromnym ryzykiem jakie niosą ze sobą choroby cywilizacyjne, w 2013 roku Komisja Europejska we współpracy ze Światową Organizacją Zdrowia zainicjowały projekt „Zmniejszenie zachorowalności i umieralności na przewlekłe choroby niezakaźne" (ang. „Integrated Survivaleance of Non-communicable Diseases"), którego celem jest gromadzenie danych statystycznych dotyczących zdiagnozowanych przypadków chorób cywilizacyjnych w Europie oraz stworzenie rekomendacji, które uświadomią społeczeństwom zagrożenia jakie niosą ze sobą te choroby, ale także możliwości zapobiegania ich rozwojowi (WHO, 2014).

II.2. Stres oksydacyjny w etiologii chorób cywilizacyjnych

Dane statystyczne nie pozostawiają wątpliwości, że choroby cywilizacyjne stały się problemem społecznym, a ich leczenie będzie stanowić coraz większe obciążenie dla budżetów prywatnych i państwowych (WHO, 2014). Są to jednak choroby, w przypadku których jak wspomniano działania profilaktyczne mogą być bardzo

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

skuteczne. Jednakże próby zapobiegania epidemii chorób cywilizacyjnych mogą być uwieńczone sukcesem pod warunkiem, że poznane zostaną molekularne mechanizmy leżące u ich podłoża (Furukawa i in., 2017). Wyniki szeroko zakrojonych, prowadzonych od wielu lat badań, mających na celu ustalenie tych mechanizmów wskazały, że wspólnym zjawiskiem obserwowanym w przypadku tych wszystkich dolegliwości jest tzw. stres oksydacyjny (Furukawa i in., 2017; Li i in., 2016; Siti i in., 2015; Young-Woong i Byzova, 2014; Russo, 2007; Kayama i in., 2015; Popolo i in., 2013). Definicja stresu oksydacyjnego wprowadzona przez Helmuta Siesa z Uniwersytetu w Düsseldorfie mówi o „zaburzeniu równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania" (Sies, 1985). Równowaga ta nazywana jest obecnie homeostazą redoksową i może ona zostać zaburzona zarówno przez nadmiar reaktywnych form tlenu (RFT), których poziom przekracza zdolności obronne endo- i egzogennych przeciwutleniaczy oraz enzymatycznych systemów antyoksydacyjnych obecnych w organizmie człowieka. Jednakże również nadmiar przeciwutleniaczy, które powodują przesunięcie stanu równowagi w stronę reakcji redukcji nie jest korzystny ze zdrowotnego punktu widzenia. Stan taki nazywany jest stanem stresu redukcyjnego (ang. reductive stress), (Korge i in., 2015). Oba stany zaburzenia homeostazy redoksowej mogą mieć szkodliwy wpływ na dobrostan organizmu. Mimo wielu przesłanek świadczących o udziale stresu oksydacyjnego w przebiegu wielu chorób, do tej pory nie udało się jednoznacznie ustalić jego roli (Furukawa, i in. 2017). Istnieje kilka hipotez mówiących o tym, że może być on albo przyczyną albo skutkiem chorób cywilizacyjnych. Większość badaczy skłania się jednak ku pierwszej hipotezie wskazując przy tym na inne czynniki zwiększające zagrożenie (Furukawa i in., 2017; Li i in., 2016; Siti i in., 2015; Young-Woong i Byzova, 2014; Russo, 2007). Przykładowo, prowadzone od wielu lat badania wskazały, że wpływ stresu oksydacyjnego na rozwój chorób układu krążenia jest modyfikowany przez wiele czynników środowiskowych, takich jak hipercholesterolemia, nadciśnienie, palenie papierosów, cukrzyca, uboga dieta, stres, brak aktywności fizycznej (Bahorun i in., 2006; Chatterjee i in., 2007; Ceriello 2008; Popolo i in., 2013). Wyniki badań epidemiologicznych udowodniły także istotny wpływ RFT na utlenianie lipidów, które w rezultacie tworzą tzw. blaszkę miażdżycową odkładającą się w naczyniach krwionośnych zaburzając ich drożność, a w konsekwencji podwyższając ciśnienie krwi prowadzą do rozwoju innych stanów patologicznych, np. zawału mięśnia sercowego (Droge, 2002; Bahorun i in., 2006; Chatterjee i in., 2007;

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Ceriello, 2008). Innym potwierdzonym badaniami, negatywnym skutkiem stresu oksydacyjnego jest wywołanie stanu chronicznego zapalenie naczyń krwionośnych, który również prowadzi do nadciśnienia i przyczynia się do rozwoju miażdżycy (Siti i in., 2015).

Dzięki poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za choroby układu krążenia i wprowadzeniu skutecznej profilaktyki obserwuje się tendencję spadkową w zapadalności na te choroby (WHO, 2014). W przeciwieństwie do chorób układu krążenia, zainteresowanie naukowców chorobami nowotworowymi i ich chemoprewencją nie zaowocowało jeszcze takimi sukcesami. Ze względu na skomplikowany proces kancerogenezy, a co za tym idzie i trudności ze znalezieniem odpowiedniego sposobu leczenia nadal obserwuje się wzrastającą zachorowalność i wysoką śmiertelność (WHO, 2014). Kancerogeneza obejmuje wiele różnych procesów zachodzących zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym, pod wpływem czynników wewnętrznych lub zewnętrznych. Koncepcja wielostopniowej kancerogenezy zakłada, że rozwój nowotworu ma miejsce w dłuższym okresie czasu, w trakcie którego następuje akumulacja somatycznych mutacji w pojedynczej komórce powodująca powstawanie zmian fenotypowych przekształcających komórkę zdrową w komórkę nowotworową (Surh i in., 2003; Hanahan i Weinberg, 2000; Hanahan i Weinberg, 2011). Do niedawna opisywano proces kancerogenezy jako składający się z 3 głównych etapów: inicjacji (okres trwania: dni), promocji (okres trwania: kilka lat) i progresji (okres trwania: 1-5 lat) (Mehta i in., 2010). Inicjacja obejmuje procesy polegające na powstawaniu uszkodzeń DNA w wyniku działania kancerogenów chemicznych bądź fizycznych. Jeżeli nie zostaną one usunięte przez mechanizmy naprawy DNA, zmiany te nieodwracalnie zaburzają prawidłowe działanie materiału genetycznego. Postuluje się, że stres oksydacyjny może być jedną z przyczyn rozwoju nowotworów, ponieważ powoduje on powstawanie uszkodzeń DNA (Valko i in., 2004; Valko i in., 2006; Valko i in., 2007). RFT reagują z zasadami azotowymi wchodzącymi w skład nici DNA tworząc addukty i indukując powstawanie mutacji, a przez to zmiany w procesie transkrypcji, co zaburza prawidłowe funkcje genomu i przez to normalny wzrost komórki (Valko i in., 2004; Halliwell, 2007). Pod wpływem stresu oksydacyjnego DNA ulega również innym modyfikacjom, takim jak pęknięcia nici DNA czy tworzenie połączeń białek z DNA (Halliwell, 2007). Etap promocji uznawany był za odwracalny, znacznie wolniejszy i prowadzący do akumulacji w organizmie komórek zmienionych nowotworowo w wyniku ich niekontrolowanych podziałów

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

(Mehta i in., 2010). Natomiast etap progresji miał być nieodwracalny i stanowić końcowe stadium rozwoju nowotworu, podczas którego następowały wzrost guza i potencjalne przerzuty do innych organów (Surh, 2003).

Powyższy opis procesu kancerogenezy stanowi znacznie uproszczony model. W 2000 roku Hanahan i Weinberg (Hannahan i Weinberg, 2000) opublikowali w czasopiśmie „Cell" przełomową pracę "Hallmarks of cancer", w której opisali sześć ich zdaniem najistotniejszych cech komórek rakowych. Zauważyli oni, że pomimo istotnych różnic pomiędzy różnymi typami nowotworów, tworzące je komórki mają pewne cechy wspólne, nieobecne w komórkach zdrowych. Uznali, że muszą to być cechy niezbędne dla procesu nowotworzenia, nabywane w trakcie przemiany komórki zdrowej w nowotworową. Cechy te to (Hannahan i Weinberg, 2000):

- uniezależnienie od międzykomórkowych sygnałów stymulujących wzrost (komórki nowotworowe potrafią wytwarzać własne sygnały wzrostu),
- niewrażliwość na inhibitory wzrostu,
- nieuleganie apoptozie,
- nieśmiertelność replikacyjna warunkująca zdolność do nieograniczonej proliferacji (poprzez wydłużenie telomerów w wyniku działania enzymu telomerazy, w komórkach rakowych występuje zazwyczaj nadekspresja genu kodującego powstawanie tego enzymu),
- zdolność do indukcji angiogenezy (powstawanie nowych naczyń krwionośnych umożliwia ukrwienie guza i doprowadzanie substancji odżywczych),
- zdolność do metastazy i tworzenia przerzutów.

Jednakże najważniejszą cechą wszystkich komórek nowotworowych umożliwiającą powstawanie wyżej wymienionych zmian w trakcie transformacji nowotworowej jest niestabilność genomowa (Hanahan i Weinberg, 2000). Po 10 latach od opublikowania swojej przełomowej pracy Hanahan i Weinberg opublikowali artykuł „Hallmarks of cancer: the next generation", w którym nie tylko powtórzyli swoją poprzednią tezę o tym, że istnieje lista cech charakterystycznych dla wszystkich typów nowotworów, ale uzupełnili tę listę o kolejne cechy – zmianę gospodarki energetycznej komórki w kierunku glikolizy poprzez zwiększenie ilości transporterów glukozy w błonie komórkowej (umożliwia to zrównanie wartości energetycznej glikolizy z wykorzystywanym preferencyjnie przez zdrowe komórki oddychaniem tlenowym) oraz unikanie zniszczenia przez system immunologiczny (Hanahan i Weinberg, 2000;

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Hanahan i Weinberg, 2011). Niektóre z tych mechanizmów zależą od stresu oksydacyjnego.

Udział stresu oksydacyjnego w rozwoju chorób cywilizacyjnych może być postrzegany w jeszcze inny sposób. Jednym z czynników zwiększających zagrożenie tymi chorobami jest wiek. Starzenie się organizmu to proces złożony, definiowany jako postępująca utrata integralności fizjologicznej, prowadząca do zaburzenia funkcjonowania i zwiększonej podatności na śmierć (López-Otin i in., 2013). López-Otin i wsp. posunęli się do porównania procesu starzenia z kancerogenezą i opracowali zbiór cech komórek starzejących się („The hallmarks of aging") dla którego inspiracją były wspomniane powyżej artykuły. Zaproponowanych zostało 9 cech starzejącego się organizmu, wśród nich: niestabilność genomu, skracanie telomerów, zmiany epigenetyczne, zaburzona homeostaza białkowa, rozregulowane odczuwanie składników odżywczych, dysfunkcja mitochondriów, senescencja komórkowa, wyczerpanie zasobów komórek macierzystych i zmiany w komunikacji międzykomórkowej. Zaburzenie homeostazy redoksowej może przyspieszać postępowanie większości z tych cech (Lopez-Otiz i in., 2013, Aunan i in., 2016).

II.3. Homeostaza redoksowa

Odkrycie roli RFT w etiologii chorób cywilizacyjnych (Ai Pham-Huy i in., 2008) zaowocowało panującym przez wiele lat przekonaniem o wyłącznie negatywnym wpływie RTF na zdrowie organizmu ludzkiego. Jednakże dzięki postępom w badaniach nad fizjologiczną rolą tych cząsteczek pogląd ten zaczął ulegać zmianie w ostatnich latach. Okazało się, że poprzez udział w szlakach sygnalizacyjnych stymulujących bądź wyciszających ekspresję genów kodujących określone białka, RFT są zaangażowane w takie kluczowe procesy komórkowe jak proliferacja, różnicowanie, migracja czy śmierć komórkowa (Hernández-García i in., 2010; Schieber i Chandel, 2014). Wykazują również zdolność aktywacji niektórych białek transportowych (GLUT), przykładowo nadtlenek wodoru pobudza transport glukozy do wnętrza komórek (Mohanty i in., 2000).

Biorąc pod uwagę nowe rozumienie znaczenia RFT jako naturalnych cząsteczek sygnalizacyjnych z jednej strony, a reaktywnych czynników mogących uszkadzać struktury komórkowe z drugiej, zrozumiała staje się konieczność precyzyjnego kontrolowania stanu równowagi pomiędzy szybkością produkowania RFT a poziomem

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

przeciwutleniaczy, które ograniczając negatywny wpływ RFT na komórkę nie powinny zaburzać komórkowych funkcji zależnych od stanu redoks. Od dawna wiadomo, że każdy żywy organizm wyposażony jest w zestaw mechanizmów służący zachowaniu homeostazy redoksowej (Rahman, i in. 2012). Na system przeciwutleniający organizmu człowieka składają się enzymy (m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx)) oraz endogenne przeciwutleniacze, przede wszystkim glutation (GSH), oraz m.in. albumina, estrogeny czy kwas moczowy, które wspomagane substancjami przyjmowanymi z pokarmem, np. kwasem askorbinowym, tokoferolami, polifenolami czy karotenoidami zapewniają unieszkodliwianie nadmiaru RFT (Bartosz, i in. 2009). Jednakże w stanach patologicznych lub w warunkach zbyt dużej ilości utleniaczy w środowisku, równowaga redoksowa może zostać zachwiana. Pojawia się wspomniany wcześniej stan stresu oksydacyjnego, a obecne w organizmie wymykające się kontroli RFT mogą powodować oksydacyjne uszkodzenia wielu składników komórek (białek, lipidów błonowych, DNA) (Rahman i in., 2012; Schieber i Chandel, 2014; Sies, 2015).

Obecnie w związku z udowodnioną fizjologiczną rolą RFT i ich udziałem w procesach komórkowych prowadzi się badania już nie tylko nad ochroną przed stresem oksydacyjnym, ale szerzej nad zaburzeniami stanu równowagi redoksowej. Dostarczanie do organizmu egzogennych przeciwutleniaczy w zbyt dużym, niefizjologicznym stężeniu może z kolei doprowadzić do stresu redukcyjnego, podczas którego akceptory elektronów są w większości w stanie zredukowanym (Korge, i in. 2015). W tej sytuacji niektóre białka są w stanie oddać elektron cząsteczce O_2, z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego co paradoksalnie zwiększa produkcję RFT w organizmie (Korge i in., 2015).

W związku z odkryciem dualistycznej roli RFT w organizmie człowieka oraz istotności utrzymania homeostazy redoksowej, logiczne wydaje się stwierdzenie, że egzogenne przeciwutleniacze nie mogą być w sposób dowolny, niekontrolowany i w zbyt dużym stężeniu dostarczane do organizmu człowieka. Zrozumienie tego faktu spowodowało, że w 2017 roku Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority - EFSA) poprosił panel ekspertów ds. Produktów dietetycznych, odżywczych i alergii (NDA) o uaktualnienie obowiązujących naukowych wymagań dla oświadczeń zdrowotnych związanych z przeciwutleniaczami, stresem oksydacyjnym i zagrożeniem chorobami cywilizacyjnymi. W wyniku tej współpracy powstał „Draft Guidance for Scientific Requirements for Health Claims

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Related to Antioxidants, Oxidative Damage and Cardiovascular Health", w którym zawarto zestaw wymagań dla preparatów zawierających przeciwutleniacze, m.in. zalecano, że musi zostać oznaczona ich zdolność do ochrony komórek i biomolekuł przed uszkodzeniami oksydacyjnymi w warunkach *in vitro* i *in vivo* (EFSA, 2017).

II.4. Owoce i warzywa jako czynnik chemoprewencyjny

Wieloletnie badania, których ukoronowaniem było podsumowanie wydane po raz pierwszy w 1997, powtórzone w 2007, przez Światowy Fundusz Badań nad Rakiem (World Cancer Research Fund) i Amerykański Instytut Badań nad Rakiem (American Institute for Cancer Research) zatytułowane "Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective" (AICR, 1997; AICR, 2007) pokazały, że dieta bogata w białka i tłuszcze sprzyja procesom kancerogenezy, z kolei żywność pochodzenia roślinnego może być źródłem substancji przeciwdziałających rozwojowi nowotworów. Metaanaliza z 2014 roku potwierdziła te dane, co więcej wskazała, że podobna zależność obowiązuje w przypadku innych chorób cywilizacyjnych (Fardet i Boirie, 2014).

Z perspektywy profilaktyki tych chorób najważniejsze wydają się obserwacje dotyczące żywności, gdyż mogą być z łatwością stosowane w codziennym życiu. Dowody w postaci wyników badań populacyjnych prowadzonych z udziałem dużych grup ludności, wskazują że spożycie owoców i warzyw, a szczególnie określonych ich gatunków, wpływa na obniżenie ryzyka zapadalności na choroby cywilizacyjne. W przypadku chorób układu krążenia szczególnie pozytywne działanie wykazały jabłka, gruszki, owoce cytrusowe, pomidory i warzywa zawierające β -karoten, natomiast w przypadku nowotworów udowodniono szczególną aktywność chemoprewencyjną warzyw z rodziny *Brassicaceae* (Aune i in., 2016).

Jedne z pierwszych doniesień na temat przeciwrakotwórczych właściwości warzyw kapustowatych zostały opublikowane w latach 70-tych (Loub i in., 1975; Merrlin i Graham, 1979; Wattenberg i Loub, 1978). Wyniki badań epidemiologicznych udostępnione w kolejnym dziesięcioleciu, tzn. przeprowadzonych w latach 1980-1990, sugerowały odwrotną zależność pomiędzy spożyciem warzyw z tej rodziny a zachorowalnością na nowotwory jelita, trzustki (Olsen i in., 1989), płuc (Le Marchand i in., 1989), piersi (Graham i in., 1982), żołądka (Chyou i in., 1990) oraz jajnika (Shu

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

i in., 1989). Badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych wykazały także, że zwiększona konsumpcja brokułów powoduje obniżenie ryzyka zachorowania na nowotwory płuc (Steinmetz i Potter, 1993). Co więcej, udowodniono, że warzywa kapustowate jako jedyne, w sposób istotny statystycznie zapobiegały powstawaniu raka prostaty (Kirsh i in., 2007).

Oprócz warzyw kapustowatych również owoce jagodowe okazały się być źródłem związków o aktywnościach biologicznych pomocnych w prewencji chorób cywilizacyjnych. Badania epidemiologiczne wykazały pozytywny wpływ spożywania tych owoców na obniżenie ryzyka zachorowalności nie tylko na różne typy nowotworów, ale również choroby układu krążenia (Cassidy i in., 2011; Cassidy i in., 2013; McCullough i in., 2012; Jennings i in., 2012).

Odkrycie powiązania pomiędzy spożyciem owoców i warzyw a zachorowalnością na różnego typu nowotwory doprowadziło do powstania nowej gałęzi badań nad rakiem, którą określa się mianem chemoprewencji nowotworowej. Po raz pierwszy termin „chemoprewencja" został użyty przez Michaela Sporna, który określił nim zdolność naturalnych form witaminy A do przeciwdziałania rozwojowi komórek raka nabłonka (Sporn, 1976). Zgodnie z najnowszą definicją chemoprewencja to wykorzystanie substancji naturalnych, bądź farmakologicznych do zahamowania, zatrzymania, lub odwrócenia procesu kancerogenezy we wczesnych jej stadiach (Sporn i Suh, 2002). Chemoprewencja dotyczy osób na różnym etapie rozwoju chorób nowotworowych i dotychczasowe badania pokazują, że aktywności biologiczne wykazywane przez substancje obecne w żywności mogą być użyteczne na każdym z nich (Baer Dubowska, 2000; De Flora i in., 2001). Chemoprewencja pierwotna (ang. primary chemoprevention) adresowana jest do zdrowych osób, stanowi ona zatem działania typowo profilaktyczne. Chemoprewencja wtórna (ang. secondary chemoprevention) skierowana jest do osób na wczesnym, przedklinicznym etapie rozwoju nowotworu i ma na celu odwrócenie powstałych już zmian. Chemoprewencja wspomagająca terapię nowotworową (ang. tertiary chemoprevention) ma przeciwdziałać nawrotom choroby, a także toksycznym efektom ubocznym chemoterapii, co jest ostatnio coraz częściej sugerowane (Conklin, 2000; Piasek i in., 2009).

Zaproponowano też kilka możliwych mechanizmów chemoprewencji skojarzonych z opisaną wcześniej (rozdział II.2) wielostopniowością procesu kancerogenezy, takich jak wspomaganie detoksykacji kancerogenów, modyfikacja

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

metabolizmu kancerogenów w kierunku ich detoksyacji, wychwytywanie i dezaktywacja RFT, zatrzymanie cyklu komórkowego, inicjacja apoptozy czy wspomaganie procesów naprawczych DNA (Mehta i in., 2010). Obecnie termin chemoprewencja nie jest już zarezerwowany tylko dla profilaktyki nowotworów, określenie to rozciągnęło się też na zapobieganie rozwojowi innych chorób cywilizacyjnych.

Liczne badania epidemiologiczne wskazujące na wpływ diety bogatej w owoce i warzywa na ryzyko wystąpienia chorób cywilizacyjnych spowodowały oczywiste zainteresowanie i poszukiwanie, które fitozwiązki są odpowiedzialne za działanie chemoprewencyjne. Natomiast zrozumienie roli zaburzonej homeostazy redoksowej w patogenezie nieinfekcyjnych chorób przewlekłych, skierowało uwagę badaczy, opinii publicznej, a także producentów żywności i suplementów diety na znaczenie i możliwości wykorzystania przeciwutleniaczy w przeciwdziałaniu i/lub spowalnianiu rozwoju oraz wspomaganiu leczenia tych chorób.

II.5. Poszukiwanie fitozwiązków odpowiedzialnych za aktywność chemoprewencyjną owoców i warzyw

Hipoteza zakładająca skuteczność przeciwutleniaczy zawartych w diecie w obniżaniu ryzyka zachorowania na choroby cywilizacyjne została sformułowana na podstawie wyników badań epidemiologicznych, które wskazywały na zależność pomiędzy spożyciem warzyw i owoców a obniżeniem zagrożenia tymi chorobami oraz udziałem stresu oksydacyjnego w ich etiologii (Boffeta i in., 2010; Ceriello, 2008; Bahorun i in., 2006; Hung i in., 2004, George i in., 2009). Poskutkowało to poszukiwaniami naturalnych związków o niskim potencjale redukcyjnym obecnych w żywności. Przyjęto, że substancje te wyizolowane z owoców i warzyw, a następnie przygotowane w skoncentrowanej formie, np. jako suplementy diety, będą skutecznym narzędziem w walce z epidemią chorób cywilizacyjnych na świecie. Badania *in vitro* i w modelach zwierzęcych z użyciem wyizolowanych bioaktywnych fitozwiązków dostarczyły obiecujących danych wspierających założenia proponowanej strategii profilaktycznej (Seeram i in., 2005; Shibata i in., 1992). Jednakże formułując rekomendacje żywieniowe pod kątem diety bogatej w przeciwutleniacze przeoczono fakt, że większość badań dokumentujących ich aktywności chemoprewencyjne została przeprowadzona w warunkach *in vitro* w modelach komórkowych, bądź w modelach zwierzęcych, w których sztucznie wywołano proces kancerogenezy poprzez podanie

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

zwierzętom wysokich dawek znanych substancji rakotwórczych (Potter, 2014). Mało było dostępnych wiarygodnych wyników badań klinicznych z udziałem ochotników przeprowadzonych w sposób kontrolowany potwierdzających aktywność chemoprewencyjną przeciwutleniaczy (Potter, 2014). Kluczowym pytaniem, które przez dłuższy czas pozostawało bez odpowiedzi było więc czy wyizolowane fitozwiązki będą charakteryzowały się u ludzi taką samą aktywnością biologiczną jak całe owoce i warzywa (Kelloff, 2000; Sporn i Suh, 2002; Surh, 2003; Chen, 2005; Aggarwal i Shishoida, 2006).

Współczesne wymogi nakazują by efektywność czynników chemoprewencyjnych była mierzona za pomocą tych samych metod jakie wykorzystywane są do badania nowych leków. W przypadku stresu oksydacyjnego biomarkerami *in vivo* są zazwyczaj produkty utlenienia lipidów, produkty oksydatywnej modyfikacji białek i cukrów, pęknięcia nici DNA oraz produkty utlenienia zasad azotowych, jak również produkty utlenienia endogennych przeciwutleniaczy. Wykorzystanie próbek ludzkich w wielu przypadkach potwierdziło wpływ przeciwutleniaczy oraz diety w nie bogatej na obniżenie poziomu biomarkerów stresu oksydacyjnego w ludzkim organizmie (Gouda i in., 2016). Wpływ ten był bardziej widoczny w przypadku gdy obiektem badań były osoby narażone na podwyższony poziom stresu oksydacyjnego, np. cierpiące na nadciśnienie, niż w przypadku gdy badano osoby zdrowe (Karadag i in., 2009). Szczególnie było to widoczne, gdy przeciwutleniacze dostarczane z pożywieniem były podawane w celu obniżenia kardiotoksyczności terapii przeciwnowotworowej antracyklinami, jako wsparcie naturalnego antyoksydacyjnego systemu obronnego przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym (Piasek i in., 2009). Wskazano także szereg mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za wzmocnienie komórkowej bariery antyoksydacyjnej wspomaganej przez roślinne związki aktywne redoksowo.

Egzogenne związki o niskim potencjale redukcyjnym mają zdolność neutralizacji RFT w wyniku bezpośredniej reakcji chemicznej. Jednakże wyniki badań sugerują, że przeciwutleniacze obecne w żywności mogą wykazywać także aktywność chemoprewencyjną niezależnie od ich zdolności do chemicznego unieszkodliwiania RFT. Wiele z nich wpływa na regulację sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, moduluje aktywność hormonów oraz czynników wzrostu, hamuje aktywność onkogenów, aktywuje geny supresorowe, indukuje różnicowanie, aktywuje proces apoptozy, inicjuje

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

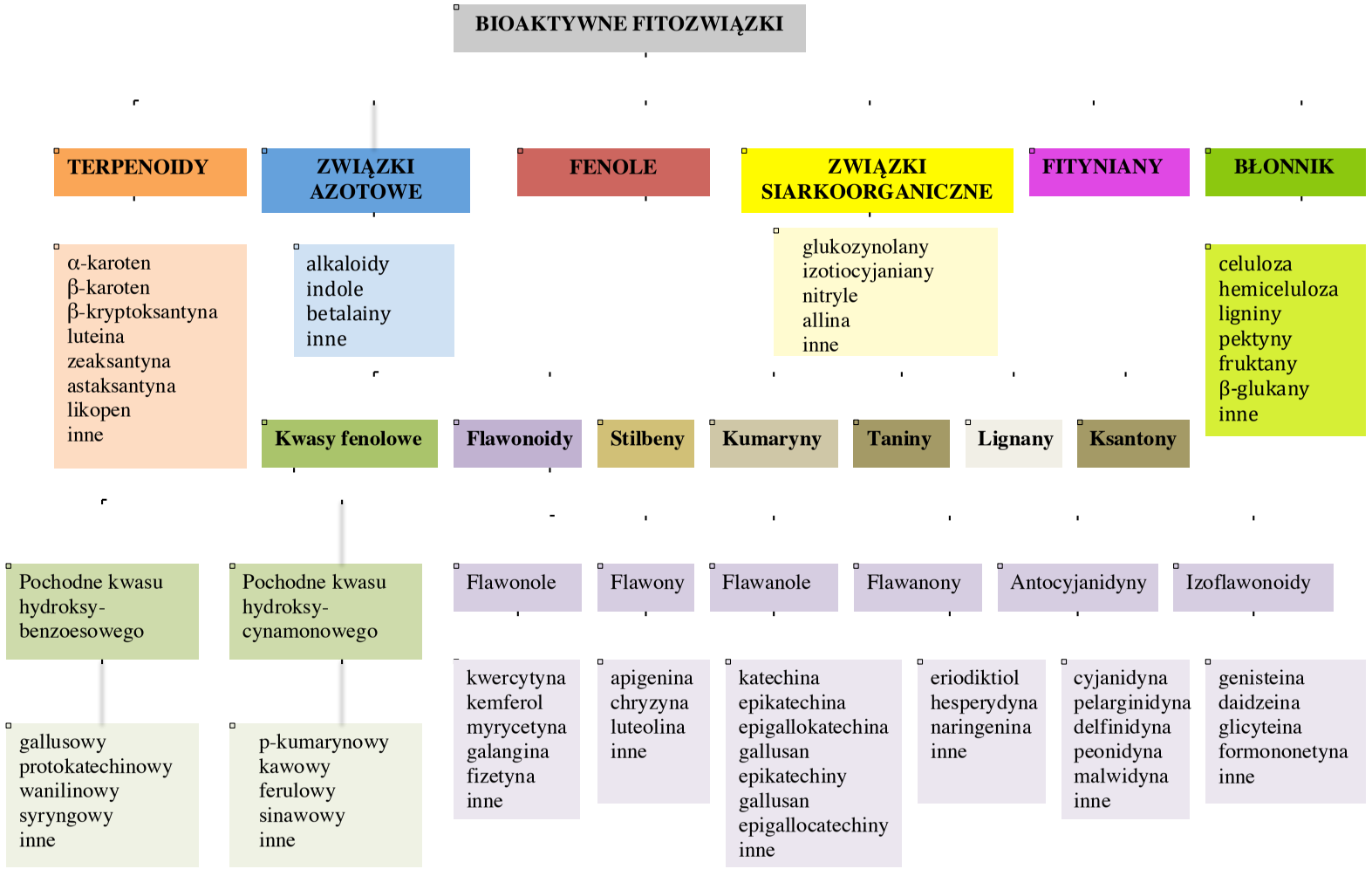
odpowiedź immunologiczną, hamuje angiogenezę oraz stany zapalne (Dinkova-Kostova i in., 2001; Mehta i in., 2010).

Za przykład ochrony organizmu przed stresem oksydacyjnym niech posłuży system kontrolowany przez czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. nuclear factor erythroid 2). Pod jego kontrolą jest ekspresja genów kodujących białka działające cytoprotekcyjnie, m.in. genów zawierających w swych promotorach sekwencję ARE, czyli tzw. element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. antioxidant response element). Kodują one enzymy II fazy detoksykacji takie jak S-transferazy glutationowe (GST) a także syntetazę γ -glutamylocysteinową (γ-GCS) ważną w detoksykacji ksenobiotyków, reduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) i oksygenazę hemowę 1 (HO-1) odgrywające rolę w neutralizacji RFT (Dinkova-Kostova, i in. 2001). Jak wspomniano, aktywacja czynnika Nrf2 następuje w odpowiedzi na stres oksydacyjny i jest ona jednym z mechanizmów proponowanych w chemoprewencji, bowiem poprzez indukcję jego działania dochodzi do przyspieszenia metabolizmu detoksykacyjnego substancji toksycznych, w tym także RFT, zdolnych do inicjacji procesu kancerogenezy (Lee i Surh, 2005). System ten działa sprawnie przy stosunkowo niewielkim stresie oksydacyjnym, jednakże w przypadku kiedy ilość RFT przekracza możliwości organizmu do obrony przed ich negatywnymi skutkami, niezbędna jest zewnętrzna stymulacja czynnika Nrf2 (Giudice i Montella, 2006). Wiele substancji pochodzenia roślinnego wykazuje zdolność do indukcji enzymów fazy II detoksykacji poprzez aktywację czynnika Nrf2, np. flawonoidy czy izotiocyjaniany (Bryan i in., 2013; Magesh i in., 2012), dzięki czemu dieta bogata w warzywa i owoce może być pomocna w walce ze stresem oksydacyjnym i jego negatywnymi skutkami zdrowotnymi.

Do tej pory odkryto wiele związków pochodzenia roślinnego wykazujących aktywność chemoprewencyjną. Są to głównie drugorzędowe metabolity roślinne. Podział bioaktywnych fitozwiązków ze względu na ich budowę chemiczną jest pokazany na rys. 4 (na podstawie: Liu, 2004). Najważniejsze grupy związków z punktu widzenia badanych w tym projekcie roślin jadalnych zostały pokrótce scharakteryzowane poniżej.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

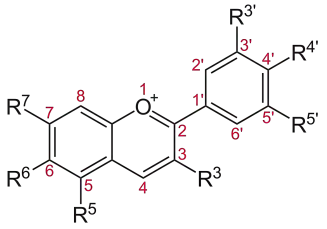


Rys. 4. Podział bioaktywnych fitozwiązków występujących w roślinach jadalnych (na podstawie: Liu, 2004).

Związki fenolowe

Roślinne związki fenolowe, zwykle określane mianem polifenoli to powszechnie występująca grupa drugorzędowych metabolitów zawierających jeden lub więcej pierścień aromatyczny połączony z co najmniej jedną grupą hydroksylową (Liu, 2004). W roślinach pełnią funkcję ochronną przeciwko promieniowaniu UV i RFT, mają też działanie antybiologiczne przeciwdziałając atakom patogenów i szkodników. Polifenole dzielą się na szereg grup (Rys. 4), spośród których najbardziej rozpowszechnioną grupę stanowią flawonoidy i kwasy fenolowe (Liu, 2004).

Badania nad chemoprewencyjnym potencjałem tych związków, prowadzone w różnych modelach badawczych i z udziałem ochotników, wskazują na możliwość ich zastosowania w profilaktyce chorób nowotworowych, sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych oraz przeciwdziałanie otyłości. (Cooke i in., 2005). Polifenole wykazują szereg właściwości biologicznych, takich jak działanie antyangiogeneryczne, antyproliferacyjne, przeciwmutagenne, przeciwzapalne, zdolność do blokowania cyklu komórkowego, stymulowania aktywności enzymów II fazy detoksykacji przeciwdziałania uszkodzeniom DNA, a także indukowania procesu różnicowania komórek (Fraga i in., 2010; Yao i in., 2004). Związki z tej grupy są przede wszystkim przeciwutleniaczami, dzięki czemu mogą chronić organizm ludzki przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego (Fraga i in., 2010).



Rys. 5. Wzór ogólny antocyjanów

Szczególnie wysoką aktywnością przeciwutleniającą charakteryzują się antocyjany (Rys. 5). Reprezentują one dużą grupę rozpuszczalnych w wodzie barwników roślinnych, odpowiedzialnych za czerwony, niebieski i fioletowy kolor większości owoców (np. owoców jagodowych) i warzyw (np. czerwonej kapusty czy cebuli). Należą do klasy flawonoidów i w normalnych warunkach występują w formie glikozydów, forma aglikonu jest bowiem bardzo niestabilna (Smeriglio i in., 2016). W naturze najczęściej spotykane są glikozydy cyjanidyny, delfinidyny, malwidyny, pelargonidyny, peonidyny i petunidyny. Liczne badania potwierdzają, że spożywanie pokarmów bogatych w antocyjany może zmniejszać ryzyko

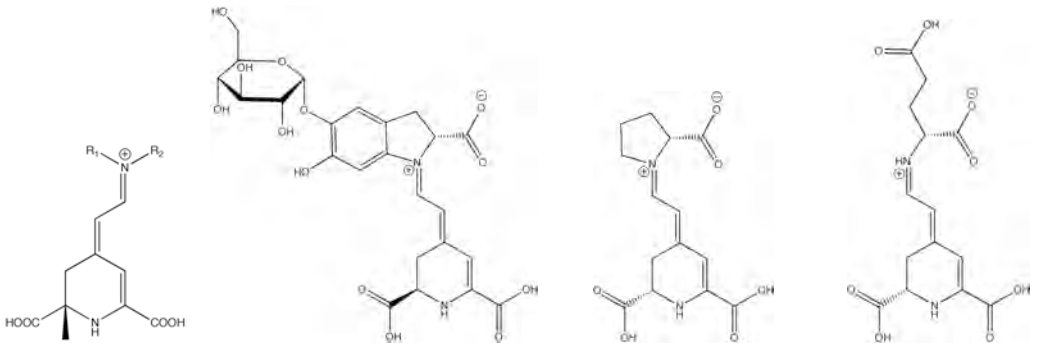
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

zachorowania na choroby nowotworowe i układu krążenia, co może mieć związek z ich silnymi właściwościami przeciwutleniającymi (Yang i Kortesniemi, 2015; Yousuf i in., 2016).

Betalainy

Betalainy to grupa pochodnych kwasu betalamowego, które odpowiadają za czerwony (betacyjaniny) i żółty (betaksantyny) kolor niektórych kwiatów, owoców i warzyw (Butera i in., 2002; Gokhale i Lele, 2014). Znajdują się głównie w wakuolach i cytozolu komórek roślinnych. Najpowszechniejszą betalainą jest betanina (Rys. 6) – czerwony pigment występujący m.in. w burakach.

Z żywieniowego punktu widzenia betalainy stanowią trudno dostępną grupę fitozwiązków ze względu na ich małe rozpowszechnienie w roślinach jadalnych. Najważniejszymi jadalnymi ich źródłami są buraki czerwone, opuncja figowa, amarantus i pitahaja (Cejudo-Bstante i in., 2015). Najważniejszą betalainą w czerwonym buraku jest betanina, natomiast w opuncji betanina i indykaksantyna. Ze względu na swoje ograniczone występowanie, betalainy nie są tak szeroko badanymi fitozwiązkami jak antocyjany czy karotenoidy. Wiadomo, że wykazują silne właściwości przeciwutleniajace (Kaur i in., 2012; Klewicka, 2012), wykazano również ich zdolność do inhibicji wzrostu raka jajnika i pęcherza (Zou i in., 2014).



kwas betalamowy betanina indykaksantyna wulgaksantyna I

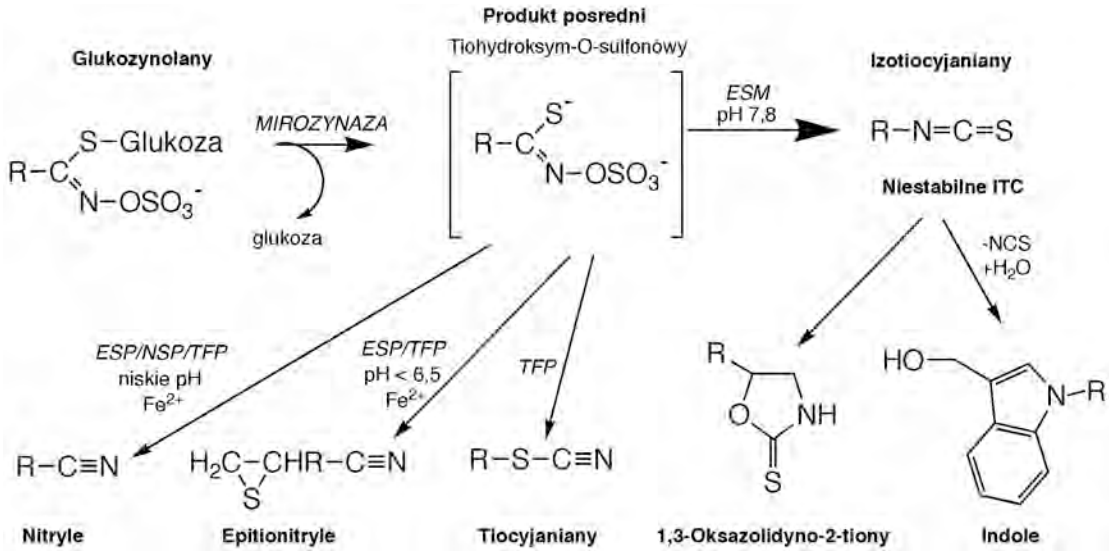
Rys. 6. Struktury kwasu betalamowego i najczęściej spotykanych betalain

Glukozynolany

Glukozynolany (GLS) to grupa metabolitów wtórnych charakterystycznych dla roślin z rodziny *Brassicaceae*. Są to stabilne, rozpuszczalne w wodzie tioglikozydy. Na strukturę tych związków składają się grupa β-D-tioglukozowa, oraz łańcuch boczny

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

pochodzący od aminokwasu. W oparciu o strukturę łańcucha bocznego klasyfikuje się glukozynolany jako alifatyczne, aromatyczne lub indolowe Do tej pory zidentyfikowanych zostało około 200 związków z tej grupy (Manchali i in., 2012). W roślinie stanowią one element systemu ochrony przed patogenami. Związki te nie wykazują aktywności biologicznej *per se,* dopiero produkty ich hydrolizy uwalniane w wyniku działania enzymu mirozynazy są bioaktywnymi metabolitami (Morant i in., 2008). Reakcja z udziałem mirozynazy prowadzi do powstania produktu pośredniego (Rys. 7), którego dalsze przemiany zależą od budowy łańcucha bocznego, obecności innych czynników białkowych, takich jak białko epitiospecyficzne (ESP), białko nitrylospecyficzne (NSP) (Wittstock, i in. 2004), białko tworzące tiocyjaniany (TFP) (Burow i in., 2006) i epitiospecyficzne białko modyfikujące (ESM) (Zhang i in., 2006) oraz warunków środowiska (pH) (Vig i in., 2009; Galletti i in., 2008). Możliwe drogi rozpadu glukozynolanów zestawiono na rysunku 7.



Rys. 7. Przemiany glukozynolanów do produktów rozpadu z uwzględnieniem czynników białkowych (ESP – białko epitiospecyficzne, NSP – białko nitrylospecyficzne, TFP – białko tworzące tiocyjaniany, ESM – epitiospecyficzne białko modyfikujące)

Spośród powstających produktów rozpadu GLS z punktu widzenia potencjału prozdrowotnego szczególne znaczenie mają izotiocyjaniany (ITC) i indole, które poprzez oddziaływanie na czynniki transkrypcyjne, takie jak omawiany już Nrf2, uczestniczący w indukcji stanów zapalnych NF-κB, czy stymulowany obecnością aromatycznych ksenobiotyków AhR (Śmiechowska i in., 2008) uruchamiają szereg mechanizmów chemoprewencyjnych:

- indukują apoptozę (Śmiechowska i in., 2008; Srivastava i Singh, 2004),

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

- stymulują ekspresję genów cytoprotekcyjnych (Śmiechowska i in., 008)
- indukują nekrozę komórek nowotworowych (Śmiechowska i in., 2008; Kuang i Chen, 2004),
- hamują angiogenezę (Śmiechowska i in., 2008; Bertl i in., 2006; Mi i in., 2008) czy też
- hamują proliferację komórek nowotworowych (Śmiechowska i in., 2008).

Z drugiej jednak strony, wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo* prowadzone przez kilka ostatnich lat, wskazują na potencjalnie genotoksyczne i mutagenne działanie produktów rozpadu GLS, szczególnie indolowych, takich jak glukobrassycyna, neoglukobrassycyna oraz 4-metoksyglukobrassycyna (Baasanjav-Gerber i in., 2011; Glatt i in., 2011). Wykazano, że związki te w czystej postaci przyczyniają się do powstawania adduktów DNA na poziomie 100-krotnie wyższym niż w przypadku pochodnych GLS alifatycznych oraz aromatycznych (Baasanjav-Gerber i in., 2010).

II.6. Warzywa i owoce a izolowane bioaktywne fitozwiązki

Wyniki badań wskazujące na działanie fizjologiczne roślinnych związków fenolowych, takich jak przykładowo antocyjany czy resweratrol (Cooke i in., 2005; Dudley i in., 2008), bardzo szybko doczekały się komercjalizacji i spowodowały masową produkcję suplementów diety wzbogaconych w wyizolowane z roślin substancje określane mianem antyoksydantów, niezależnie od ich rzeczywistych własności chemicznych. Badania epidemiologiczne wykazały jednak, że entuzjazm producentów tych parafarmaceutyków nie jest w pełni uzasadniony. Okazało się, że wyizolowane bioaktywne fitozwiązki czy witaminy o niskim potencjale redukcyjnym (C, E, A) nie są już tak skutecznymi czynnikami chemoprewencyjnymi, jak zawierające je owoce lub warzywa (Potter, 2014). O ile w przypadku chorób układu krążenia prewencja poprzez kontrolę hiperlipidemii oraz nadciśnienia przynosi rezultaty, o tyle w walce z nowotworami stosowanie chemoprewencji nadal w większości przypadków nie kończy się sukcesem a czasami nawet moe powodować przyspieszenie postępu choroby.

Taką porażką było użycie prekursorów witaminy A w prewencji raka płuc. Aktywność przeciwutleniająca retinolu oznaczona *in vitro* oraz wyniki badań epidemiologicznych wskazujące na zależności pomiędzy niskim stężeniem retinolu w organizmie a zwiększoną zachorowalnością na raka płuc (Wald, 1980) doprowadziły

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

do stwierdzenia, że korzystna może być suplementacja diety osób palących papierosy, a przez to bardziej narażonych na nowotwory płuc, β-karotenem. Postanowiono więc przeprowadzić równolegle dwie serie badań klinicznych, do których wybrano osoby o zwiększonym ryzyku zachorowania na ten typ nowotworu. W jednej z nich, przeprowadzonej w Finlandii, ATBC (Alpha-Tocopherol and Beta-caroten Trial), 29 133 palaczom w wieku 50-69 lat podawano β-karoten, witaminę E, mieszaninę obu substancji, bądź placebo. Alarmujące wyniki otrzymane po 5 latach od rozpoczęcia badań spowodowały natychmiastowe zakończenie programu. Okazało się, że suplementacja β -karotenem spowodowała 18 % wzrost ryzyka zachorowania na nowotwór płuc (ATBC, 1994; Omenn, 1996). Badania te zostały zaprojektowane na podstawie wstępnych obiecujących wyników badań epidemiologicznych (Omenn, 1996), ale biologiczne działanie β-karotenu w połączeniu z dymem tytoniowym nie zostało sprawdzone w warunkach ani *in vitro*, ani w modelach zwierzęcych, a jak się okazało same badania epidemiologiczne nie stanowią wystarczającej przesłanki do przeprowadzenie testów klinicznych. W podobnie zaplanowanym projekcie CARET (The Beta-Caroten and Retinol Efficacy Trial), realizowanym w USA, palaczom podawano β-karoten i retinol. Wyniki tego badania także wykazały 28 % wzrost ryzyka zachorowania na nowotwory płuc (Omenn, 1996). Podsumowując, wspomniane badania kliniczne dowiodły, że suplementacja diety β-karotenem, pomimo obiecujących wstępnych wyników badań epidemiologicznych, nie tylko nie zmniejszała ryzyka zachorowania na raka płuc u osób szczególnie narażonych na ten nowotwór, ale w niektórych przypadkach je zwiększała.

Podobnie w przypadku suplementacji diety retinolem i retinoidami, otrzymano obiecujące obniżenie ryzyka zachorowania na raka skóry w badaniach epidemiologicznych, jednakże wyniki te nie znalazły odzwierciedlenia w testach klinicznych (Moon, 1997; Levine, 1997). Brak efektu chemoprewencyjnego w adaniach klinicznych stwierdzono również dla suplementów diety zawierających kwas foliowy (Ulrich, 2007), witaminy E i C (Gaziano, 2009) czy selen (Clark, 1996; Petters, 2008).

W swojej pracy przeglądowej zatytułowanej „The failure of cancer chemoprevention" Potter wskazuje na powyższe przykłady jako dowód na całkowity upadek idei chemoprewencji nowotworowej, przynajmniej w takiej formie w jakiej proponowana była do tej pory. Uważa, że największym błędem było stosowanie wyizolowanych bioaktywnych fitozwiązków i podawanie ich w formie suplementów

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

diety (Potter, 2014). Metabolizm czystych związków, niezwiązanych z matrycą roślinną różni się od metabolizmu tych samych związków znajdujących się w owocach i warzywach. W chemoterapii nowotworowej najczęściej stosuje się mieszaniny kilku leków różniących się mechanizmami działania, dzięki czemu jest większe prawdopodobieństwo pozbycia się wszystkich zmienionych komórek, nawet tych opornych na niektóre z użytych terapeutyków. Stąd też coraz częściej sugerowane jest użycie w miejsce suplementów diety zawierających jedną substancję bioaktywną, pełnych pokarmów bądź mieszaniny kilku bioaktywnych fitozwiązków, które w skojarzeniu umożliwią eliminację nawet pojawiających się komórek o nieprawidłowym fenotypie. (Jacobs i in., 2003)

Przykładowo małe dawki witaminy C, na poziomie dostępnym w surowych jabłkach, nie wykazały zdolności do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych w przeciwieństwie do ekstraktów z jabłek (Eberhardt i in. 2000). Ponadto ekstrakty z całych jabłek (miąższ + skórka) były bardziej aktywne od ekstraktów z samego miąższu. Podobnie wyglądała sytuacja w przypadku badań w modelu zwierzęcym, gdzie ekstrakt z całych jabłek hamował rozwój indukowanych guzów sutka w większym stopniu niż ekstrakt z samego miąższu (Liu i in., 2005). Co ważniejsze, badania kliniczne z udziałem mężczyzn cierpiących na raka prostaty udowodniły, że dieta bogata w pomidory stanowi skuteczniejszy czynnik chemoprewencyjny niż suplementacja diety czystym likopenem (Stacewicz-Sapuntzakis i in., 2005; Boileau i in., 2003).

Innym problemem stosowania suplementów diety są ich niefizjologiczne dawki, wielokrotnie czasem przekraczające zawartość danych fitozwiązków w żywności. Jak wspomniano wcześniej przeciwutleniacze podane w zbyt dużym stężeniu mogą wywoływać stres redukcyjny bądź indukować procesy zwiększające stres oksydacyjny (Korge i in., 2015).

Najnowsza wiedza nie dostarcza uzasadnienia dla podawania suplementów diety zawierających wyizolowane pojedyncze bioaktywne fitozwiązki. Lepszym rozwiązaniem jest wzbogacenie diety w większą ilość warzyw i owoców. Obecnie badacze poszukują odpowiedzi na pytanie dlaczego tak jest.

II.7. Koncepcja food synergy

Poglądy na istotność sposobu odżywiania dla zdrowia człowieka z biegiem lat ulegały znacznej ewolucji. Za pierwszego uczonego, który zwrócił uwagę na tę

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

zależność uznaje się Hipokratesa, ojca współczesnej medycyny, który 2500 lat temu powiedział „Niechaj pożywienie będzie lekarstwem, a lekarstwo pożywieniem" (Mehta i in., 2010). Przez kolejne stulecia głównym problemem było zapewnienie dostatecznej ilości pożywienia dla rosnącej populacji mieszkańców Ziemi. W XX wieku zadaniem nauk o żywieniu w kontekście zdrowia było przede wszystkim zapobieganie infekcjom pokarmowym, czyli mikrobiologiczne bezpieczeństwo żywności. Żywieniowcy skupiali swoją uwagę także na witaminach i niezbędnych minerałach zawartych w produktach spożywczych, bowiem jednostki chorobowe powiązane z ich niedoborem lub nadmiarem były już poznane (Jacobs i in., 2003). W ubiegłym wieku rozwinął się również pogląd, który dzisiaj powoli zostaje wypierany, że pojedynczy składnik żywności może wyleczyć chorobę. O ile w przypadku niedoborów określonego składnika żywności założenie to znajduje potwierdzenie, o tyle w przypadku chorób cywilizacyjnych ich podłoże jest znacznie bardziej skomplikowane i niezbędna jest bardziej złożona interwencja dietetyczna (Jacobs i in., 2003; Liu i in., 2004). Jak wspomniano w rozdziale 2.1, zmiana stylu życia sprawiła, że obecnie przyczyną głównych chorób dietozależnych nie są już niedobory substancji odżywczych w diecie, a raczej nadmiar spożywanych pokarmów, jak również dieta uboga w owoce i warzywa, wysokokaloryczna i złożona z produktów wysokoprzetworzonych. W przypadku zwalczanie dietozależnych dolegliwości użycie pojedynczych, wyizolowanych substancji raczej nie będzie skuteczne (Jacobs i in., 2009, Jacobs i in., 2013).

Jak już wspomniano, liczne badania epidemiologiczne wykazały, że regularne spożywanie owoców i warzyw jest powiązane ze zmniejszeniem zagrożenia chorobami cywilizacyjnymi przy czym, wyizolowane bioaktywne substancje, także roślinne przeciwutleniacze nie wykazują tak znaczących właściwości prozdrowotnych jak dieta bogata w owoce i warzywa zawierające te związki (Liu i in., 2005). Wyjaśnieniem tego zaskakującego zjawiska może być zyskująca w ostatnich latach coraz większą popularność koncepcja zaproponowanego przez Jacobsa i wsp. (Jacobs i in., 2003). Synergizmu Żywieniowego (ang. Food Synergy), definiowanego jako addytywny bądź silniejszy niż addytywny wpływ różnych składników obecnych w żywności na zdrowie W celu pełniejszego zrozumienia tych zależności, jak sugerują jej twórcy, konieczne jest rozpoczęcie od określenia wpływu całych pokarmów na stan zdrowia, a następnie szczegółowe poszukiwania, które bioaktywne związki są odpowiedzialne za obserwowaną aktywność i czy mogą zachodzić interakcje pomiędzy różnymi związkami obecnymi w żywności, które prowadzą do zwiększenia bądź zmniejszenia

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

potencjału prozdrowotnego. W tym celu mogą być wykorzystywane badania w warunkach *in vitro,* jak również badania kliniczne i epidemiologiczne (Jacobs i in., 2003).

Jednym z najczęściej przytaczanych dowodów na istnienie synergizmu żywieniowego są wyniki badań epidemiologicznych nad wpływem konsumpcji pełnoziarnistych pokarmów na obniżenie zachorowalności na nieinfekcyjne choroby przewlekłe. Takiego profilaktycznego efektu nie zaobserwowano ani w przypadku diety zawierającej podobne kategorie produktów żywnościowych, ale wytworzonych z użyciem oczyszczonych ziaren, czyli w przypadku suplementacji samym błonnikiem, co może wskazywać na synergistyczne działanie błonnika oraz innych związków obecnych w pełnym ziarnie (Jacobs i in., 2003). Podobne różnice zaobserwowano dla innych pełnych pokarmów, np. warzyw i owoców, które w porównaniu z wyizolowanymi substancjami wykazywały dużo wyższy potencjał prozdrowotny (Steinmetz i Bowen, 1996; Dutta-Roy, 2002; Fraser i in., 1992; Ellsworth i in., 2001; Kushi i in., 1990).

Dostępne metody badawcze, które pozwoliłyby na ustalenie zależności między dietą a zapadalnością na choroby cywilizacyjne mają znaczne ograniczenia. W związku z tym, próby określenia, które z substancji obecnych w żywności odpowiadają za jej efekty prozdrowotne często prowadzą do wyciągnięcia fałszywych wniosków, tak jak to było w przypadku omówionych uprzednio badań nad β-karotenem. Konieczne staje się rozwinięcie warsztatu badawczego, który umożliwi uzyskanie wiarygodnych wyników dla produktów żywnościowych jako całości, a nie tylko wybranych oczyszczonych substancji. Wyniki takich badań mogłyby, jak to powyżej wspomniano stanowić punkt wyjścia do poszukiwania pojedynczych substancji bioaktywnych lub ich grup odpowiedzialnych za potencjał chemoprewencyjny. Proponowana jest również odwrotna perspektywa tzn. czy wiedza na temat aktywności biologicznej pojedynczych substancji pozwala wnioskować o potencjalnej aktywności mieszanin tych substancji (Jacobs i in., 2012). Innym możliwym rozwiązaniem jest badanie bioaktywnej substancji w różnych pokarmach i poszukiwanie zbieżności w wynikach, co pozwoliłoby ocenić czy efekt prozdrowotny udokumentowany dla czystej substancji będzie widoczny niezależnie od matrycy żywieniowej, w której ta substancja jest obecna (Jacobs, 2006). To ostatnie podejście postanowiłam przetestować w swoich badaniach dla fitozwiązków o charakterze przeciwutleniaczy – antocyjanów i betalain – o udokumentowanej aktywności biologicznej.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

III.1. Zastosowana aparatura i odczynniki

III.1.1. Odczynniki chemiczne

Tabela 1 zawiera spis wszystkich odczynników chemicznych użytych w przeprowadzonych badaniach oraz ich producentów.

Tabela 1. Stosowane odczynniki chemiczne

Nazwa polska	Nazwa angielska	Producent
2-Propanol	2-Propanol	Merck
Sól diamonowa kwasu 2,2'-azynobis(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonianowego) (ABTS)	2,2-Azinobis-(ethyl-2,3-dihydrobenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt	Sigma Aldrich
Acetonitryl (ACN)	Acetonitrile	Sigma Aldrich
Albumina	Albumin	Sigma Aldrich
Test Amesa MPF	Ames MPF test	Xenometrix
Kwas askorbinowy	Ascorbic acid	Sigma Aldrich
α-Amylaza	α-Amylase	Sigma Aldrich
α-Glukozydaza	α-Glucosidase	Sigma Aldrich
Zestaw do oznaczania aktywności przeciwutleniającej w komórkach typu OxiSelect	OxiSelect Cellular Antioxidant Activity Assay Kit	Cell Biolabs
Cyjanidyna	Cyanidine aglycone	Extrasynthese
Chlorek 2,4-dinitrobenzenu (CDNB)	2,4-Dinitrobenzene chloride	Sigma Aldrich
Siarczan (VI) miedzi II	Copper (II) sulfate (VI)	Sigma Aldrich
Kwas 3,5-dinitrosalicylowy (DNS)	3,5-Dinitrosalicylic acid	Sigma Aldrich
α-D-Glukopiranozyd *p*-nitrofenylu (pNPG)	*p*-Nitrophenyl α-D-glucopyranoside	Sigma Aldrich
Sól disodowa 2,6-dichloroindofenolu (DCPIP)	2,6-Dichlorophenolindophenol sodium salt hydrate	Sigma Aldrich
Eter dietylowy	Diethyl eter	POCH
2,2-Difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH)	2,2-Diphenylo-1-picrylohydrazyl	Sigma Aldrich
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Dimethyl sulfoxide	Sigma Aldrich
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	Ethylenediaminetetraacetic acid	Sigma Aldrich
Alkohol etylowy	Ethanol	POCH
Chlorek żelaza (III)	Iron (III) chloride	Sigma Aldrich
Siedmiowodny siarczan (VI) żelaza (III)	Iron(II) sulphate heptahydrate	Sigma Aldrich
Odczynnik Folin-Ciocialteu	Folin-Ciocialteu reagent	Merck
Kwas mrówkowy	Formic acid	Merck
Glukotrapeolina	Glucotrapeolin	AppliChem

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Glutation (GSH)	Glutathione	Sigma Aldrich
Kwas chlorowodorowy	Hydrochloric acid	POCH
Nadtlenek wodoru	Hydrogen peroxide	Sigma Aldrich
Kwas indolo-3-octowy (I3AA)	Indole-3-acetic acid	Merck
Indolo-3-acetonitryl (I3ACN)	Indole-3-acetonitrile	Merck
Indolo-3-karbinol (I3C)	Indole-3-carbinol	Sigma Aldrich
3,3'-Diindolometan (DIM)	3,3'-Diindolylemethane	Merck
Mrówczan imidazolu	Imidazol formate	Sigma Aldrich
Jod krystaliczny	Iodide crystals	Sigma Aldrich
Kwas siarkowy VI	Sulfuric acid	Sigma Aldrich
Alkohol metylowy	Methanol	Merck
Izotiocyjanian metylu (MITC)	Methyl isothiocyanate	Sigma Aldrich
Izotiocyjanian allilu (AITC)	Allyl isothiocyanate	Sigma Aldrich
Izotiocyjanian fenylu (PITC)	Phenyl isothiocyanate	Sigma Aldrich
Izotiocyjanian benzylu (BITC)	Benzyl isothiocyanate	Sigma Aldrich
Izotiocyjanian fenyloetylu (PEITC)	Phenylethyl isothiocyanate	Sigma Aldrich
Izotiocyjanian 3-metylotiopropylu (3-MTPITC)	3-(Methylthio)propyl isothiocyanate	Sigma Aldrich
Sulforafan (SFN)	Sulforaphane	Sigma Aldrich
N-acetylo-L-cysteina (NAC)	N-acetyl-L-cysteine	Sigma Aldrich
Węglan sodu	Sodium carbonate	
1,2-Benzenoditiol	1,2-Benzenedithiol	Sigma Aldrich
Agaroza o niskiej temperaturze topnienia (LPM)	Low melting point agarose	Sigma Aldrich
Agaroza o normalnej temperaturze topnienia (NMP)	Normal melting point agarose	Sigma Aldrich
Bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazolo)-2,5-difenylo-2H-tetrazolu (MTT)	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	Sigma Aldrich
Chlorek sodu	Sodium chloride	Sigma Aldrich
Fosforan dinukleotydu nikotynoaminoadeninowego (NADPH)	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Sigma Aldrich
Wodorotlenek sodu	Sodium hydroxide	P.P.H Standard
n-Heksan	n-Hexan	Sigma Aldrich
Octan etylu	Ethyl acetate	Sigma Aldrich
Bufor fosforanowy - sól fizjologiczna buforowana fosforanami (PBS)	Phosphate buffered saline	Sigma Aldrich
Chlorek potasu	Potassium chloride	Sigma Aldrich
Diwodorofosforan potasu	Potassium phosphate monobasic	Sigma Aldrich
Wodorofosforan potasu	Potassium phosphate dibasic	Sigma Aldrich
Jodek potasu	Potassium iodide	Sigma Aldrich
Sinigryna	Sinigrine	Fluka
Diwęglan sodu	Sodium dicarbate	Sigma Aldrich
Nadsiarczan sodu	Sodium persulfate	Sigma Aldrich
Winian sodowo-potasowy	Sodium potassium tartrate	Sigma Aldrich
Siarczan sodu	Sodium sulfate	Sigma Aldrich
Skrobia	Starch	Sigma Aldrich
Sulfataza	Sulfatase	Sigma Aldrich

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Sybr Green	Sybr Green	Sigma Aldrich
2,4,6-tri-pirydylo-S-triazyna (TPTZ)	2,4,6-tris(2-pyridyl)-*S*-triazine	Sigma Aldrich
Pożywka McCoy's 5A Medium Modified	McCoy's 5A Medium Modified	Sigma Aldrich
Płodowa surowica cielęca (FBS)	Foetal bovine serum	Sigma Aldrich
Penicylina/Streptomycyna	Penicilin/Streptomycin	Sigma Aldrich
Trypsyna w roztworze EDTA	Trypsin EDTA solution	Sigma Aldrich
Kwas trifluorooctowy	Trifluoroacetic acid	Sigma Aldrich
Tris(hydroksymetylo)aminometan	Trisma base (tris(hydroxyamino)methane)	Sigma Aldrich
Eter polimeru glikolu polietylenowego i *p*-tert-oktylofenolu	Triton X100 (4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol solution)	Sigma Aldrich
Kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy (Trolox)	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid	Sigma Aldrich

III.1.2. Aparatura badawcza

- Aparat Soxhleta
- Aspirator – Integra Vacusafe (Integra Biosciences AG)
- Chromatograf gazowy z detektorem FID – Elmer Autosystem XL (Perkin)
- Homogenizator – SilentCrusher M (Heidolph)
- Homogenizator Dounce'a (Sigma Aldrich)
- Chromatograf HPLC – Agilent 1200 Series HPLC-DAD-MS (Agilent Technologies)
- Urządzenie do derywatyzacji postkolumnowej Pinnacle PCX Derivatization Instrument (Pickering Laboratories, Inc)
- Chromatograf HPLC LC-200 (Eksigent)
- Detektor QTRAP MS 5500 (AB Sciex)
- Chromatograf Micro-HPLC LC200 (Eksigent)
- Detektor TripleTOF 5600 MS (AB Sciex)
- Inkubator – Heal Force Smart Cell, HF90 (Heal Force)
- Kolumny chromatograficzne:
  - Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 3,5 μm) (Agilent)
  - HALO C18 (50 x 0,5 mm, 2,7 μm) (Eksigent)
  - HP AQ RP-C18 (150 x 4,6 mm, 3 μm) (Grace Altima)
  - PFP 100A (150 x 4,6 mm, 5 μm) (Kinetex)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

- ❖ Gemini C18 (50 x 0,5 mm, 3 μm) (Phenomenex)
- ❖ XBridge C18 (150 × 2,1 mm, 3,5 μm) (Waters)
- ❖ DB-23 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm) (J&W Scientific)

- Komora laminarna – Airstream ESCO Class II BSC (ESCO)
- Łaźnia ultradźwiękowa – Ultrasonic Cleaner (VWR)
- Liofilizator – CHRIST Alpha 1-4 LD plus (SciQuip)
- Mikroskop fluorescencyjny wyposażony w kamerę i oprogramowanie Metasystem – Metafer (Zeiss)
- Mikroskop odwrócony - Juli Smart fluorescent cell analyzer (Digital Bio)
- pH-metr Seven Easy (Mettler Toledo)
- Refraktometr Abbego ze skalą cukrową i obiektywem Carl Zeiss Jena 291925 (ZEISS)
- Spektrofotometr - Nanodrop 2000c (Thermo Scientific)
- Spektrofotometryczny czytnik płytek UV/VIS - model TECAN Infinite M200 (TECAN)
- Spryskiwacz do płytek TLC 108540 DC 0084-5433 (Merck)
- Termoblok – QDB4 (Grant)
- Titrator T70 (Mettler Toledo)
- Waga analityczna – Excellence (Mettler Toledo)
- Wagosuszarka MAC 110 (Radwag)
- Wirówka – model Heraeus Megafuge 16R Centrifuge (Eppendorff)
- Wyparka obrotowa – R-300 (Buchi)
- Wytrząsarka - Rotomax 120 (Heidolph)
- Zestaw do elektroforezy - Power Pac Basic (BioRad)

III.1.3. Przygotowanie roztworów i buforów

Odczynnik miedziowy	0,78 g $CuSO_4 \bullet 5H_2O$ rozpuszczono w roztworze winianu sodowo-potasowego (0,5 L, 10 mM), równolegle 100 g $NaCO_3$ rozpuszczono w 0.5 L NaOH (1 M), po czym połączono oba roztwory; przed użyciem przefiltrowano i zmieszano z wodą w stosunku 1:1 (v/v)
DPPH	sporządzono 0,1 mM metanolowy roztwór rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

ABTS	sporządzono 7 mM roztwór ABTS (sól diamonowa kwasu 2,2'-azynobis(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonianowego) w 2.45 mM roztworze wodnym $Na_2S_2O_6$, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 24 h bez dostępu światła w celu wytworzenia kationorodnika
DPPH	sporządzono 0,1 mM metanolowy roztwór rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl)
FC	komercyjnie dostępny odczynnik Folina-Ciocalteu'a (Merck) zmieszano z wodą w stosunku 1:9 (v/v)
Bufor octanowy pH 3.6	do wodnego roztworu octanu sodu (2,3 mM , 100 mL) dodano 1,6 mL lodowego kwasu octowego
10 mM roztwór TPTZ	TPTZ (2,4,6-tripirydylo-S-triazyna) rozpuszczono w 0,4 mL HCl (1 M) i uzupełniono wodą do 10 mL
Odczynnik FRAP	zmieszano bufor octanowy (pH 3,6) z roztworem TPTZ (10 mM) oraz roztworem $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (2,2 mM) w stosunku 10:1:1 (v/v/v)
Bufor fosforanowy pH 6,5	zmiareczkowano 17,5 % (w/v) roztwór K_2HPO_4 roztworem 13,5 % (w/v) KH_2PO_4 do uzyskania pH 6,5
Bufor KCl-P	przygotowano roztwór EDTA (7,4 % w/v) oraz KCl (2,3 % w/v) w buforze fosforanowym o pH 6,5
Roztwór CDNB	4 mL roztworu 10 mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzenu) w etanolu (96 %) dodawano po kropli do 196 mL buforu fosforanowego pH 6.5 ogrzewanego do temperatury 55 °C umieszczonego na mieszadle magnetycznym z funkcją grzania
Bufor fosforanowy pH 7,4	wodne roztwory $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (40 mM) oraz $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (9 mM) zmieszano w stosunku 4:1 (v/v), ustalono pH i dodano wody w stosunku 1:1 (v/v)
Bufor fosforanowy pH 8,5	wodny roztwór KH_2PO_4 (0,2 M) miareczkowano roztworem K_2HPO_4 (0,2 M) do uzyskania pH 8,5, otrzymany bufor rozcieńczono wodą w stosunku 1:1 (v/v)
Bufor lizujcy (A)	odważono 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA oraz 1,2 g Trizma-base/Tris. Składniki wsypano do 0,8 L wody i mieszając dodano NaOH (około 7 g/L), ustalono pH na poziomie 10,0 (stosując NaOH lub HCl), uzupełniono objętość do 1 L wodą, ponownie sprawdzono pH
Bufor lizujący (B)	przygotowano 100 mL 10% (v/v) roztworu wodnego Tritonu X-100

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Pełny bufor lizujący	zmieszano bufor lizujący (A) i bufor lizujący (B) w stosunku 9:1 (v/v) (np. 90 mL A + 10 mL B na 20 szkiełek)
Bufor elektroforetyczny	12 g NaOH rozpuszczono w wodnym roztworze EDTA (1 mM, 0,8 L), ustalono pH > 13 (pH ≈ 13,3), uzupełniono wodą do 1 L
Bufor neutralizujący	przygotowano 1 L wodnego roztworu Trizma-base/Tris (0,4 M), ustalono pH na poziomie 7,5 za pomocą HCl.
Bufor TE	rozpuszczono 1,576 g Tris-HCl w 0,8 L wodnego roztworu EDTA (1 mM), ustalono pH na poziomie 7,5 za pomocą NaOH, dopełniono wodą do 1 L
Sybr Green	odczynnik Sybr Green rozcieńczono przy użyciu DMSO w stosunku 1:9 (v/v), a następnie przed użyciem roztwór rozcieńczono za pomocą buforu TE w stosunku 1:1000
Mianowany roztwór jodu jodku potasu (0,01 M)	odważono 1,25 g jodku potasu i rozpuszczono w 50 mL wody. Odważono 0,65 g jodu krystalicznego i powoli dodawano do roztworu jodku potasu ciągle mieszając. Po rozpuszczeniu większości jodu powoli małymi porcjami dodawano wodę do objętości 1 L, aż do całkowitego rozpuszczenia się jodu. Przechowywano bez dostępu światła.
Bufor fosforanowy pH 6,9	zmiareczkowano 17,5 % (w/v) roztwór K_2HPO_4 roztworem 13,5 % (w/v) KH_2PO_4 do uzyskania pH 6,9
Roztwór DNS	przygotowano 1 % (w/v) roztwór DNS (kwasu 3,5-dinitrosalicylowego) w 0,4 M roztworze NaOH w 12 % wodnym roztworze winianu sodowo-potasowego

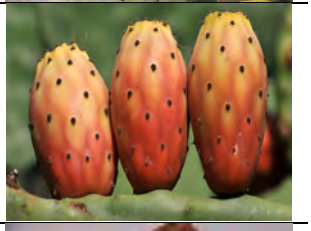
III.1.4. Materiał badawczy

Materiał roślinny do badań pochodził z prywatnych zbiorów lub został zakupiony na lokalnym targu owocowo-warzywnym. Opuncje zostały przywiezione z miejscowości Camerino we Włoszech, a fioletowy kalafior z Sycylii, okolice Katanii. Ponieważ nie były znane odmiany badanych owoców i warzyw, jak również brak było informacji odnośnie ich zbioru, udokumentowano, że charakteryzowały się one typowym profilem związków bioaktywnych porównywalnym z uprzednio publikowanymi wynikami badań. W związku z tym, że wiekszość roślin została zakupiona na lokalnym targu odzwierciedlają one odmiany dostępne dla okolicznych

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

społeczności. W przypadku badań służących charakterystyce botanicznej celowe byłoby poznanie odmian i warunków wzrostu badanych roślin, oraz prześledzenie sezonowej zmienności skladu badanych roślin. Ponieważ prowadzone badania mają służyć nie tyle charakterystyce roślin, co zbadaniu powiązań między zawartością związków bioaktywnych, a aktywnością biologiczną badanych roślin, nie był celowy wkład pracy i ponoszenie kosztów na prowadzenie szczegółowych analiz botanicznych. Ze względu na zawartość związków bioaktywnych materiał roślinny został podzielony na 3 grupy:

Tabela 2. Rośliny zawierające lub nie pigmenty z grupy **BETALAIN**

Gatunek rośliny	Nazwa łacińska	Odmiana	Skrót	Zdjęcie
Opuncja figowa	*Opuntia ficus indica* L.	żółta	YOp	
		pomarańczowa	OOp	
		czerwona	ROp	
Burak	*Beta vulgaris* L.	biały	WBeet	
		czerwony	RBeet	

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela 3. Rośliny zawierające lub nie pigmenty z grupy **ANTOCYJANÓW**

Gatunek rośliny	Nazwa łacińska	Odmiana	Skrót	Zdjęcie
Malina	*Rubus idaeus* L.	żółta	YRas	
		czerwona	RRas	
Winogrona	*Vitis vinifera* L.	białe	WGra	
		czerwone	RGra	
Porzeczka	*Ribes rubrum* L.	biała	WCur	
		czerwona	RCur	
	Ribes nigrum L.	czarna	BCur	

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Morwa	*Morus alba* L.	biała	WMul	
	Morus nigra L.	czarna	BMul	

Tabela 4. Warzywa z rodziny Brassicaceae zawierające lub nie pigmenty z grupy **ANTOCYJANÓW**

Gatunek rośliny	Nazwa łacińska	Odmiana	Skrót	Zdjęcie
Kapusta	*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L	biała	WCab	
		czerwona	RCab	
Kalafior	*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L	biały	WCau	
		fioletowy	PCau	

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2. Opis stosowanych procedur badawczych

III.2.1. Przygotowanie ekstraktów roślinnych

Jadalne części roślin zostały umyte, zamrożone (-20 °C), zliofilizowane i rozdrobnione w moździerzu. Tak przygotowane liofilizaty przechowywano w temp. zamrażalniczej (-20 °C) do czasu przeprowadzenia analiz.

W celu przygotowania ekstraktów roślinnych odważono 0,4 g wcześniej przygotowanego liofilizatu i dodano 5 mL wody dejonizowanej. Następnie przeprowadzono ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami przez okres 10 min, po czym próbkę odwirowano (3000 rpm, 20 min., 4°C) w celu oddzielenia pozostałości liofilizatu od uzyskanego ekstraktu wodnego. Procedurę ekstrakcji przeprowadzono dwukrotnie i uzyskane ekstrakty połączono i przechowywano w temp. -20 ° C do czasu analizy. Ekstrakty używane do testów biologicznych zostały dodatkowo poddane sterylizacji przy użyciu filtrów strzykawkowych 0,2 μm Millex GP (Millipore).

III.2.2. Oznaczanie zawartości substancji odżywczych w badanych roślinach

III.2.2.1. Oznaczenie zawartości wody

Surowy materiał roślinny (ok. 2 g) suszono w temperaturze 105°C z wykorzystaniem wagosuszarki MAC 110 (Radwag, Poland) do uzyskania stałej masy. Zawartość wody obliczono zgodnie ze wskazówkami AOAC (1980) ze wzoru: zawartość wody = 1 - (sucha masa/mokra masa)•100%.

III.2.2.2. Oznaczenie zawartości cukrów metodą refraktometryczną

Zawartość cukrów w ekstraktach z badanych par roślin oznaczono z użyciem metody refraktometrycznej opisanej przez Bagdacha i Pluszyńskieo (1967). W tym celu kilka kropel badanej próbki umieszczono na dolnym pryzmacie refraktometru (Abbe Refractometer, Carl Zeiss Jena 291925) i rozprowadzono równomiernie na całej powierzchni pomiarowej. Po opuszczeniu górnego pryzmatu, oświetlono lampą pole widzenia i ustawiono w nim ostrą i wyraźną linię rozgraniczającą jasną i ciemną część obrazu. Na uzyskanej w ten sposób granicy pól ustawiono środek krzyża widocznego w unetce refraktometru. Następnie ze skali cukrowej refraktometru odczytano zawartość cukrów w próbie w % (v/v). Badanie przeprowadzono w temperaturze pokojowej, każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.2.3. Oznaczenie zawartości białka

Ekstrakty roślinne do pomiaru zawartości białka przygotowano poprzez homogenizację 0,07 g liofilizatu w roztworze chlorku sodu (1 mL, 0,5 M) sporządzonego w buforze fosforanowym (20 mM, pH 7,4). Proces rozdrabniania przeprowadzono za pomocą homogenizatora SilentCrusher M (Heidolph). Następnie homogenizaty odwirowano (5000 rpm, 10 min, 4 °C) w celu usunięcia cząstek stałych, a zawartość białka oznaczono w otrzymanej cieczy zebranej znad osadu. Przygotowano również roztwór wzorcowy albuminy o stężeniu 0,4 mg/mL, który posłużył do sporządzenia rozcieńczonych roztworów (zakres 0,01 – 0,4 mg/mL) i uzyskania krzywej kalibracyjnej.

Całkowita zawartość białka w ekstraktach roślinnych została oznaczona metodą Lowry'ego opisaną przez Waterborg (2009). Do 2 mL odczynnika miedziowego (procedura przygotowania w punkcie 3.1.3) dodano 0,2 mL badanego ekstraktu bądź roztworu wzorcowego albuminy i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej (około 20 °C). Następnie dodano po 2 mL odczynnika Folina-Ciocalteu (rozcieńczonego wodą w stosunku 1:17 v/v) i inkubowano przez 15 minut w 55 °C. Zmierzono absorbancję próbek przy długości fali λ = 650 nm. Zawartość białka w badanych ekstraktach obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej uzyskanej dla albuminy ($y = 0,8265x + 0,1187$; $R^2 = 0,991$).

III.2.2.4. Oznaczenie zawartości witaminy C

Zawartość witaminy C w badanych ekstraktach roślinnych została oznaczona za pomocą miareczkowania potencjometrycznego zgodnie z procedurą opisaną przez producenta titratora - Application M167-2011 (Mettler Toledo T70).

Określenie miana jodu w roztworze jodku potasu. Przygotowano 30 mL wodnego roztworu witaminy C o znanym stężeniu (100 ppm). Roztwór przygotowano w ciemnej butelce bezpośrednio przed użyciem. Do naczynka pomiarowego titratora przeniesiono 10 mL roztworu witaminy C oraz 10 mL roztworu kwasu siarkowego (2 M) i poddano miareczkowaniu z użyciem metody m167T7xsok. Dla świeżo przygotowanego titranta aparat powinien wskazać taką zawartość witaminy C jaką miał roztwór wyjściowy.

Określenie zawartości witaminy C w próbce. 30 mL ekstraktu roślinnego rozcieńczonego 2 M kwasem siarkowym (10 % v/v) wprowadzono do naczynka pomiarowego titratora w którym umieszczono elektrodę pomiarową oraz kapilarę doprowadzającą titrant. Miareczkowanie rozpoczęto roztworem mianowanym jodu

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

w jodku potasu (0,01 M) poprzez ustawienie odpowiedniego programu. Miareczkowanie prowadzono aż do przekroczenia punku miareczkowania. Po zakończonym miareczkowaniu pojawia się wynik zawartości witaminy C w próbce (mg/kg).

III.2.2.5. Oznaczenie zawartości tłuszczu

Zawartość tłuszczu oraz skład kwasów tłuszczowych zostały oznaczone według normy PN-EN ISO 659:1999, tylko dla próbek roślin z rodziny *Brassicaceae* (kapust i kalafiorów), ponieważ w przypadku pozostałych roślin zawartość tłuszczu jest bardzo niska.

Liofilizaty z kapust i kalafiorów (4 g) zostały odważone do gilz ekstrakcyjnych i umieszczone w aparacie Soxhleta. Ekstrakcję frakcji lipidowej prowadzono przez 8 h z użyciem 200 mL n-heksanu. Następnie rozpuszczalnik odparowano przy użyciu rotacyjnej wyparki próżniowej R-300 (Buchi), a otrzymaną frakcję lipidową zważono za pomocą wagi analitycznej XS204 (Metler-Toledo) i przeliczono jej zawartość na 1 g suchej masy.

III.2.2.6. Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych

Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych (KT) w próbkach kapust i kalafiorów przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną w normie: EN ISO 5509 2000, która wykorzystuje proces estryfikacji do pochodnych metylowych w celu uzyskania lotnych produktów umożliwiających analizę przy użyciu techniki chromatografii gazowej.

Frakcja lipidowa uzyskana w wyniku ekstrakcji w aparacie Soxhleta została przeprowadzona w estry metylowe KT. W tym celu 0,1 mL próbki umieszczono w szklanej ampułce, dodano kamyk wrzenny oraz metanolowy roztwór KOH (1 mL 0,5 mM). Mieszaninę zmydlano w łaźni glicerynowej w temperaturze 80 °C przez 10 min, następnie dodano 2 mL 15 % (v/v) BF_3 i kontynuowano reakcję estryfikacji przez 10 min. Po tym czasie ampułkę schłodzono i dodano po 2 mL n-heksanu i nasyconego roztworu NaCl.

Analiza składu KT została przeprowadzona przy użyciu chromatografu gazowego Perkin Elmer Autosystem XL sprzężonego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) oraz wyposażonego w dzielnik strumienia i kolumnę DB-23 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm) (J&W Scientific). Ilościowa i jakościowa analiza kwasów tłuszczowych została przeprowadzona na podstawie prostych kalibracyjnych otrzymanych

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

dla substancji wzorcowych. Zawartość kwasów tłuszczowych wyrażona została jako % całkowitej zawartości KT.

III.2.3. Charakterystyka badanych par warzyw i owoców pod kątem zawartości substancji biologicznie aktywnych

III.2.3.1. Sporządzenie profili przeciwutleniaczy za pomocą techniki TLC

Ekstrakty wodne badanych par warzyw i owoców zostały nałożone na płytkę TLC (silica gel HPTLC 60 F254, 20 x 10 cm; 0,25 mm; Merck, Germany) za pomocą szklanej kapilary. Faza ruchoma składała się z octanu etylu, kwasu mrówkowego i dejonizowanej wody zmieszanych w stosunku 6:1:1 (v/v/v). Detekcja rozdzielonych przeciwutleniaczy została przeprowadzona poprzez spryskanie (spryskiwacz do płytek TLC 108540 DC 0084-5433, Merck) uzyskanych chromatogramów roztworami ABTS, DPPH lub FCR (sposób przygotowania roztworów jest opisany w punkcie III.1.3). Otrzymane chromatogramy dokumentowano bezpośrednio po wyschnięciu za pomocą skanera.

III.2.3.2. Określenie składu i zawartości związków fenolowych w ekstraktach owocowych

Skład i zawartość związków fenolowych w badanych ekstraktach owocowych zostały oznaczone zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (Kusznierewicz i in., 2011). Do analizy wykorzystano system Agilent 1200 Series HPLC-DAD-MS. Polifenole były rozdzielane na kolumnie Agilent Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 3,5 μm). Objętość dozowanej do układu chromatograficznego próbki wynosiła 10 μL. Faza ruchoma składała się z 2 składników: składnik A - 4,8 % (v/v) roztwór kwasu mrówkowego w wodzie i składnik B - metanol. Początkowy skład fazy ruchomej wynosił 98 % składnika A i 2 % składnika B, końcowy 50 % A i 50 % B. Natężenie przepływu fazy ruchomej w trybie liniowej elucji gradientowej wynosiło 0,8 mL/min, a czas analizy 30 min. Po przejściu przez detektor DAD, eluat został wprowadzony do detektora mas sprzężonego z elektrorozpylaniem (ESI) działającego w trybie jonów pozytywnych i negatywnych. Temperatura gazu suszącego (azot) wynosiła 350 °C. Detektor mas działał w zakresie od 100 do 1200 jednostek masy atomowej (amu). Dane uzyskane ze spektrometru mas były zbierane i analizowane przy użyciu oprogramowania Chemstation Rev.B.04.02. W przypadku braku odpowiednich wzorców, podstawą do identyfikacji związków było porównanie czasów retencji i sygnału z detektora mas

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

($[M+H]^+$, $[M+H]^-$ oraz jonów fragmentacyjnych (m/z) z dostępnymi danymi literaturowymi. Zawartość związków fenolowych w ekstraktach owocowych oznaczano korzystając z metody wzorca zewnętrznego. Do wyznaczenia stężenia poszczególnych analitów wykorzystywano odpowiednie równanie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla właściwego wzorca bądź głównego przedstawiciela danej grupy substancji fenolowych: kwasu chlorogenowego dla pochodnych kwasu hydroksycynamonowego (325 nm), kwasu galusowego dla pochodnych kwasu hydroksycynamonowego (270 nm), kwercetyny dla flawonoli (360 nm), glukozydu cyjanidyny dla antocyjanów oraz katechiny dla flawan-3-oli (270 nm).

III.2.3.3. Sporządzenie profili przeciwutleniaczy za pomocą derywatyzacji postkolumnowej

Profile przeciwutleniaczy obecnych w ekstraktach roślinnych uzyskano techniką derywatyzacji postkolumnowej z użyciem odczynnika ABTS wprowadzanego do eluatu z kolumny HPLC przy użyciu urządzenia Pinnacle PCX Derivatization Instrument (Pickering Laboratories, Inc., USA) zgodnie z procedurą opisaną wcześniej przez Kusznierewicz i in. (2011). Roztwór odczynnika ABTS sporządzono przez rozcieńczenie roztworu ABTS (procedura przygotowania opisana w III.1.3.) metanolem do stężenia 30 % (v/v).

Natężenie przepływu odczynnika do derywatyzacji wynosiło 0,2 mL/min. Reakcja redukcji rodnika ABTS prowadzona była w pętli reakcyjnej ogrzewanej do temperatury 130 °C. Pozostałe parametry pracy chromatografu HPLC były takie same jak w punkcie poprzednim. Profile przeciwutleniaczy uzyskiwano podczas reakcji odczynnika ABTS ze związkami redukującymi obecnymi w eluacie i rejestrowano za pomocą detektora UV-Vis monitorującego zmiany absorbancji rodnika przy 734 nm. Profile przeciwutleniaczy uzyskane tą metodą umożliwiły określenie, które ze związków obecnych w analizowanych próbkach mają największy wpływ na aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów roślinnych.

III.2.3.4. Określenie składu i zawartości kwasów fenolowych i flawonoli w próbkach roślin z rodziny Brassicaceae

Skład i zawartość kwasów fenolowych i flawonoli w ekstraktach z kapust i kalafiorów została oznaczona zgodnie z metodą opisaną wcześniej przez Wiczkowskiego i in. (2016) we współpracy z dr hab. inż. Wiesławem Wiczkowskim (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn). Liofilizat

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

(0,05 g) poddano ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (30 s) z użyciem 80 % (v/v) wodnego roztworu metanolu (1 mL). Następnie estrakt wymieszano na worteksie (30 s), poddano działaniu ultradźwięków (30 s), ponownie wymieszano i zwirowano (5000 x g, 4°C, 5 min). Otrzymany ekstrakt przeniesiono do nowej probówki wirówkowej; proces ekstrakcji powtórzono 5 razy. Analiza polifenoli w otrzymanych ekstraktach została przeprowadzona z użyciem systemu HPLC LC-200 (Eksigent, USA) sprzężonego z detektorem QTRAP MS 5500 (AB SCIEX, USA) i wyposażonego w kolumnę HALO C_{18} (0,5 x 50 mm, 2,7 μm, Eksigent, USA). Zastosowano następujące parametry analizy chromatograficznej: temperatura kolumny 45°C, natężenie przepływu fazy ruchomej 15 μL/min, objętość próbki dozowana do układu 2 μL. Fazę ruchomą stanowiły: 0,95 % (v/v) wodny roztwór kwasu mrówkowego (A) oraz 0,95 % roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B). Został użyty tryb elucji gradientowej: 5 % B przez 0,1 min, 5 – 90 % B w ciągu 1,9 min, 90 % B przez 0,5 min, 90 – 5 % B w ciągu 0,2 min i 5 % B przez 0,3 min. Ilościowa i jakościowa analiza polifenoli obecnych w badanych próbkach została przeprowadzona z wykorzystaniem metody MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) przy użyciu odpowiednich substancji wzorcowych.

III.2.3.5. Określenie skłądu zawartości antocyjanów w próbkach roślin z rodziny Brassicaceae

Oznaczenia jakościowe i ilościowe związków z grupy antocyjanów w próbkach kapust i kalafiorów zostały przeprowadzone według metody opisanej wcześniej przez Wiczkowskiego i in. (2013) we współpracy z dr hab. inż. Wiesławem Wiczkowskim Antocyjany występujące w próbkach roślin kapustowatych ze względu na bardziej skomplikowaną budowę zostały oznaczone odmienną metodą niż w przypadku próbek owoców zawierających tę grupę polifenoli. W związku z wyższym stopniem glikozylacji antocyjanów w próbkach roślin z rodziny *Brassicaceae* wystąpił problem z ich jakościową analizą z użyciem HPLC-MS. Zdecydowano więc o zmianie metody analizy tych związków na wykorzystującą detektor MS/MS (QTRAP 5500 (AB SCIEX, USA) wyposażony w potrójny kwadrupol, pułapkę jonową i jonizację z elektrorozpylaniem, co umożliwiło precyzyjną identyfikację antocyjanów i ilościową analizę na podstawie krzywych kalibracyjnych uzyskanych dla substancji wzorcowej - cyjanidyny.

Ekstrakty do analizy antocyjanów w próbkach roślin z rodziny kapustowatych zostały przygotowane w następujący sposób. Do 0,05 g liofilizatu dodano 1 mL

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

mieszaniny ekstrakcyjnej o składzie (metanol : woda : kwas trifluorooctowy w stosunku 0,58 : 0,38 : 0,04 v/v/v). Następnie mieszaninę dwukrotnie poddano działaniu ultradźwięków przez 30 s. Ekstrakty zwirowano (13000 rpm, 4 °C, 10 min) i klarowny ekstrakt przeniesiono do nowej probówki. Cały proces ekstrakcji powtórzono dla tej samej próbki pięć razy, ekstrakty połączono i poddano analizie chromatograficznej.

Analiza chromatograficzna próbek ekstraktów została przeprowadzona z użyciem systemu HPLC Shimadzu (Japonia) sprzężonego z detektorami DAD oraz MS/MS. Anality rozdzielano w kolumnie XBridge C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 μm). Objętość ekstraktów dozowana do układu wynosiła 5 μL. Faza ruchoma składała się z 6 % (v/v) kwasu mrówkowego w wodzie (A) oraz 6 % (v/v) kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B), a natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,2 mL/min. Zastosowano program elucji gradientowej: 3 – 17 % B w ciągu 0 - 77 min, 17 – 80 % B w ciągu 77 – 80 min, 80 – 3 % B w ciągu 80 – 84 min i 3 % B przez 84 – 105 min. Analityczna długość fali wynosiła 520 nm. Analiza ilościowa antocyjanów w badanych próbkach została wykonana na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla standardowych roztworów wzorca cyjanidyny w zakresie stężeń 0,3 – 40 μM. Identyfikacja poszczególnych antocyjanów została przeprowadzona na podstawie porównania czasów retencji, widm UV-Vis oraz fragmentacji MS/MS z otrzymanymi wcześniej dla substancji wzorcowych, bądź danych literaturowych.

III.2.3.6. Określenie składu i zawartości betalain w próbkach buraków i opuncji figowej

Ekstrakty do analizy składu betalain w próbkach buraków i opuncji figowej zostały przygotowane w następujący sposób. Do 0,05 g liofilizatu dodano 1 mL ekstrahenta o składzie woda : metanol : kwas mrówkowy zmieszanych w stosunku 84,95 : 15 : 0,05 v/v/v). Następnie mieszaninę dwukrotnie poddano działaniu ultradźwięków przez 30 s. Ekstrakty odwirowano (13000 rpm, 4 °C, 10 min), a uzyskany klarowny ekstrakt przeniesiono do nowej probówki. Cały proces ekstrakcji powtórzono dla tej samej próbki pięć razy, ekstrakty połączono i poddano analizie chromatograficznej.

Analiza chromatograficzna betalain została przeprowadzona z użyciem systemu micro-HPLC LC200 Eksigent (Kanada) sprzężonego z detektorem DAD oraz MS/MS (TripleTOF 5600 MS, AB Sciex, Kanada) we współpracy z dr hab. inż. Wiesławem Wiczkowskim (Sawicki i in., 2016). Ekstrakty dozowano do kolumny Gemini C18

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

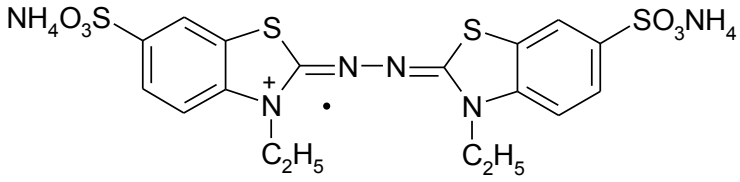
(50 x 0,5 mm, 3 μm). Objętość dozowanych do układu próbek wynosiła 5 μL. Faza ruchoma składała się z 0,012 % (v/v) kwasu mrówkowego w 5 % (v/v) wodnym roztworze amoniaku (A) oraz 0,012 % (v/v) kwasu mrówkowego w 5 % acetonitrylowym roztworze amoniaku (v/v) (B). Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 25 μL/min. Zastosowano program elucji gradientowej: 0 % B przez 0,5 min, 0 – 90 % B w ciągu 0,5 - 2 min, 90 % B przez 2 – 2,5 min, 90 – 0 % B przez 2,5 - 2,7 min), 0 % B przez 2,7 – 3 min. Analiza ilościowa betalain w badanych próbkach została wykonana przy pomocy krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla standardowych roztworów wzorców betaniny zakresie stężeń 0,3 – 2 μM oraz wulgaksantyny I w zakresie stężeń 0,5 – 3 μM. Identyfikacja poszczególnych betalain została przeprowadzona na podstawie porównania czasów retencji, widm UV-Vis oraz fragmentacji MS/MS z otrzymanymi wcześniej dla substancji wzorcowych, bądź danych literaturowych.

III.2.3.7. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej przy wykorzystaniu testów spektrofotometrycznych

Do kolorymetrycznego oznaczenia aktywności przeciwutleniającej użyto standardowe testy spektrofotometryczne wykorzystujące rodniki ABTS i DPPH oraz odczynnik FC. Pomiary prowadzono zgodnie z procedurą opisaną wcześniej przez Kusznierewicz i in., (2011).

Test ABTS

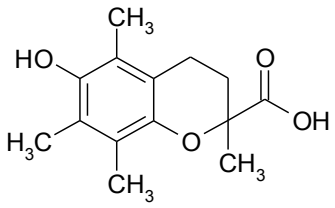
Zasada tego testu polega na pomiarze spadku absorbancji kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$, w wyniku jego redukcji przez przeciwutleniacze zawarte w badanej próbce. Rodnik $ABTS^{\cdot+}$ (Rys. 8) powstaje podczas reakcji z nadsiarczanem sodowym tworząc niebieskozielony kationorodnik (Kusznierewicz i in., 2011). Utlenienie następuje natychmiast, jednakże maksymalną wartość absorbancji oraz pełną stabilność kationorodnik uzyskuje po upływie 6 godzin. Dlatego roztwór ten sporządzono 24 godziny przed wykonaniem pomiarów.



Rys. 8. Struktura kationorodnika ABTS (2,2-azynobis(3-etylobenzotilino-6-sulfonian)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Przed pomiarami roztwór wyjściowy rodnika ABTS sporządzony według przepisu przedstawionego w rozdziale III.1.3 rozcieńczano metanolem do uzyskania absorbancji równej 0,7 przy długości fali 734 nm. W celu oznaczenia aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów roślinnych do 1 mL rozcieńczonego roztworu rodnika ABTS dodano 10 μL badanego ekstraktu, bądź roztworu Troloxu. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze pokojowej (20 °C) przez 15 minut, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali λ = 734 nm. Aktywność przeciwutleniającą analizowanych próbek wyrażono jako liczbę równoważników Troloxu (Rys. 12), przypadającą na próbkę liofilizatu o masie 1 g na podstawie krzywej kalibracyjnej (Tabela 5). Pomiar absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Thermo Scientific NanoDrop 2000c.



Rys. 9. Struktura Troloxu (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy).

Tabela 5. Równania krzywych kalibracyjnych sporządzone dla substancji wzorcowych wykorzystywane do przeliczania aktywności przeciwutleniającej ekstraktów w testach ABTS, DPPH, FC i FRAP.

Test	Wzorzec	Równanie krzywej kalibracyjnej	Współczynnik determinacji R^2
ABTS	Trolox	y = -0,196x + 0,734	0,987
DPPH	Trolox	y = -0,449x + 1,052	0,984
FC	Trolox	y = 0,2672x + 0,045	0,999
FRAP	$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	y = 0,072 x	0,985

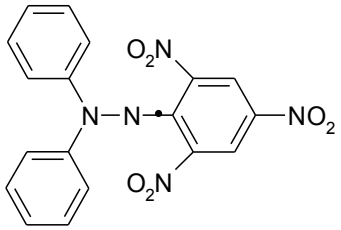
Test DPPH

Zasadą tej metody jest spektrofotometryczny pomiar spadku absorbancji rodnika azowego DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) (Rys. 10) spowodowany jego redukcją pod wpływem działania przeciwutleniaczy obecnych w badanej próbce. W roztworze reakcyjnym obserwuje się zmianę barwy z purpurowej na żółtą. Zmiana ta jest monitorowana przy λ = 515 nm (Kusznierewicz, i in. 2011).

Przed pomiarami wyjściowy roztwór DPPH (100 μM) rozcieńczano za pomocą metanolu do uzyskania absorbancji 1,0 przy długości fali 515 nm. W celu oznaczenia aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów roślinnych do 1 mL

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

rozcieńczonego roztworu rodnika DPPH dodano 30 μL badanego ekstraktu, bądź roztworu Troloxu. Roztwór reakcyjny inkubowano w temperaturze pokojowej (20 °C) przez 15 minut, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali λ = 515 nm. Aktywność przeciwutleniającą analizowanych próbek wyrażono jako liczbę równoważników Troloxu (Rys. 9), przypadającą na próbkę liofilizatu o masie 1 g na podstawie krzywej kalibracyjnej (Tabela 5). Pomiar absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Thermo Scientific NanoDrop 2000c.



Rys. 10. Struktura rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl).

Test Folina-Ciocalteu'a

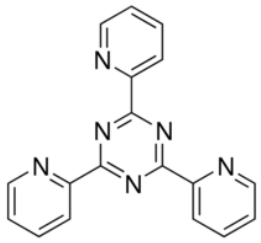
Zasada tego testu polega na pomiarze wzrostu wartości absorbancji odczynnika F-C, wywołanej reakcją z aktywnymi grupami hydroksylowymi substancji obecnych w badanych ekstraktach roślinnych. Odczynnik Folina-Ciocalteu'a jest mieszaniną wolframianu sodu (Na_2WO_4), molibdenianu sodu (Na_2MoO_4), siarczanu litu (Li_2SO_4), wody bromowej oraz stężonych kwasów solnego oraz ortofosforowego. W miarę postępu reakcji następuje redukcja odczynnika F-C i tworzy się $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$ - związek o zielono-niebieskiej barwie, który wykazuje maksimum absorpcji przy λ = 750 nm (Kusznierewicz i in., 2011).

W celu oznaczenia aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów roślinnych do 1 mL wodnego roztworu odczynnika F-C (10 % v/v) dodano 100 μL badanego ekstraktu, bądź roztworu Troloxu. Roztwory inkubowano w temperaturze pokojowej (20 °C) przez 15 minut, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali λ = 750 nm. Aktywność przeciwutleniającą analizowanych próbek wyrażono jako liczbę równoważników Troloxu (Rys. 9), przypadającą na próbkę liofilizatu o masie 1 g na podstawie krzywej kalibracyjnej (Tabela 5). Pomiar absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Thermo Scientific NanoDrop 2000c.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Test FRAP

Metoda FRAP polega na redukcji przez przeciwutleniacze żółtego kompleksu Fe(III) z 2,4,6 tri-pirydylo-S-triazyną (TPTZ, Rys. 11) do intensywnie niebieskiego kompleksu Fe(II)/TPTZ (Benzie i Strain, 1996). Wynik analizy wykonanej metodą FRAP określa zdolność badanej próbki do redukcji jonu żelazowego.



Rys. 11. Struktura TPTZ - 2,4,6 tri-pirydylo-S-triazyny.

W celu oznaczenia aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów roślinnych do 1 mL roztworu FRAP (procedura przygotowania opisana w III.1.3.) dodano 100 μL badanego ekstraktu, bądź roztworu $FeSO_4 \bullet 7H_2O$. Mieszninę inkubowano w temperaturze 37 °C przez 30 minut, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali λ = 583 nm. Aktywność przeciwutleniającą analizowanych próbek wyrażono jako liczbę równoważników $FeSO_4 \bullet 7H_2O$, przypadającą na próbkę liofilizatu o masie 1 g na podstawie krzywej kalibracyjnej (Tabela 5). Pomiar absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Thermo Scientific NanoDrop 2000c.

III.2.3.8. Określenie składu i zawartości glukozynolanów w kapuście i kalafiorze

W celu oznaczenia zawartości glukozynolanów w badanych próbkach warzyw kapustowatych zastosowano standardową metodę ISO-9167-1 z modyfikacjami dotyczącymi sposobu detekcji analitów opisanymi wcześniej przez Kusznierewicz i in., (2013). Liofilizat (0,2 g) ekstrahowano dwukrotnie za pomocą 3 mL 70% wrzącego metanolu. W trakcie pierwszej ekstrakcji, do próbek dodano po 0,2 mL 5 mM wodnego roztworu glukotropaeoliny (GTL) jako wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej. Glukozynolany (GLS) zostały następnie poddane oczyszczaniu na kolumnie wypełnionej złożem (0,5 mL) z żywicy anionowymiennej DEAE-Sephadex A-25. Kolumna była uprzednio kondycjonowana z użyciem mrówczanu imidazolu (2 mL, 6 M) i dwukrotnie 1 mL wody dejonizowanej, po czym naniesiono na nią 6 mL badanego ekstraktu. Następnie dodano 0,2 mL roztworu sulfatazy (*Helix pomatia, typ H1, >10 000 U/g*, Sigma Aldrich) o stężeniu 1,67 mg/mL w celu przeprowadzenia

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

reakcji desulfatacji. Po upływie 24 h desulfo-GLS poddano elucji za pomocą wody dejonizowanej (2 x 0,75 mL) i analizie przy użyciu systemu LC-DAD-ESI-MS (Agilent Technologies) na kolumnie Grace Altima HP AQ RP-C18 (150 x 4,6 mm, 3 μm). Faza ruchoma składała się z wody (A) i roztworu 20 % (v/v) roztworu acetonitrylu w wodzie (B). Proces rozdzielania prowadzono w temperaturze 30˚C przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 1 mL/min, w trybie elucji gradientowej: 5 % B – 100 % B w ciągu 10min, a następnie w trybie elucji izokratycznej 100 % B przez 10 - 25 min. Objętość dozowanej do układu próbki wynosiła 30 μL. Detekcję prowadzono przy użyciu detektora DAD przy długości fali λ = 229 nm. Identyfikację GLS przeprowadzono na podstawie analizy jonów fragmentacyjnych z widm MS zarejestrowanych przy wykorzystaniu API-ESI-MS (Agilent 6130 Quadrupole LC/MS) i danych literaturowych (Kusznierewicz i in., 2013)

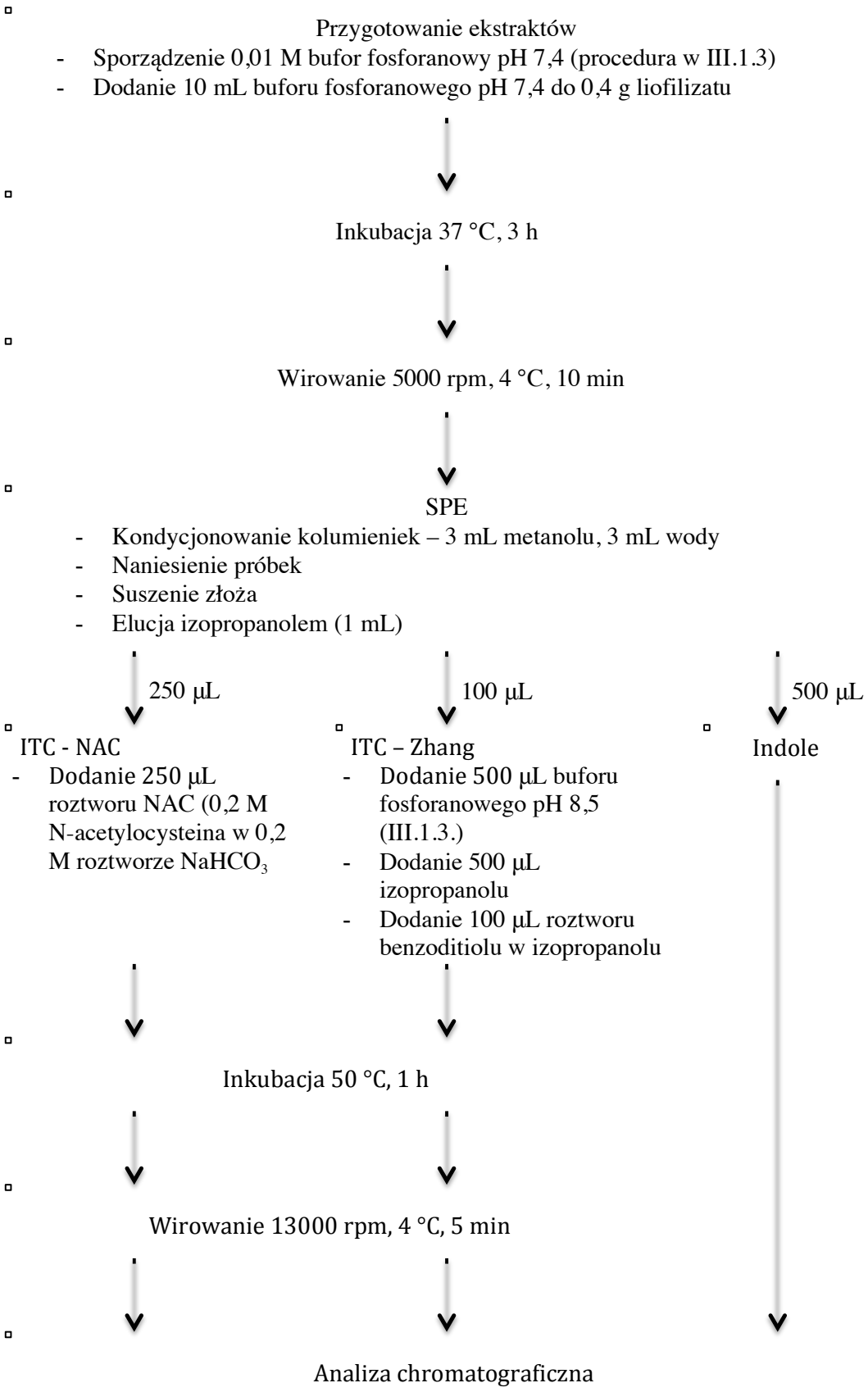
III.2.3.9. Określenie skład i zawartości izotiocyjanianów (ITC) i indoli w kapuście i kalafiorze

Całkowita zawartość izotiocyjanianów (ITC) w próbkach roślin kapustowatych została oznaczona za pomocą metody Zhanga (Zhang i in., 1996) z modyfikacjami (Pilipczuk i in., 2017), a skład poszczególnych ITC w próbce oznaczono metodą wykorzystującą derywatyzację analitów N-acetylo-cysteiną (NAC) (Pilipczuk i in., 2017). Schemat przygotowania próbek do oznaczeń zawartości i składu najważniejszych produktów rozpadu GLS (ITC, indole) został przedstawiony na Rys. 12.

Oznaczenie całkowitej zawartości ITC zmodyfikowaną metodą Zhanga (Pilipczuk i in., 2017) została przeprowadzona w układzie faz odwróconych przy użyciu systemu HPLC Agilent 1200 sprzężonego z detektorem DAD. Ekstrakty przygotowane do tych analiz według wytycznych przedstawionych na Rys. 12 dozowano (30 μL) do kolumny Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 5 μm). Faza ruchoma składała się z 0,1 % (v/v) kwasu mrówkowego w wodzie (A) oraz 0,1 % (v/v) kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B). Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1 mL/min. Zastosowano następujący program elucji gradientowej: 60% B przez 0 - 12 min, 60 – 100% B w ciągu 12 – 15 min. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali równej 365 nm.

.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 12. Schemat procedury analitycznej stosowany na etapie przygotowania próbek do oznaczania zawartości i składu produktów rozpadu GLS.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Oznaczenie ilościowe ITC w badanych próbkach zostało wykonane na podstawie prostej kalibracyjnej sporządzonej dla standardowych roztworów wzorca 1,3-benzeneditiolo-2-tionu (produkt reakcji ITC z odczynnikiem derywatyzującym 1,3-benzenoditiolem) w zakresie stężeń 0,01 – 10 mM.

W celu oznaczenia składu ITC wykorzystano reakcję derywatyzacji tych analitów z N-acetylo-cysteiną (Pilipczuk i in., 2017) . Do rozdzielenia powstałych ditiokarbaminianów posłużył system HPLC Agilent 1200 sprzężony z detektorem DAD. Warunki reakcji derywatyzacji za pomocą NAC przedstawiono na schemacie (Rys. 12). Próbki po derywatyzacji (10 μL) dozowano do kolumny Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 5 μm). Faza ruchoma składała się z 0,1 % (v/v) kwasu mrówkowego w wodzie (A) oraz 0,1 % (v/v) kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B). Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1 mL/min. Zastosowano program elucji gradientowej: 5 % – 40 % B w ciągu 0 - 15 min, 40 % - 65 % B w ciągu 15 - 20 min, 65 % - 100 % B w ciągu 15 - 25 min, 100 % B. Całkowity czas analizy wynosił 30 min. Chromatogramy rejestrowano przy długość fali 272 nm (analityczna długość fali ditiokarbaminianów). Ilościowe oznaczenie poszczególnych ITC zostało wykonane przy użyciu krzywych kalibracyjnych otrzymanych dla odpowiednich wzorcowych substancji.

Ekstrakty otrzymane po procesie SPE (Rys. 12) zostały również wykorzystane do oznaczenia zawartości indoli w badanych próbkach Do rozdzielania podobnie jak w przypadku ITC użyta została kolumna Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 5 μm). Faza ruchoma składała się z 0,01 % (v/v) kwasu mrówkowego w wodzie (A) oraz acetonitrylu (B). Zastosowano tryb elucji gradientowej liniowej gdzie stosunek acetonitrylu do wody zmieniał się od 10 % do 100 % w ciągu 20 min. Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1 mL/min. Objętość dozowanej do układu próbki wynosiła 20 μL. Do detekcji rozdzielonych indoli wykorzystano detektor fluorescencyjny (FLD). Chromatogramy rejestrowano przy długości fali emisji i wzbudzenia fluorescencji równej odpowiednio 360 nm i 280 nm. Krzywe kalibracyjne do oznaczenia ilościowego utworzone zostały w wyniku integracji pól pod powierzchnią piku dla roztworów wzorcowych indoli: I3C, I3ACN, I3AA i DIM o różnych stężeniach.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.4. Charakterystyka aktywności biologicznej esktraktów z owoców i warzyw

III.2.4.1. Prowadzenie hodowli komórkowej

W badaniach wykorzystywano linię komórkową ludzkiego gruczolaka jelita grubego HT29, która pochodziła z kolekcji American Type Culture Collection (ATCC). Komórki hodowano na pożywce zawierającej 2,2 g/L Na_2CO_3 z dodatkiem 10 % (v/v) FBS oraz antybiotyków w stężeniu 60,35 mg/L penicyliny G oraz 0,1 mg/L streptomycyny. Hodowla była prowadzona w naczyniach hodowlanych o powierzchni 75 cm^2 w inkubatorze, który zapewniał stałe warunki środowiska (temperatura 37 ˚C, wilgotność 95% i zawartość CO_2 5%).

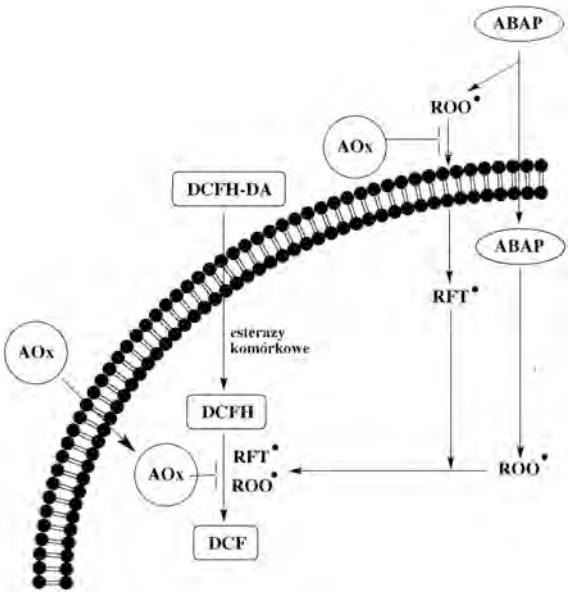
III.2.4.2. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej w komórkach z użyciem testu CAA (od ang. Cellular Antioxidant Activity)

Test CAA (Rys. 13) powstał w celu zastąpienia chemicznych metod oznaczania aktywności antyoksydacyjnej, na postawie których, jak pokazało doświadczenie, na ogół nie można przewidzieć efektu działania związków przeciwutleniających w warunkach *in vivo*. Badania z wykorzystaniem testu CAA są prowadzone w układach komórkowych, czyli w fizjologicznym zakresie pH i temperatury. Dodatkowo uwzględnia on biodostępność, dystrybucję oraz metabolizm przeciwutleniaczy w obrębie komórki, zatem w dużym stopniu odzwierciedla zachowanie badanych związków w warunkach *in vivo* (Wolfe i in., 2007; Chen i in., 2015; Wen i in., 2015).

W celu oznaczenia aktywności przeciwutleniającej w komórkach ludzkiego raka jelita grubego HT29 wykorzystano dostępny komercyjnie zestaw OxiSelect Cellular Antioxidant Activity Assay Kit (Green Fluorescence, Cell Biolabs Inc. Cat. No. STA-349). Komórki HT29 zostały zaszczepione na czarnych płytkach 96-dołkowych z przezroczystym dnem służących do pomiaru fluorescencji (ok. 10000 komórek/dołek w 0,15 mL pożywki McCoy's). Komórki inkubowano w optymalnych warunkach do osiągnięcia ok. 90 % zagęszczenia. Następnie usunięto pożywkę znad komórek, przemyto przyklejone komórki za pomocą roztworu soli (HBSS - Hank's Balanced Salt Solution, Sigma Aldrich). W dalszym etapie komórki traktowano przez 1 h roztworami kwercetyny (0,05 mL) o różnych stężeniach (krzywa kalibracyjna), bądź badanymi ekstraktami roślinnymi (0,05 mL) rozcieńczonymi z użyciem PBS do końcowego stężenia 1 % (v/v) oraz dodatkowo sondą fluorescencyjną DCFH-DA (0,05 mL). Następnie po inkubacji odciągnięto ciecz znad komórek, komórki przepłukano 3-krotnie

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

HBSS. Następnie dodano 0,1 mL roztworu źródła RFT i mierzono fluorescencję przez 1 h w odstępach 5-min (ex λ = 480 nm; em λ = 530 nm). Spadek fluorescencji w porównaniu z próbkami kontrolnymi świadczył o aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów roślinnych. Aktywność przeciwutleniająca została odczytana z krzywej kalibracyjnej otrzymanej dla roztworu wzorcowego kwercetyny (0 – 2000 μM) i wyrażona jako równoważniki kwercetyny (QE μmol/g d.w.).



Rys. 13. Schemat przemian 2',7'-dichlorofluorescyny zachodzących w komórkach podczas testu CAA (opracowany na podstawie Wolfe i in., 2007). Zastosowane skróty nazw chemicznych odnoszą się do: AOx – przeciwutleniacz, DCFH-DA – dioctan 2',7'-dichlorofluorescyny, DCFH – 2',7'-dichlorofluorescyna, DCF – dichlorofluoresceina, ABAP – dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-amidynopropanu), RFT – Reaktywne Formy Tlenu, ROO• – rodnik nadtlenkowy.

III.2.4.3. Oznaczanie zdolności hamowania wzrostu komórek ludzkiego raka jelita grubego HT29 przy użyciu testu MTT

Zdolność badanych ekstraktów roślinnych do hamowania wzrostu komórek raka jelita grubego została oznaczona z użyciem metody opisanej wcześniej przez Koss-Mikołajczyk i in. (2015). Komórki raka jelita grubego HT29 zaszczepiono na płytkach 96-dołkowych (15 tysięcy komórek na dołek w 0,15 mL pożywki). Następnie komórki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37 °C w celu przyklejenia komórek do podłoża. Po tym czasie traktowano je badanymi ekstraktami w różnych stężeniach (1-15% v/v) przez 3, 6, 24 i 72 godziny. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane ekstraktami. Po tym czasie do każdego dołka dodano 50 μL roztworu MTT (4 mg/mL) i inkubowano przez 4 h w 37 °C w celu redukcji związku wskaźnikowego i wytrącenia się kryształów formazanu. Pożywkę znad kryształów usunięto, a kryształy

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

rozpuszczono w 50 μL DMSO i odczytano absorbancję uzyskanych roztworów przy długości fali 540 nm (TECAN). Zdolność badanych ekstraktów do zahamowania wzrostu badanych komórek przedstawiono jako Skumulowany Indeks Przeżywalności (SIP) będący sumą pól powierzchni pod krzywymi zależności stopnia zahamowania wzrostu (%) od stężenia badanego ekstraktu. Im niższa wartość SIP tym silniejszy efekt cytotoksyczny badanego ekstraktu.

III.2.4.4. Oznaczenie właściwości genotoksycznych badanych ekstraktów roślinnych za pomocą testu kometowego

Test kometowy został zastosowany w celu oznaczenia aktywności genotoksycznej badanych ekstraktów roślinnych, ale także ich zdolności do ochrony DNA przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym.

W pierwszym przypadku komórki raka jelita grubego zaszczepiono na płytki 24-dołkowe w ilości 100 000 komórek na dołek w 1,8 mL pożywki i pozwolono im rosnąć do osiągnięcia 80 % zagęszczenia. Po tym czasie do hodowli dodano po 0,2 mL ekstraktów roślinnych (końcowe stężenie ekstraktu 10% v/v), bądź roztworu PBS (kontrola negatywna). Komórki inkubowano z ekstraktami przez 24 h w 37 °C. Po tym czasie do kontroli pozytywnej dodano 10 μL H_2O_2 (stężenie końcowe w pożywce 100 μM) i inkubowano przez 1 h w 37 °C. Po zakończeniu inkubacji usunięto medium hodowlane, komórki odklejono od dna naczynia z użyciem roztworu trypsyny, zwirowano (1540 x g, 4°C, 5 min) i usunięto ciecz znad osadu. Osad komórek zawieszono w 1 mL PBS i ponownie zwirowano. Następnie po usunięciu cieczy znad osadu, komórki zawieszono w 40 μL PBS i przeniesiono do 150 μL wodnego roztworu 0,5 % (w/v) agarozy LMP podgrzanego do temperatury 40 °C. Następnie zawiesinę przeniesiono w 2 porcjach po 40 μL na szkiełka mikroskopowe pokryte wcześniej 1 % (w/v) roztworem agarozy NMP i przykryto szkiełkami nakrywkowymi. Preparaty umieszczono na lodzie na okres 5 min w celu zastygnięcia agarozy. Po tym czasie usunięto szkiełka nakrywkowe, a preparaty umieszczono w buforze lizującym (skład podano w punkcie III.1.3.) na okres 12 h. Po tym czasie przeprowadzono elektroforezę preparatów w warunkach alkalicznych (pH 13,3) przez 30 min (26 V, 300 A). Po zakończeniu elektroforezy, preparaty wypłukano: kolejno dwukrotnie w buforze neutralizującym (skład podano w punkcie III.1.3.), wodzie oraz 70 % (v/v) etanolu i pozostawiono do wyschnięcia. W celu analizy uszkodzeń DNA, preparaty mikroskopowe poddano barwieniu z użyciem barwnika Sybr Green (skład podano

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

w punkcie III.1.3) i analizowano z użyciem system Metafer 4 (MetaSystem, Zeiss). Dla każdego preparatu analizowano 2 x po 200 kolejnych komet. Uszkodzenia DNA przedstawiono z użyciem parametru % DNA w ogonie.

III.2.4.5. Oznaczenie zdolności badanych ekstraktów roślinnych do ochrony DNA przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym za pomocą testu kometowego

W przypadku oznaczania zdolności badanych ekstraktów roślinnych do ochrony DNA przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym komórki zaszczepiono i inkubowano w badanymi ekstraktami tak samo jak w poprzednim punkcie, jednakże w tym przypadku dodawano H_2O_2 nie tylko do kontroli pozytywnej, ale również do komórek traktowanych badanymi ekstraktami. Następnie kontynuowano oznaczenia zgodnie z metodyką opisaną w poprzednim punkcie. Wyniki uzyskane dla komórek inkubowanych z badanymi ekstraktami oraz H_2O_2 porównano z tymi uzyskanymi dla komórek traktowanych samym H_2O_2 i na tej podstawie wnioskowano o zdolności ekstraktów do ochrony DNA przed uszkodzeniami.

III.2.4.6. Oznaczenie wpływu badanych ekstraktów roślinnych na aktywność enzymów II fazy detoksykacji

Przygotowanie frakcji cytozolowych

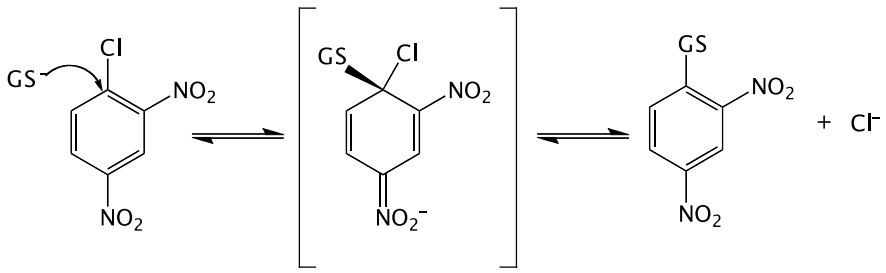
Komórki raka jelita grubego HT29 o gęstości 0,1 mln/mL zaszczepiono w naczyniach hodowlanych o powierzchni 25 cm^2 w 10 mL pożywki. Na każdy badany ekstrakt przygotowano 3 naczynia; dodatkowo przygotowano również 3 naczynia hodowlane z komórkami kontrolnymi, które nie były traktowane badanymi ekstraktami. Po 72-godzinnej inkubacji w 37 °C odciągnięto medium hodowlane i dodano do komórek 9 mL świeżej pożywki oraz 1 mL ekstraktu roślinnego (końcowe stężenie ekstraktu 10% v/v), bądź 1 mL pożywki w przypadku komórek kontrolnych. Komórki inkubowano w 37 °C przez 6 lub 24 h. Po upłynięciu czasu inkubacji, medium hodowlane usunięto, komórki przemyto roztworem PBS, dodano 10 mL PBS i komórki odklejono mechanicznie. Zawiesinę przeniesiono do probówek wirówkowych i zwirowano (1000 rpm, 4°C, 5 min). Usunięto ciecz znad osadu, komórki zawieszono w 250 µL zimnej wody dejonizowanej i pozostawiono na lodzie przez 10 min w celu spęcznienia. Po tym czasie dodano 250 µL buforu KCl-P (przygotowanego wg procedury III.1.3.). Zawiesinę homogenizowano za pomocą homogenizatora

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Dounce'a stosując 30 uderzeń tłoka. Homogenizaty zwirowano (13000 rpm, 4°C, 5 min) w celu usunięcia resztek struktur komórkowych. Uzyskane frakcje cytozolowe przechowywano w –80 °C do czasu pomiaru aktywności enzymatycznych. Zawartość białka oznaczono za pomocą metody Lowry'ego opisanej w punkcie III.2.2.3.

Oznaczenie aktywności S-transferaz glutationowych (GST)

Oznaczenie aktywności GST przeprowadzono w oparciu o metodę Habiga, nazywaną także metodą CDNB. Polega ona na sprzęganiu 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) z glutationem w obecności komórkowych GST, co daje w rezultacie barwny produkt z maksimum absorpcji przy $\lambda = 340$ nm (Rys. 14).



Rys. 14. Reakcja sprzęgania CDNB z glutationem.

Pomiar spektrofotometryczny prowadzony jest dwuetapowo. Pierwszy etap stanowi nieenzymatyczna samorzutna reakcja CDNB z glutationem (GSH), natomiast etap drugi po dodaniu frakcji cytozolowej ukazuje całkowitą aktywność enzymatyczną GST obecnych we frakcji cytozolowej. Do kuwety spektrofotometrycznej dodano 940 µL roztworu CDNB (przygotowanego wg wskazówek III.1.3.) i 50 µL 100 mM roztworu GSH. Prowadzono pomiary spektrofotometryczne przy długości fali $\lambda = 340$ nm w 37 °C przez 4 min, zbierając dane co 30 s. Następnie do kuwety dodano 10 µL frakcji cytozolowej i kontynuowano pomiar absorbancji przez kolejne 10 min, co 30 s. Dla każdej frakcji cytozolowej wykonano po 3 pomiary. Na podstawie prostoliniowych odcinków krzywych kinetyki sprzęgania GSH z CDNB wyznaczono zmianę absorbancji w czasie 1 min dla etapu sprzęgania samorzutnego (tło) oraz zmianę absorbancji w czasie 1 min dla enzymatycznej reakcji przebiegającej po dodaniu frakcji cytozolowej:

$$C = \Delta A/(\varepsilon \bullet l),$$

gdzie: C – zmiana stężenia substancji barwnej w czasie 1 min w 1 ml cytozolu

ΔA – różnica zmian absorbancji (jakich mierzyłaś dwie!) w czasie 1 min

ε – współczynnik ekstynkcji, który dla CDNB wynosi $9{,}6 \bullet 10^{-3}$

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

l – długość drogi optycznej, równa 1 cm.

Aktywność enzymatyczną natomiast obliczono ze wzoru:

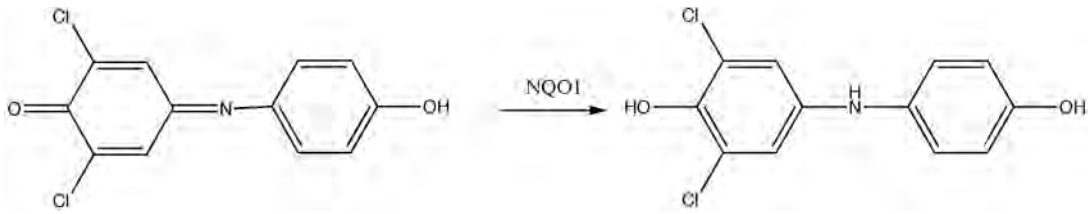
$$GST\ [mU] = (C \bullet r)/c,$$

gdzie: r – współczynnik rozcieńczenia, równy 100

c – stężenie białka w próbce

Oznaczanie aktywności oksydoreduktazy chinonowej (NQO1)

Oznaczenie aktywności NQO1 przeprowadzono w oparciu o metodę Ernstera polegającą na odbarwianiu się niebieskiego roztworu 2,6-dichlorofenolindolfenolu (DCPIP) wskutek reakcji katalizowanej przez NQO1 (Rys. 15).



Rys. 15. Redukcja barwnego roztworu DCPIP do formy bezbarwnej przez NQO1.

Badanie kinetyki reakcji składa się z dwóch etapów, oba śledzone są przy $\lambda = 600$ nm. Pierwszy etap stanowi spektrofotometryczny pomiar zmian absorbancji tła w czasie w wyniku samorzutnej reakcji NADPH z DCPIP. Drugi etap to pomiar zmian absorbancji po dodaniu frakcji cytozolowej zawierającej enzym NQO1. Do kuwety spektrofotometrycznej dodano 900 µL buforu KCl-P (skład podano w punkcie III.1.3.) rozcieńczonego wodą w stosunku 1:8 i dodano 35 µL roztworu DCPIP (skład podano w punkcie III.1.3.). Pomiar absorbancji prowadzono przez 4 min, co 30 s, w 37°C. Następnie dodano 30 µL frakcji cytozolowej i 30 µL wodnego roztworu NADPH (5 mg/mL). Kontynuowano śledzenie kinetyki reakcji przez kolejne 5 min. Dla każdej frakcji cytozolowej wykonano 3 oznaczenia. Aktywność NQO1 obliczono w taki sam sposób jak aktywność GST, jednakże uwzględniając 33,2-krotne rozcieńczenie zamiast 100-krotnego.

III.2.4.7. Określenie właściwości mutagennych badanych ekstraktów roślinnych z użyciem testu Amesa w wersji MPF

Zdolność do indukcji mutacji szczepu *Salmonella typhimurium* TA100 przez badane ekstrakty roślinne została określona za pomocą płytkowej wersji testu

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

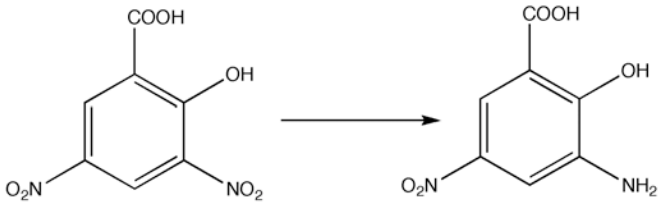
Amesa MPF (Xenometrix, Switzerland). Podczas wykonywania oznaczeń postępowano zgodnie z procedurą opisaną przez producenta testu (http://www.xenometrix.ch/index.php?id=61) (Koss-Mikołajczyk i in., 2016).

Na płytkę 24-dołkową nakładano po 10 μL ekstraktów roślinnych, kontroli pozytywnych (4-NQO - tlenek 4-nitrochinoliny bądź 2-AA - 2-aminoantracen) bądź kontroli negatywnej (sterylna woda dejonizowana) na dołek, w 3 powtórzeniach każde. Następnie rozcieńczono 24 - godzinną hodowlę TA100 (0,35 mL) za pomocą Exposure Medium (6,65 mL) znajdującego się w zestawie. Nakładano po 240 μL otrzymanej mieszaniny do każdego dołka i płytki inkubowano w wytrząsarce w 37 °C przez 1,5 h. Następnie do każdego dołka dodano 2,8 mL medium wskaźnikowego, mieszano za pomocą pipety i przenoszono hodowlę na płytkę 386 – dołkową. Każda próbka zajmowała obszar 48 dołków. Gotowe płytki inkubowano w 37 °C przez 48 h, po czym liczono liczbę dołków, które zmieniły kolor z fioletowego na żółty, co świadczy o odwróceniu mutacji w TA100 przez badaną próbkę. W kontroli pozytywnej odwrócenie mutacji powinno zajść we wszystkich dołkach, natomiast w kontroli negatywnej dozwolone są jedynie pojedyncze mutacje spontaniczne. Zdolność badanej próbki do wywołania mutacji określano jako liczba rewertantów.

III.2.4.8. Określenie zdolności badanych ekstraktów do inhibicji α-amylazy i α-glukozydazy

Zdolność do inhibicji aktywności α-amylazy.

Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na aktywność α-amylazy określono za pomocą metody opisanej wcześniej przez Zia-Ul-Haq i in. (2011). W metodzie tej wykorzystano reakcję z żółtym kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS), który w obecności cukrów redukujących przekształcany jest do pomarańczowego kwasu 3-amino-5-nitrosalicylowego (Rys. 16).



Rys 16. Redukcja kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) do kwasu 3-amino-5-nitrosalicylowego.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Do 20 μL ekstraktu roślinnego dodano 20 μL roztworu α-amylazy (0,05 U/ μL) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 6,9 (procedura przygotowania opisana w III.1.3). Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w 37 °C. Równolegle przygotowano próbę kontrolną, do której zamiast ekstraktu roślinnego dodano 0,1 M buforu fosforanowego o pH = 6,9. Dodatkowo przygotowano tło dla każdej próbki badanej oraz kontrolnej, do których zamiast enzymu dodano 20 μL buforu fosforanowego. Przygotowanie tła jest konieczne, ponieważ badane ekstrakty roślinne mogą zawierać cukry redukujące reagujące z substancją wskaźnikową (DNS), więc odjęcie absorbancji tła od absorbancji próbki eliminuje ewentualne błędy. Każdą próbkę przygotowano w 3 niezależnych powtórzeniach.

Po zakończeniu inkubacji, do każdej próbki dodano 250 μL roztworu skrobi (1 % w/v). Próbki starannie wymieszano, a następnie inkubowano przez 10 minut w 37 °C. W wyniku hydrolizy skrobi przez aktywną α -amylazę uwalniane są dekstryny oraz maltoza, które następnie powodują redukcję odczynnika DNS (Rys. 16). Następnie dodano 200 μL roztworu DNS (1 % w/v, sposób przygotowania w punkcie III.1.3). Reakcję redukcji grupy nitrowej kwasu 3,5-dinitrosalicylowego przez cukry redukujące, prowadzono przez 15 min w temperaturze 100 °C. Wysoka temperatura powoduje denaturację enzymu, a to z kolei zatrzymanie reakcji enzymatycznej. Próbkę ochłodzono do temperatury pokojowej i przed pomiarem rozcieńczono przez dodanie 5 mL wody destylowanej. Następnie zmierzono absorbancję roztworu. W przypadku gdy badany ekstrakt wykazuje zdolność do inhibicji enzymu ilość zredukowanego DNS będzie malała- stąd spadek absorbancji w porównaniu z kontrolą. Wyniki przedstawiono jako % inhibicji aktywności α-amylazy w obecności badanych ekstraktów w porównaniu z próbką kontrolną.

$$\% \text{ inhibicji } \alpha\text{-amylazy} = 1 - \frac{(\text{AbsP} - \text{AbsTP})}{(\text{AbsK} - \text{AbsTK})}$$

gdzie: AbsP– absorbancja próbki

AbsTP – absorbancja tła próbki

AbsK– absorbancja kontroli

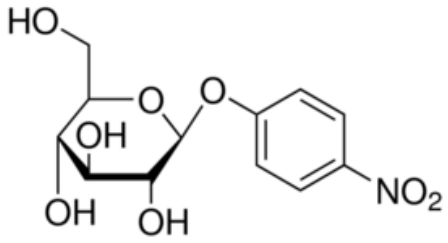
AbsTK – absorbancja tła kontroli

Zdolność do inhibicji aktywności α-glukozydazy.

Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na aktywność α-glukozydazy określono za pomocą metody opisanej wcześniej przez Zia-Ul-Haq i in. (2011). W metodzie tej

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

wykorzystuje się syntetyczny *p*-nitrofenylo- α -D-glukopiranozyd (pNPG), (Rys. 17) który w wyniku hydrolizy katalizowanej przez α -glukozydazę przekształca się w barwny p-nitrofenol, którego stężenie oznacza się spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 405$ nm.



Rys. 17. Struktura pNPG (*p*-nitrofenylo-α-D-glukopiranozyd).

Do 100 µL badanego ekstraktu roślinnego dodano 200 µL roztworu α-glukozydazy (1 U/mL) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,9. Mieszaninę inkubowano przez 10 min w 37 °C. Równolegle przygotowano kontrolę, w której zamiast ekstraktu roślinnego użyto tę samą objętość 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6,9. Dodatkowo przygotowano również tło, w którym zamiast enzymu użyto 0,1 M buforu fosforanowego. Każdą próbkę przygotowano w 3 niezależnych powtórzeniach. Po okresie inkubacji, do wszystkich próbek dodano 600 µL 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6,9, a następnie 100 µL roztworu 5 mM pNPG. Reakcję prowadzono przez 5 min w 37 °C. Reakcję enzymatyczną zatrzymano poprzez dodanie 50 µL węglanu sodu (2 M) i dokonano pomiaru absorbancji. λ = 405 nm. (Nanodrop). Wyniki przedstawiono jako % inhibicji aktywności α-glukozydazy w obecności badanych ekstraktów w porównaniu z próbką kontrolną, korzystając z tego samego wzoru co w przypadku α-amylazy.

Analiza statystyczna

Jeśli nie podano inaczej, wszystkie przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych powtórzeń ± odchylenie standardowe (SD). Powiązania pomiędzy składem matrycy żywieniowej, związków o charakterze przeciwutleniaczy (w szczególności antocyjanów oraz betalain) oraz innych bioaktywnych fitozwiązków (GLS, ITC, indole) a aktywnością biologiczną badanych ekstraktów roślinnych były analizowane z użyciem współczynnika Pearson'a. Istotność statystyczna różnic pomiędzy analizowanymi parametrami została ustalona za pomocą testu T-studenta oraz jednokierunkowej analizy ANOVA z testem Dunneta. $P<0,05$.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.3. Wyniki i wnioski

III.3.1. Wprowadzenie

W związku z rosnącym zagrożeniem chorobami cywilizacyjnymi (WHO, 2014) oraz przypuszczalnie znaczącą rolą zaburzonej homeostazy redoksowej w etiologii tych chorób (Rahman, i in. 2012), w ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania roślinami jadalnymi zawierającymi związki o charakterze przeciwutleniaczy. Utrwalił się przy tym pogląd o większej zdrowotności kolorowych odmian owoców i warzyw ze względu na obecne w nich barwniki – antocyjany i betalainy, które wykazują aktywność przeciwutleniającą (Cooke i in., 2005; Dudley i in., 2008), jednakże odmiany pozbawione związków z tych grup również mogą wykazywać działanie biologiczne. Barwniki nie są bowiem jedynymi bioaktywnymi naturalnymi substancjami. Jak to omówiono w Rozdziale II, uproszczone postrzeganie prozdrowotnego działania warzyw i owoców jako pochodnej obecności jednego składnika nie znalazło potwierdzenia (Potter, 2014). W związku z tym sugeruje się, że badania powinny być kierowane ku wspomnianemu synergizmowi żywieniowemu (Jacobs i in., 2003; Liu, i in., 2005; Jacobs i in., 2012), gdzie działanie biologiczne przypisywane jest skojarzonemu działaniu wielu składników obecnych w pokarmach roślinnych. Przyjęta przeze mnie strategia badawcza ma na celu sprawdzenie tej hipotezy dla wybranych grup wtórnych metabolitów o charakterze przeciwutleniaczy, dla których udokumentowane jest w literaturze naukowej działanie chemoprewencyjne. Wybranych zostało kilka par warzyw i owoców należących do tego samego gatunku, ale różniących się zasadniczo zawartością takich bioaktywnych fitozwiązków jak antocyjany czy betalainy. Poprzez porównanie odmian będzie można wnioskować o roli różniącego je bioaktywnego składnika dla wykazywanej przez daną roślinę aktywności biologicznej.

Porównywanie zawartości związków bioaktywnych oraz aktywności biologicznej różnokolorowych odmian owoców i warzyw nie jest podejściem nowym, gdyż w literaturze spotykane są publikacje porównujące różne odmiany danej rośliny. Zazwyczaj jednak publikacje te mają ograniczony zakres i skupiają się na porównaniu profili związków bioaktywnych oraz aktywności przeciwutleniającej. Generalnie, w przypadku publikacji porównujących różnokolorowe odmiany roślin jadalnych można spotkać się z trzema podejściami naukowców zajmujących się tym tematem.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Pierwszą grupę badaczy charakteryzuje typowo analityczne podejście do tematu. Naukowcy z tej grupy skupiają się tylko i wyłącznie na oznaczeniu zawartości i składu związków o udowodnionej aktywności biologicznej, np. związków fenolowych, antocyjanów, karotenoidów czy betalain, ewentualnie dodatkowo próbują powiązać skład tych związków z aktywnością przeciwutleniającą oznaczoną za pomocą metod spektrofotometrycznych. Na przykład w publikacji Zhou i in. (2007) porównano barwę oraz zawartość wody i karotenoidów w białej i czerwonej odmianie owocu nieśplika japońskiego (ang. loquat) nie szukając jednak związku pomiędzy otrzymanymi wynikami a aktywnością biologiczną badanych ekstraktów. Cejudo-Bastante i in. (2014) w swojej publikacji również skupili się na określeniu składu chemicznego, a mianowicie porównali barwę oraz zawartość związków fenolowych i betalain w różnych odmianach oraz częściach opuncji figowej. Wykazali, że odmiana czerwona charakteryzuje się wyższą zawartością badanych związków bioaktywnych od odmian pomarańczowej oraz żółtej. Nie podjęli jednak próby korelacji tych wyników z aktywnością biologiczną badanych roślin. Maataa i in. (2001) poprzestali na porównaniu zawartości związków fenolowych w białej, czerwonej i czarnej odmianie porzeczki.

Druga grupa naukowców dokonuje bardziej szczegółowej analizy odmian roślin. Porównują oni badane odmiany pod względem zawartości fitozwiązków nie tylko tych o znanej aktywności biologicznej, ale również składników odżywczych, np. białka, tłuszczu, cukrów, składników mineralnych oraz wody Sumaya-Martinez i in. (2011) w swoich badaniach nad opuncją figową oprócz analizy składu betalain i związków fenolowych w białej, żółtej, czerwonej i fioletowej odmianie tego owocu oznaczyli również zawartość kwasu askorbinowego oraz aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów. Jednakże podobnie jak poprzednicy nie próbowali powiązać otrzymanych danych z aktywnością biologiczną badanych próbek. Zgodnie z oczekiwaniami, wyższe wartości wszystkich badanych parametrów uzyskali dla odmian ciemnych, niż dla odmian jasnych. Również Sanchez-Sulcedo i in. (2015) badając białą i czarną odmianę morwy sporządzenia dokładniejszą analizę jej składu, tzn. oprócz wykonania profilu HPLC związków fenolowych oraz oznaczenia aktywności przeciwutleniającej, rozszerzyli oni zakres badań o wykonanie analizy składników mineralnych oraz zawartości białka metodą Kjeldahla. Wykazali oni, że zawartość białka w obu odmianach jest podobna, natomiast zawartość związków fenolowych, składników mineralnych oraz aktywność przeciwutleniająca jest wyższa w przypadku odmiany

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

ciemniej. Ercisli i Orhan (2007) również porównywali białą i czarną odmianę morwy pod względem barwy, wagi pojedynczego owocu, zawartości wody, związków rozpuszczalnych w wodzie, suchej masy, pH, kwasowości, zawartości i składu kwasów tłuszczowych, zawartości kwasu askorbinowego, składników mineralnych, związków fenolowych oraz flawonoidów. Po analizie uzyskanych wyników autorzy doszli do wniosku, że waga owoców, zawartość związków rozpuszczalnych w wodzie, zawartość wody, pH oraz kwasowość zależą głównie od warunków uprawy oraz gatunku owocu, a nie tylko od barwy badanej odmiany. Zawartość tłuszczu była nieznacznie wyższa w przypadku odmiany czarnej niż białej. Autorze zauważyli natomiast znaczące różnice w składzie oznaczonych kwasów tłuszczowych pomiędzy odmianami różnych kolorów. Najwyższą zawartością kwasu askorbinowego natomiast charakteryzowała się odmiana biała, a najwyższą zawartością związków fenolowych – odmiana czarna. Badania te wykazały również znaczące różnice w zawartości składników mineralnych, głównie azotu, potasu, fosforu i wapnia. Niestety w tej publikacji również nie została przeprowadzona próba powiązania zbadanego składu chemicznego tych odmian z ich aktywnością biologiczną. Matsafiji i in. (2007) przeprowadzili dokładne porównanie nie tylko zawartości karotenoidów, ale również tokoferoli, cukrów, kwasów organicznych oraz aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z białej, zielonej, pomarańczowej oraz czerwonej odmiany papryczki chili. Odmiana czerwona okazała się bogatszym źródłem tokoferoli, cukrów, kwasów organicznych i przeciwutleniaczy, jednakże tak jak w przypadku poprzedników, autorzy nie zdecydowali się powiązać otrzymanych przez nich wyników z aktywnością biologiczną badanych próbek.

Trzecia grupa naukowców, zajmująca się problemem najbardziej kompleksowo, szuka powiązań między zawartością związków bioaktywnych oraz czasami również składem matrycy roślinnej, a aktywnością biologiczną badanych odmian z użyciem różnych testów służących oznaczeniu tego typu działania. Shon i in. (2004) porównali zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniającą i antymutagenną ekstraktów z białej, żółtej i czerwonej cebuli. Jednakże przeprowadzone przez nich badania wykazały bardzo słaby związek pomiędzy zawartością związków bioaktywnych i aktywnością przeciwutleniającą badanych odmian cebuli a ich aktywnością przeciwmutagenną. Wszystkie badane ekstrakty wykazały podobną aktywność antymutagenną, co może świadczyć o tym, że to nie oznaczone polifenole odpowiadały za tą aktywność a inne składniki, które znajdowały się w badanych ekstraktach, a nie

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

zostały oznaczone przez autorów publikacji. Kim i in. (2011) postanowili natomiast sprawdzić czy istnieje związek pomiędzy zawartością związków z rodziny fenoli, a aktywnością przeciwutleniającą i zdolnością do zahamowania proliferacji komórek rakowych przez ekstrakty z białej i czerwonej odmiany pitai. Opublikowane wyniki badań wykazały silny związek pomiędzy zawartością związków fenolowych i aktywnością przeciwutleniającą a zdolnością do zahamowania wzrostu komórek rakowych. Silną korelację pomiędzy zawartością związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą i przeciwzapalną wykazali również Garcia-Lafuente i in. (2014) w swoich badaniach nad białą i czerwoną odmianą fasoli.

Jak widać poszukiwania korelacji pomiędzy składem badanej rośliny a jej aktywnością biologiczną, mimo iż jest coraz bardziej popularnym podejściem wśród naukowców zajmujących się badaniami nad żywnością, wciąż jeszcze nie znajduje znaczącego odzwierciedlenia w literaturze. Większość badaczy wyraźnie woli skupić się na czysto chemicznych oznaczeniach, często nie przekładających się na faktyczną aktywność badanych związków w układach biologicznych.

W niniejszej pracy zastosowano bardziej kompleksowe podejście do oceny prozdrowotnej wartości wybranych bioaktywnych składników. Przede wszystkim uwzględniając obserwacje pochodzące z badań epidemiologicznych sugerujących słabszą aktywność biologiczną czystych, wyizolowanych fitozwiązków w postaci suplementów diety w porównaniu z dietą wzbogaconą w dużą ilość owoców i warzyw (Potter; 2014, Jacobs i in., 2003; Jacobs i in., 2009; Jacobs i in., 2013), do badań wybrano właśnie całe części jadalne roślin. Porównanie odmian roślin jadalnych o różnej pigmentacji nie tylko pod względem zawartości głównych substancji bioaktywnych, ale również tych towarzyszących oraz odżywczych w powiązaniu z szeregiem aktywności biologicznych pozwoliło na przeprowadzenie próby wskazania wyróżników chemicznych decydujących o potencjale prozdrowotnym badanych roślin.

III.3.2. Określenie zawartość substancji odżywczych w badanych roślinach jadalnych

Określenie zawartości podstawowych substancji odżywczych (wody, białka, cukrów, tłuszczu i witaminy C) ma nie tyle za zadanie scharakteryzowanie wartości pokarmowej badanych owoców i warzyw, co umożliwienie oceny czy dany składnik może mieć wpływ na aktywność prozdrowotną rośliny w kontekście chorób

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

cywilizacyjnych. Przykładowo witamina C i cukry redukujące obecne w roślinach mogą wpływać na procesy redoksowe w przewodzie pokarmowym, a po wchłonięciu także wspomagać endogenną barierę antyoksydacyjną.

III.3.2.1. Określenie zawartości substancji odżywczych w odmianach opuncji figowej i buraków

Analiza składu substancji odżywczych obecnych w żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) opuncji figowej wykazała wysoki stopień podobieństwa tych odmian pod względem zawartości wody, cukrów i białka. Oznaczone zawartości substancji odżywczych (Tab. 6) były zbliżone do tych opublikowanych przez Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA), według których zawartość wody w opuncji figowej (nie podano odmiany) wynosi 87,55 %, a białka – 90,9 mg/g s.m. Różnice w zawartościach mogą wynikać z faktu, że nie była określona przez USDA odmiana opuncji użytych do oznaczeń, sposób przygotowania próbek ani metoda oznaczania. Jednakże generalnie materiał roślinny w zależności od warunków uprawy i innych czynników środowiskowych może się charakteryzować bardzo odmiennym składem nawet dla tej samej odmiany, w związku z tym pewne, nawet rzędu kilkudziesięciu procent, rozbieżności nie są zaskakujące.

Tabela 6. Zawartość substancji odżywczych w badanych odmianach opuncji figowej i buraków

Próbka**	**Woda*** [%]	**Cukry*** [%]	**Białko*** [mg/g s.m.]	**Witamina C*** [mg/g s.m.]
YOp	80,22	10,6 ± 0,3	145,46 ± 12,83	0,78 ± 0,25[a]
OOp	80,17	11,5 ± 0,3	143,19 ± 10,81	0,55 ± 0,03[a]
ROp	81,80	11,3 ± 0,1	142,77 ± 4,99	0,99 ± 0,02[b]
WBeet	79,83	10,5 ± 0,3	9,14 ± 2,03[a]	nw
RBeet	81,29	10,7 ± 0,6	41,67 ± 5,82[b]	nw

*Podane wartości stanowią średnią ± SD z trzech niezależnych powtórzeń, z wyjątkiem zawartości wody, której pomiar został wykonany w jednym powtórzeniu.
** Oznaczenia próbek: YOp – żółta opuncja, OOp – pomarańczowa opuncja, ROp – czerwona opuncja, WBeet – biały burak, RBeet – czerwony burak
[a,b] Dane w tej samej kolumnie oznaczone różnymi literami oznaczają statystycznie istotne różnice (obliczone za pomocą testu T-studenta) w zawartości danego składnika w różnych odmianach
nw – nie wykryto

Statystycznie istotne różnice pomiędzy odmianami opuncji zostały natomiast zaobserwowane w przypadku zawartości witaminy C (Tab. 6). Najbogatszym jej

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

źródłem okazała się odmiana czerwona (0,99 mg/g s.m), a najuboższym pomarańczowa (0,55 mg/g s.m.). Dane literaturowe potwierdzają, że spośród wszystkich odmian opuncji największą zawartością witaminy C charakteryzuje się ROp (0,37 mg/g s.m.) następnie OOp (0,3 mg/g s.m.) i YOp (0,3 mg/g s.m.) (Albano, i in. 2015). Można oczekiwać, że różnice w zawartości witaminy C, która jest silnym przeciwutleniaczem, będą miały istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z tych owoców.

W przypadku białych (WBeet) i czerwonych (RBeet) buraków zawartości wody i cukrów były na podobnym poziomie (Tab. 6), natomiast odmiany te znacząco różniły się zawartością białka, którego w czerwonej odmianie było ok. czterokrotnie więcej niż w białej (Tab. 6). Według danych USDA w próbkach buraków zawartość wody wynosi 87,58 %, białka – 199,9 mg/g s.m., cukrów – 6,76 %, a witaminy C – 0,61 mg/g s.m. Jeśli chodzi o witaminę C, to w przypadku buraków jej zawartość była poniżej granicy oznaczalności użytej metody. Podobnie jak w przypadku odmian opuncji, różnice w zawartościach w porównaniu z danymi literaturowymi wynikają z faktu, że nie jest znany sposób przygotowania próbek ani metoda oznaczania stosowana przez USDA.

Przyczyną nieobecności witaminy C w badanych ekstraktach z buraków oraz niskiej zawartości tego związku w opuncji figowej w porównaniu z danymi literaturowymi mógł być sposób przygotowania próbki. Zawartość witaminy C była bowiem oznaczana w liofilizatach, a nie w świeżych roślinach. Przygotowanie do liofilizacji oraz sam proces, mimo swojego zachowawczego charakteru, wpływają destrukcyjnie na niektóre substancje, w tym witaminę C.

Zaskakująco duże rozbieżności pomiędzy uzyskanymi wynikami a danymi USDA są widoczne dla zawartości białka w burakach. Wartość podana przez USDA, dla buraka białego jest aż 20-krotnie wyższa od oznaczonej w prezentowanych badaniach. Można jednak przypuszczać, że amerykańska agencja do oznaczeń użyła metody Kjeldahla (PN-EN ISO 8968-1:2014-03), standardowo stosowanej w oznaczeniach białka w żywności, która polega na oznaczeniu zawartości azotu i przeliczeniu jej na zawartość białka z użyciem odpowiednich współczynników. Buraki zawierają jednak wyjątkowo dużą ilość niebiałkowych związków azotowych, przede wszystkim azotanów i niebiałkowego aminokwasu betainy (jego nazwa nawet pochodzi od buraka – łac. *Beta vulgaris),* co mogło spowodować zawyżenie danych. W przypadku odmiany czerwonej, także betalainy zawierają azot. W związku z powyższym prezentowane w pracy wyniki uzyskane za pomocą metody Lowry'ego można uznać za bardziej wiarygodne.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.3.2.2. Określenie zawartości substancji odżywczych w odmianach malin, winogron, morwy i porzeczek

Analiza składu substancji odżywczych w żółtych (YRas) i czerwonych (RRas) malinach wykazała, że zawartość wody, cukrów oraz witaminy C w obu odmianach jest podobna, różnią się natomiast zawartością białka, która jest znacząco wyższa w przypadku odmiany czerwonej (Tab. 7). Według danych USDA w surowych malinach (nie określono odmiany kolorystycznej) zawartość wody wynosi 85,75 %, białka – 84 mg/g s.m., cukrów – 4,42 %, a witaminy C – 1,83 mg/g s.m. Rozbieżności pomiędzy danymi są w granicach oczekiwania dla odmiennych partii materiału roślinnego.

W przypadku białych (WGra) i czerwonych (RGra) winogron występują różnice w zawartości wszystkich substancji odżywczych. Zawartości wody oraz witaminy C są wyższe w przypadku odmiany białej, natomiast zawartości cukrów oraz białka są dwukrotnie wyższe dla odmiany czerwonej (Tab. 7). Według danych USDA w surowych winogronach (nie określono odmiany kolorystycznej) zawartość wody wynosi 80,54 %, białka – 37 mg/g s.m., cukrów – 15,5 %, a witaminy C – 0,16 mg/g s.m.

Tabela 7. Zawartość substancji odżywczych w badanych odmianach malin, winogron, morwy i porzeczek

Próbka**	**Woda*** [%]	**Cukry*** [%]	**Białko*** [mg/g s,m]	**Witamina C*** [mg/g s,m,]
YRas	88,65	10,8 ± 0,3	14,94 ± 0,36[a]	1,05 ± 0,20
RRas	86,88	11,8 ± 0,3	23,59 ± 4,99[b]	1,16 ± 0,02
WGra	83,67[a]	9,8 ± 0,5[a]	62,76 ± 4,99[a]	1,32 ± 0,18[a]
RGra	77,69[b]	18,0 ± 0,5[b]	118,74 ± 12,36[b]	nw[b]
WMul	83,52	13,5 ± 0,6	127,89 ± 2,73[a]	nw
BMul	87,17	12,8 ± 0,3	223,46 ± 26,62[b]	nw
WCur	80,13	14,8 ± 0,3	66,62 ± 0,93[a]	2,20 ± 0,02[a]
RCur	84,19	13,2 ± 0,3	47,72 ± 7,69[b]	2,34 ± 0,03[a]
BCur	80,89	14,7 ± 0,4	41,58 ± 5,22[b]	4,61 ± 0,06[b]

*Podane wartości stanowią średnią ± SD z trzech niezależnych powtórzeń, z wyjątkiem zawartości wody, której pomiar został wykonany w jednym powtórzeniu.

** Oznaczenia próbek: YRas – żółta malina, RRas – czerwona malina, WGra – białe winogrona, RGra – czerwone winogrona, WMul – biała morwa, BMul – czarna morwa, WCur – biała porzeczka, RCur – czerwona porzeczka, BCur – czarna porzeczka

[a,b] Dane w tej samej kolumnie oznaczone różnymi literami oznaczają statystycznie istotne różnice (obliczone za pomocą testu T-studenta) w zawartości danego składnika w różnych odmianach

nw – nie wykryto

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Biała (WMul) i czarna (BMul) odmiana morwy charakteryzują się zbliżoną zawartością cukru i brakiem witaminy C. Odmiana czarna zawiera więcej wody i białka niż odmiana biała (Tab. 7). Według danych USDA w surowych morwach (nie określono odmiany kolorystycznej) zawartość wody wynosi 87,68 %; białka – 120 mg/g s.m.; cukrów – 8,1 %, a witaminy C – 2,96 mg/g s.m.

Biała (WCur), czerwona (RCur) i czarna (BCur) odmiana porzeczek charakteryzują się podobną zawartością cukru (ok. 14 %). Odmiana biała jest najbogatszym źródłem białka (ok 66 mg/g s.m.), czerwona wody (84 %), a czarna witaminy C (4,61 mg/g s.m.) (Tab. 7). Według danych USDA w surowych porzeczkach (odmiana biała i czerwona) zawartość wody wynosi 83,95 % białka – 87 mg/g s.m. cukrów – 7,37 %, a witaminy C – 2,55 mg/g s.m.; natomiast w odmianie czarnej porzeczek zawartość wody – 81,96 %, białka – 252 mg/g s.m., cukrów – brak danych; witaminy C – 32,6 mg/g s.m.

III.3.2.3. Określenie zawartości substancji odżywczych w odmianach kapusty i kalafiora

We wszystkich badanych warzywach z rodziny *Brassicaceae* zawartość wody była na poziomie 92 % (Tab. 5), co jest zgodne z opublikowanymi wcześniej danymi (Ahmed i Ali, 2013). Całkowita zawartość cukrów (Tab. 8) w przypadku kapust również była zbliżona – ok. 6 %, natomiast w przypadku kalafiorów – odmiana fioletowa zawierała ok 10 % więcej cukrów niż biała.

Tabela 8. Zawartość substancji odżywczych w badanych kapustach i kalafiorach

Próbka**	**Woda*** [%]	**Cukry*** [%]	**Białko*** [mg/g s.m.]	**Tłuszcz*** [mg/g s.m.]
WCab	91,53	6,00 ± 0,31	114,53 ± 3,57	8,47 ± 0,45
RCab	91,17	6,67 ± 0,58	110,33 ± 6,18	8,99 ± 0,42
WCau	92,50	6,83 ± 0,29[a]	93,19 ± 1,19[b]	17,52 ± 0,46[a]
PCau	90,98	7,85 ± 0,39[b]	171,43 ± 18,18[c]	20,79 ± 0,21[b]

*Podane wartości stanowią średnią ± SD z trzech niezależnych powtórzeń, z wyjątkiem zawartością wody, której pomiar został wykonany w jednym powtórzeniu.
** Oznaczenia próbek: WCab – biała kapusta, RCab – czerwona kapusta, WCau – biały kalafior, PCau – fioletowy kalafior
[a,b,c] Dane w tej samej kolumnie oznaczone różnymi literami oznaczają statystycznie istotne różnice (obliczone za pomocą testu T-studenta) w zawartości danego składnika w różnych odmianach
nw – nie wykryto

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Według USDA zawartość cukru w kapuście wynosi ok 3,2 % natomiast w białym kalafiorze 1,9 %. Zawartość białka w obu odmianach kapusty była podobna, natomiast w przypadku kalafiorów odmiana fioletowa zawierała prawie dwukrotnie więcej białka niż odmiana biała. Dane opublikowane przez USDA pokazują, że zawartość białka w obu odmianach kapusty oraz białym kalafiorze wynosiła 166 mg/g s.m.

W przypadku warzyw kapustowatych, można oczekiwać także lipidów jako znaczącego składnika odżywczego, dlatego w przypadku tych próbek roślinnych przeprowadzono także oznaczenia tłuszczu i skłądu kwasów tłuszczowych. Wyniki analiz całkowitej zawartości frakcji lipidowej (Tab. 8) oraz składu kwasów tłuszczowych (Tab. 9) pokazały, że ok 75-80 % wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w warzywach kapustowatych stanowią kwasy nienasycone, co jest powszechne w przypadku tłuszczów pochodzenia roślinnego. Kapusty i kalafiory zawierają najwięcej kwasu α-linolenowego (31-47 %), który jest najczęściej występującym w roślinach kwasem nienasyconym. We wszystkich badanych roślinach występują również znaczące ilości kwasów linolowego (16-25 %) i oleinowego (9-15 %). Z kwasów nasyconych w największej ilości występował kwas palmitynowy – ok. 18 % wszystkich kwasów tłuszczowych. Z badanych odmian roślin, najbogatszym źródłem tłuszczu okazał się kalafior fioletowy. Otrzymane wyniki całkowitej zawartości tłuszczu są porównywalne z wynikami opublikowanymi wcześniej przez USDA: WCab - 11 mg/g s.m., RCab – 18 mg/g s.m. i WCau – 31 mg/g s.m.).

Tabela 9. Skład kwasów tłuszczowych w badanych kapustach i kalafiorach

Kwas tłuszczowy	Symbol	WCab	RCab	WCau	PCau
		Nasycone KT [%]			
Mirystynowy	C 14:0	0,70 ± 0,14	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,00	0,26 ± 0,02
Pentadekanowy	C 15:0	0,59 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,37 ± 0,01
Palmitynowy	C 16:0	19,77 ± 0,16	16,16 ± 0,13	18,48 ± 0,09	18,71 ± 0,18
Stearynowy	C 18:0	4,55 ± 0,07	3,11 ± 0,08	2,12 ± 0,02	2,32 ± 0,01
Arachidowy	C 20:0	1,44 ± 0,03	0,79 ± 0,02	0,81 ± 0,01	0,80 ± 0,06
		Nienasycone KT [%]			
Oleopalmitynowy	C 16:1 (9c)	1,33 ± 0,11	1,03 ± 0,10	0,67 ± 0,01	0,58 ± 0,04
Oleinowy	C 18:1 (9c)	14,78 ± 0,57	9,83 ± 90,07	9,70 ± 0,85	10,30 ± 0,28
Linolowy	C 18:2 (9c, 12c)	19,33 ± 0,40	25,22 ± 0,14	16,19 ± 0,11	16,64 ± 0,44
α -Linolenowy	C 18:3 (9c, 12c, 15c)	31,21 ± 0,45	34,94 ± 0,09	47,69 ± 0,15	45,23 ± 0,48
Gadoleinowy	C 20:1 (9c)	0,41 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,02

*Podane wartości stanowią średnią ± SD z trzech niezależnych powtórzeń
** Oznaczenia próbek: WCab – biała kapusta, RCab – czerwona kapusta, WCau – biały kalafior, PCau – fioletowy kalafior

Podsumowując wyniki analizy składu substancji odżywczych dla badanych ekstraktów roślinnych można stwierdzić, że potwierdziły one zakładane duże

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

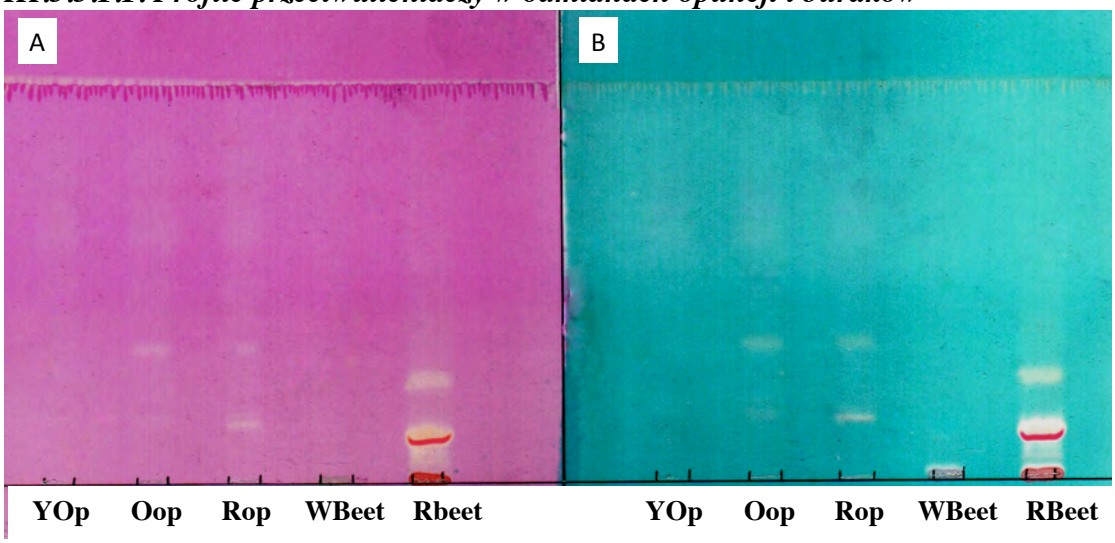
podobieństwa między odmianami owoców i warzyw tego samego gatunku o różnej pigmentacji. Największe, statystycznie istotne wahania były obserwowane między odmianami w przypadku zawartości białka. Porównanie uzyskanych wyników z danymi USDA również wskazało na największe rozbieżności dla białka i witaminy C, czyli składników, w przypadku których metoda prowadzenia oznaczeń i sposób przygotowania próbki do badań ma bardzo duży wpływ na wynik końcowych oznaczeń.

III.3.3. Charakterystyka bioaktywnych fitozwiązków zawartych w badanych roślinach

III.3.3.1. Profile przeciwutleniaczy otrzymane za pomocą techniki TLC

W celu wstępnego scharakteryzowania profilu potencjalnych substancji bioaktywnych w badanych roślinach zastosowano technikę TLC z wizualizacją przeciwutleniaczy. Taki rodzaj detekcji polega na spryskaniu rozwiniętego chromatogramu odczynnikami specyficznie reagującymi z substancjami aktywnymi redoksowo. W tym przypadku zastosowano barwne rodniki DPPH i ABTS pozwalające wykryć na chromatogramach substancje o charakterze przeciwutleniaczy, których obecność objawia się zanikiem barwy reagenta.

III.3.3.1.1. Profile przeciwutleniaczy w odmianach opuncji i buraków



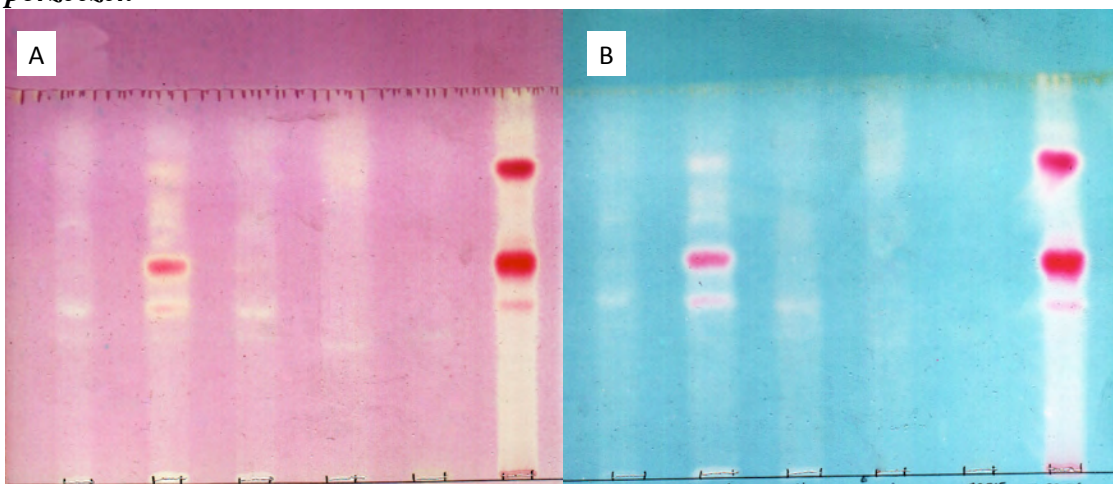
Rys. 18. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) opuncji figowej oraz białym (WBeet) i czerwonym (RBeet) buraku otrzymane za pomocą techniki TLC z wizualizacją z użyciem rodników DPPH (A) i ABTS (B)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Założono, zgodnie z powszechnie przyjętą opinią badaczy, że substancje te zwykle wykazują aktywność biologiczną. W ten sposób uzyskano wstępną informację o różnorodności bioaktywnych fitozwiązków obecnych w badanych roślinach.

Rysunek 18 przedstawia profile przeciwutleniaczy zawartych w wodnych ekstraktach z różnych odmian opuncji figowej oraz buraka. Można zaobserwować, że spośród badanych odmian roślin, najwyższą zawartością związków o charakterze przeciwutleniaczy charakteryzował się ekstrakt z czerwonego buraka (RBeet), następnie ekstrakty z czerwonej (ROp), pomarańczowej (OOp) i żółtej opuncji (YOp). Profil ekstraktu z buraka białego (WBeet) nie wykazał obecności związków o charakterze przeciwutleniaczy, oprócz odbarwionego prążka substancji na starcie obserwowanego dla obu odmian. Są to najprawdopodobniej cukry redukujące, występujące w burakach w wysokim stężeniu, które nie migrują w zastosowanych warunkach chromatograficznych.

III.3.3.1.2. Profile przeciwutleniaczy w odmianach malin, winorgon, morw i porzeczek



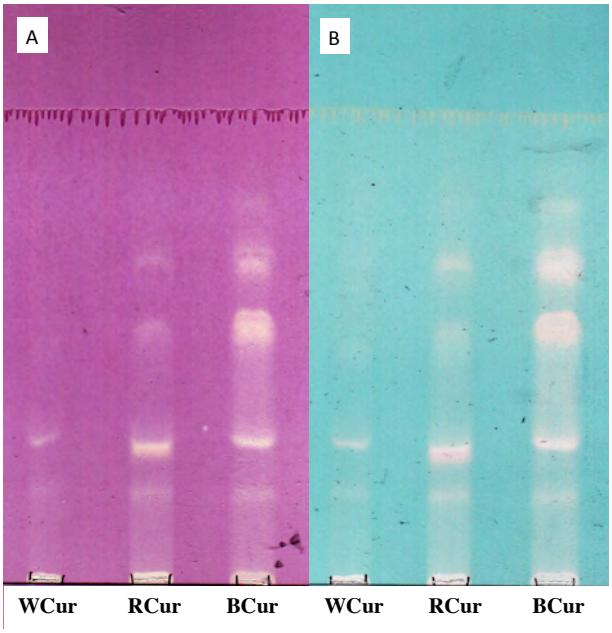
Rys. 19. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) maliny, białych (WGra) i czerwonych (RGra) winogron oraz białej (WMul) i czarnej (BMul) morwy otrzymane za pomocą techniki TLC z wizualizacją z użyciem rodników DPPH (A) i ABTS (B)

Rysunek 19 przedstawia profile przeciwutleniaczy zawartych w wodnych ekstraktach z malin, winogron i morw uzyskane za pomocą techniki TLC i detekcji z użyciem rodników DPPH i ABTS. Podobnie jak w przypadku ekstraktów z opuncji i buraków, również wśród tych owoców odmiany barwne, charakteryzują się bogatszym profilem związków o charakterze przeciwutleniaczy niż odmiany jasne danego gatunku.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wśród tych roślin najbogatszym źródłem przeciwutleniaczy okazała się morwa czarna (BMul), następnie malina czerwona (RRas) i czerwone winogrona (RGra). Wśród odmian jasnych najwięcej przeciwutleniaczy zawierały białe winogrona (WGra), żółta malina (YRas), a najuboższym źródłem tych związków okazała się biała morwa (WMul).

Rysunek 20 przedstawia natomiast profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z porzeczek. Wśród nich również najbogatszym źródłem tych związków okazała się odmiana najciemniejsza, czyli czarna (BCur), następnie czerwona (RCur) i biała (WCur). Wyraźnie odbarwiony prążek na starcie chromatogramu pochodzi prawdopodobnie od witaminy C w porzeczkach występującej w najwyższym stężeniu spośród badanych roślin, bądź od cukrów redukujących obecnych w próbce.



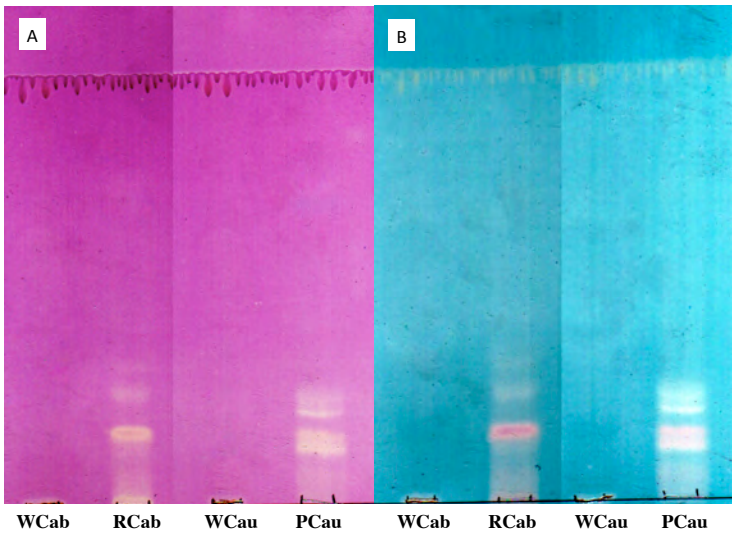
Rys. 20. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) odmiany porzeczki otrzymane za pomocą techniki TLC z wizualizacją z użyciem rodników DPPH (A) i ABTS (B)

III.3.3.1.3. Profile przeciwutleniaczy w odmianach kapusty i kalafiora

Rysunek 21 przedstawia profile przeciwutleniaczy obecnych w wodnych ekstraktach z kapust i kalafiorów. W ich przypadku również odmiany barwne okazały się bogatsze w fitozwiązki aktywne redoksowo od odmian białych. Najbogatszym profilem przeciwutleniaczy charakteryzowała się kapusta czerwona (RCab), następnie kalafior fioletowy (PCau), natomiast w przypadku odmian białych technika TLC nie wykazała obecności związków przeciwutleniających, oprócz prążków o niskiej intensywności na starcie. Jak już wspomniano, w tym miejscu można

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

oczekiwać obecności cukrów redukujących i witaminy C. Należy również zwrócić uwagę, że w porównaniu z profilami otrzymanymi dla ekstraktów owocowych, profile ekstraktów z kapust i kalafiorówzawierają przeciwutleniacze charakteryzujące się niższą wartościa parametrów Rf. Związki znajdujące się w tych ekstraktach albo mają większą masą cząsteczkową, albo silniej oddziałują z fazą stacjonarną, przez co wykazują silniejszą retencję niż związki obecne w owocach.



Rys. 21. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z białej (WCab) i czerwonej (RCab) kapusty oraz białego (WCau) i fioletowego (PCau) kalafiora otrzymane za pomocą techniki TLC z wizualizacją z użyciem odczynników DPPH (A) i ABTS (B)

Ponadto w przypadku wszystkich chromatogramów obserwuje się odbarwioną smugę o różnej intensywności, pochodzącą od niezidentyfikowanych substancji zdolnych do redukcji użytych do detekcji rodników. Smuga ta jest bardziej widoczna w przypadku ekstraktów o najbogatszym składzie przeciwutleniaczy, być może są to m.in. produkty rozkładu tych dość niestabilnych w warunkach tlenowych fitozwiązków.

Uzyskane za pomocą techniki TLC profile przeciwutleniaczy również wskazują na zakładane podobieństwo metabolomów różnych odmian roślin należących do tego samego gatunku. Jeżeli w przypadkach obu/trzech odmian obserwowano odbarwione prążki to większość z nich miała ten sam parametr R_f, a zatem można wnosić, że pochodziła od tego samego związku przeciwutleniającego.

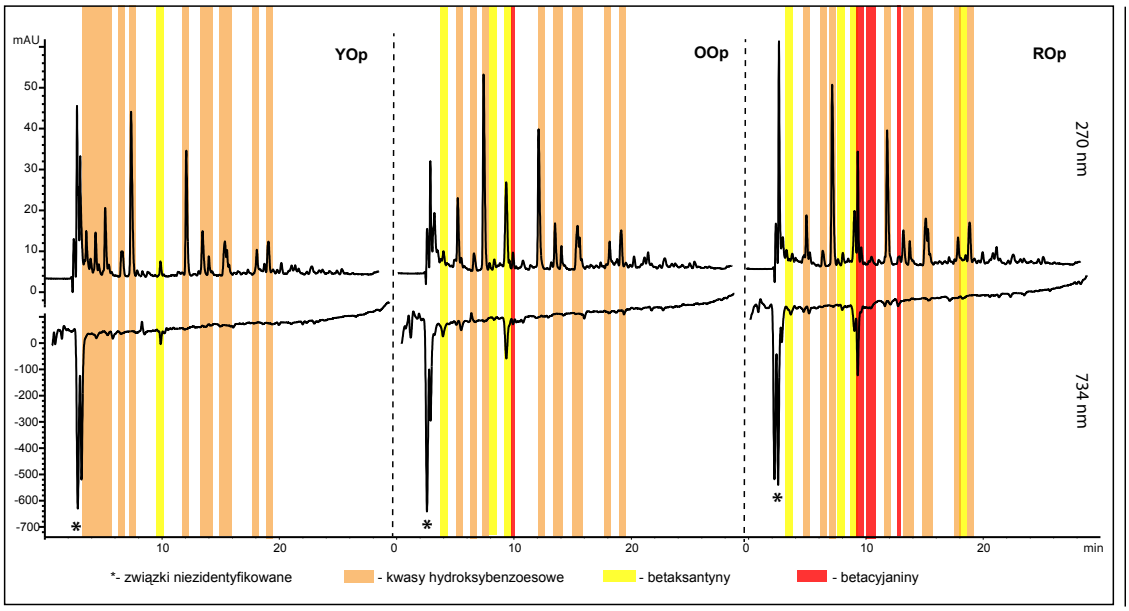
III.3.3.2. Profile związków o charakterze przeciwutleniaczy uzyskane za pomocą HPLC sprzężonego z postkolumnową derywatyzacją odczynnikiem ABTS

Powiązanie składu chemicznego z aktywnością biologiczną danego preparatu, w tym przypadku ekstraktów z roślin jadalnych, wymaga nie tylko wiedzy ile związków

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

wykazuje badaną aktywność, ale również znajomości ich tożsamości chemicznej. Techniką, która pozwala na równoczesne śledzenie poziomu aktywności przeciwutleniającej i identyfikację chemiczną przeciwutleniaczy jest postkolumnowa derywatyzacja z użyciem odczynnika reagującego specyficznie z tą grupą związków, np. rodnika ABTS. Takie podejście zostało zastosowane w omawianych badaniach par roślin o różnej pigmentacji. Pierwszy etap oznaczeń polegał na rozdzieleniu składników ekstraktu roślinnego techniką HPLC oraz ich monitorowaniu przy pomocy detektora matrycą diodową (DAD). Następnie anality wypływające z pierwszego detektora trafiały do pętli reakcyjnej, gdzie dodawany był roztwór rodnika ABTS. W dalszej części wyciek z termostatowanej pętli trafiał do detektora MWD, gdzie detekcja odbywa się przy długości fali 724 nm – analitycznej długości fali rodnika ABTS. Rozdzielone anality o potencjale przeciwutleniającym ulegały reakcji z rodnikiem, co skutkowało odbarwieniem jego roztworu i zmianą absorbancji obserwowaną na chromatogramie jako ujemne odchylenie linii bazowej (pik negatywny).

III.3.3.2.1. Profile przeciwutleniaczy w odmianach opuncji i buraków



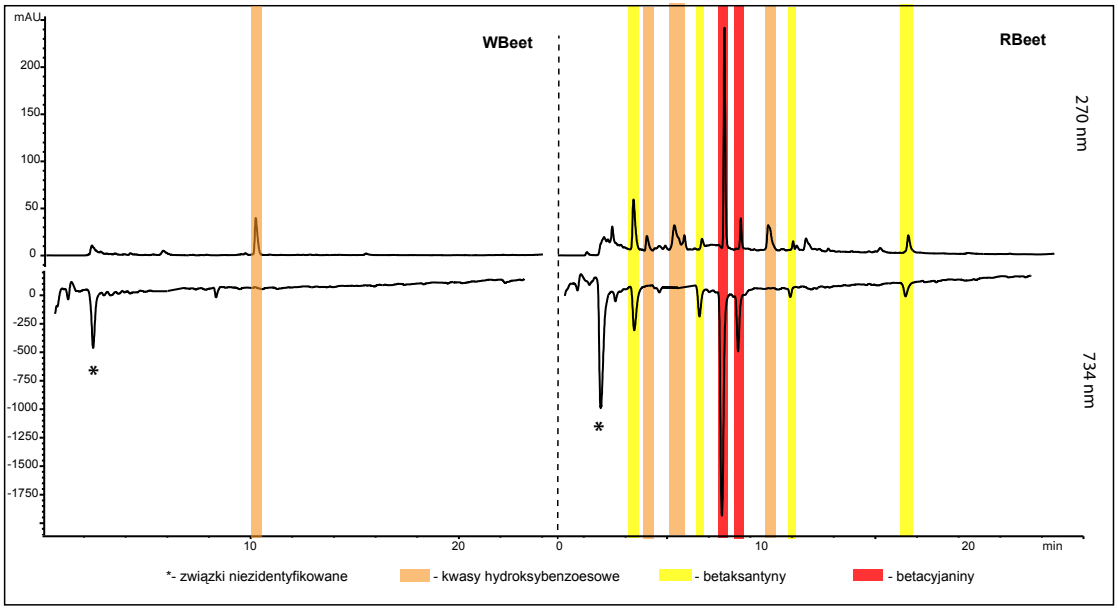
Rys. 22. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) opuncji figowej otrzymane z użyciem postkolumnowej derywatyzacji analitów w eluacie HPLC za pomocą rodnika ABTS

Profile przeciwutleniaczy otrzymane przy użyciu techniki postkolumnowej derywatyzacji odczynnikiem ABTS (Rys. 22) wykazały, że głównym źródłem aktywności przeciwutleniającej w przypadku owoców opuncji nie są związki z grupy betalain, których udział odpowiadał za 3 % (opuncja żółta) do 21 % (opuncja czerwona)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

oznaczonej aktywności przeciwutleniającej, a kwas askorbinowy, oraz inne niezidentyfikowane związki polarne (Rys. 22, pik oznaczony *).

W przypadku ekstraktu z buraka czerwonego to właśnie betalainy stanowią związki o najwyższym udziale w jego aktywności przeciwutleniającej – 89 % (Rys. 23). W obu odmianach buraka również obserwowany jest pik pochodzący od niezidentyfikowanych związków polarnych, wykazujących aktywność przeciwutleniającą, jednakże w przeciwieństwie do dalej opisanych próbek, prawdopodobnie w ich skład nie wchodziła witamina C, ponieważ zgodnie z opisanymi wcześniej wynikami oznaczeń zawartość witaminy C, w obu odmianach buraka była poniżej granicy oznaczalności użytej metody.

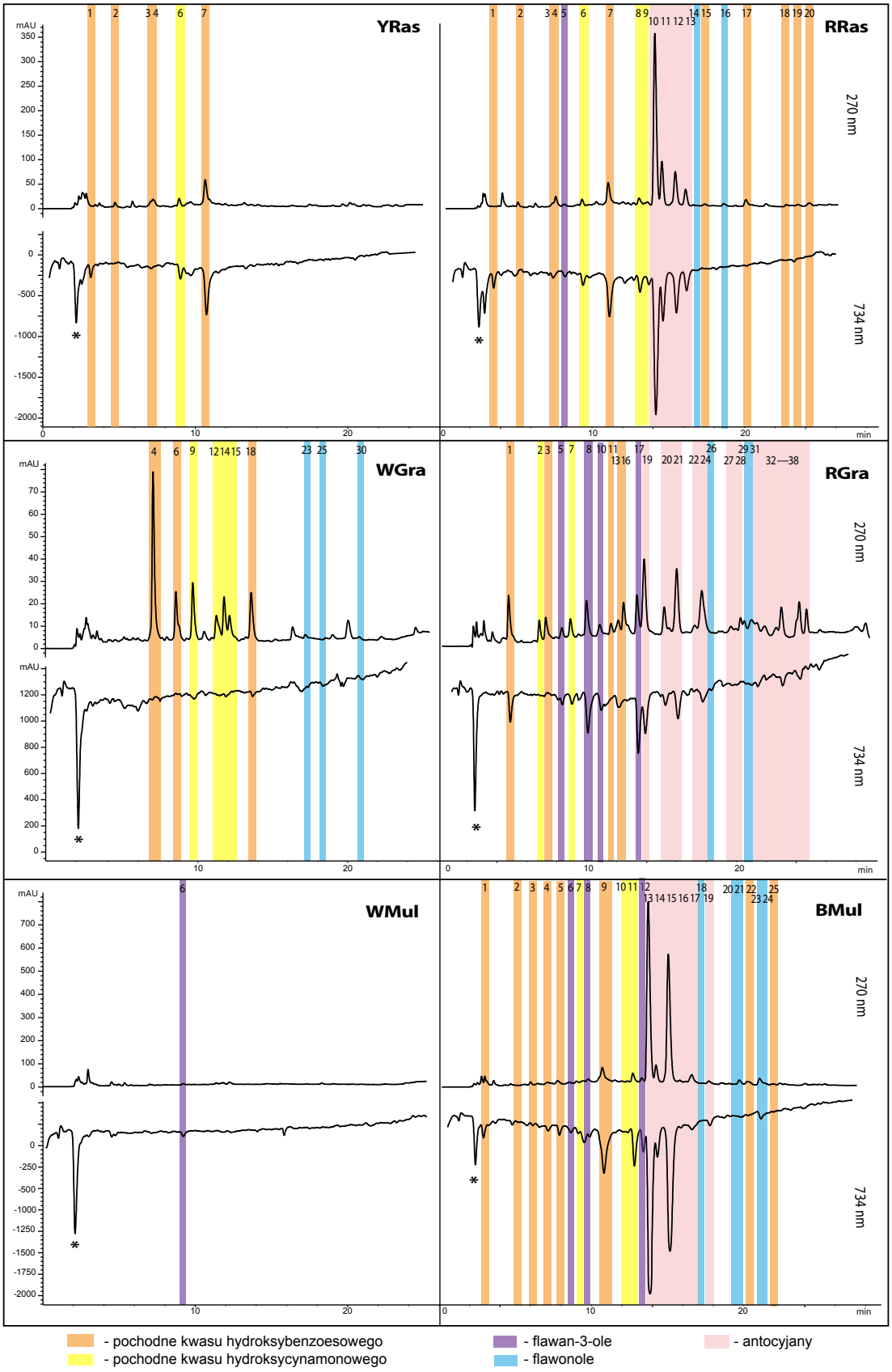


Rys. 23. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z białego (WBeet) i czerwonego (RBeet) buraka otrzymane z użyciem postkolumnowej derywatyzacji analitów w eluacie HPLC za pomocą rodnika ABTS

III.3.3.2.2. Profile przeciwutleniaczy w odmianach malin, winogron, morw i porzeczek

Profile HPLC przeciwutleniaczy uzyskane z użyciem techniki derywatyzacji postkolumnowej dla odmian malin, winogron, morw (Rys. 24) i porzeczek (Rys. 25) potwierdziły wyniki uzyskane za pomocą techniki TLC. Także w tym przypadku odmiany ciemniejsze charakteryzowały się zdecydowanie bogatszym profilem przeciwutleniaczy od jasnych odmian owoców danego gatunku.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 24. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) maliny, białych (WGra) i czerwonych (RGra) winogron, białej (WMul) i czarnej (BMul) morwy otrzymane z użyciem postkolumnowej derywatyzacji analitów w eluacie HPLC za pomocą

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

rodnika ABTS. Numery pików na chromatogramach korespondują ze związkami opisanymi w tabeli 12

W przypadku żółtej odmiany maliny (YRas) na aktywność przeciwutleniającą ekstraktu składały się głównie niezidentyfikowane polarne związki, które widoczne są na początku chromatogramu (pik oznaczony *), oraz pochodne kwasów fenolowych. Odmiana czerwona (RRas) charakteryzowała się znacznie bogatszym profilem związków polifenolowych, a największy wpływ na aktywność przeciwutleniającą badanego ekstraktu miały antocyjany, nieco mniejszy pochodne kwasów fenolowych oraz niezidentyfikowane związki polarne (w tym witamina C).

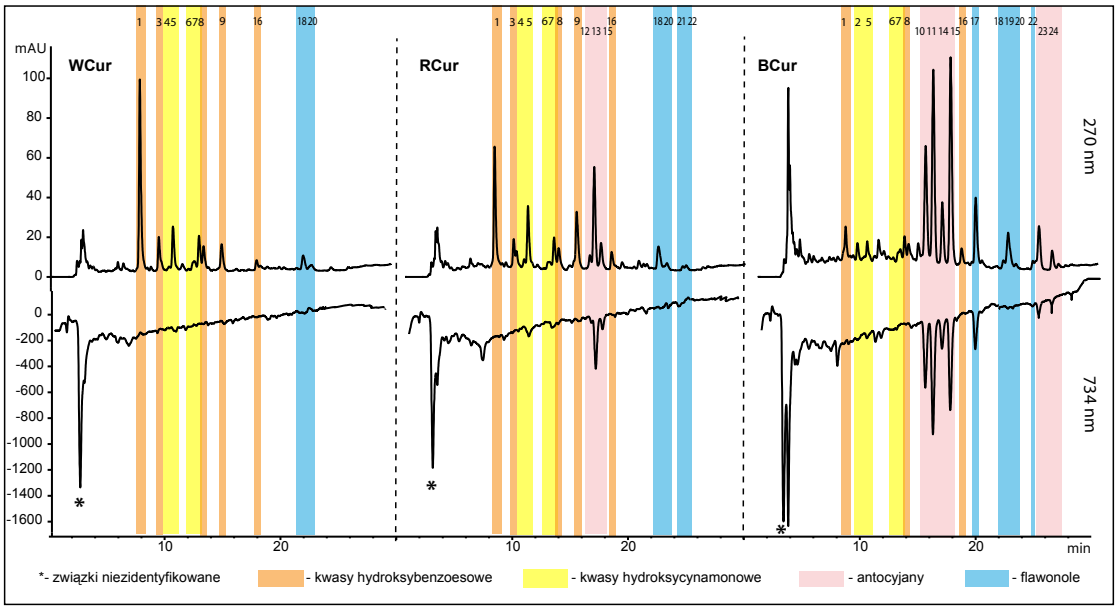
Biała odmiana winogron (WGra) również charakteryzowała się znacznie uboższym profilem (Rys. 24) związków przeciwutleniających od odmiany czerwonej (RGra). W przypadku tej pierwszej, podobnie jak dla żółtej opuncji, największy wpływ na aktywność przeciwutleniającą ekstraktu miały niezidentyfikowane polarne związki, które znajdują się na początku chromatogramu (pik oznaczony *). Wśród innych przeciwutleniaczy, można zidentyfikować pochodne kwasów fenolowych oraz flawonole. Przedstawiony profil sugeruje jednak ich niewielki wkład w całkowitą aktywność przeciwutleniającą. Czerwona odmiana winogron (RGra) cechowała się najbogatszym profilem związków o charakterze przeciwutleniaczy spośród wszystkich badanych próbek roślinnych. Zawierała ona zarówno związki z grupy antocyjanów, jak również pochodne kwasów fenolowych, flawonole czy flawan-3-ole, jednakże związki te występowały w stosunkowo niskim stężeniu, stąd również w przypadku tej odmiany najbardziej znaczący udział w aktywności przeciwutleniającej mają niezidentyfikowane polarne związki pojawiające się na początku chromatogramu.

Profil przeciwutleniaczy białej morwy (Rys. 24) potwierdził wnioski wysnute na podstawie profilu uzyskanego z użyciem techniki TLC, że spośród badanych owoców jest ona najuboższym źródłem przeciwutleniaczy. Właściwie poza jednym związkiem z grupy flawan-3-oli, głównym źródłem aktywności przeciwutleniającej w przypadku tej odmiany są niezidentyfikowane związki polarne. Morwa czarna natomiast charakteryzuje się bogatym profilem przeciwutleniaczy (Rys. 24), z których grupą mającą najwięszy wpływ na aktywność przeciwutleniającą są antocyjany.

Profile przeciwutleniaczy uzyskane dla wodnych ekstraktów z porzeczek (Rys. 25), podobnie jak w przypadku pozostałych gatunków roślin wskazują, że najbogatszym źródłem tych związków jest odmiana najciemniejsza – czarna porzeczka (BCur), następnie czerwona (RCur), a najuboższym biała (WCur). W przypadku odmiany białej,

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

na aktywność przeciwutleniającą podobnie jak w przypadku pozostałych jasnych odmian badanych roślin, miały wpływ przede wszystkim niezidentyfikowane substancje polarne (pik oznaczony *). W ich skład wchodziła również witamina C, której porzeczki okazały się być bogatym źródłem. Biała porzeczka zawierała także pochodne kwasów fenolowych oraz flawonole, jednakże stężenie tych związków było niewielkie, przez co nie miały one znaczącego wpływu na potencjał przeciwutleniający ekstraktu z tej odmiany. W ekstrakcie z czerwonej odmiany porzeczek, niezidentyfikowane związki polarne również miały największy wpływ na aktywność przeciwutleniającą, jednakże występujące w tej odmianie antocyjany wnosiły już pewien wkład. W ekstraktach z czarnej odmiany porzeczek charakteryzującej się najbogatszym profilem przeciwutleniaczy, antocyjany miały znaczący udział w aktywności przeciwutleniającej, zbliżony do wpływu witaminy C i innych niezidentyfikowanych związków polarnych.



Rys. 25. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z białych (WCur), czerwonych (RCur) i czarnych (BCur) porzeczek otrzymane z użyciem postkolumnowej derywatyzacji analitów w eluacie HPLC za pomocą rodnika ABTS

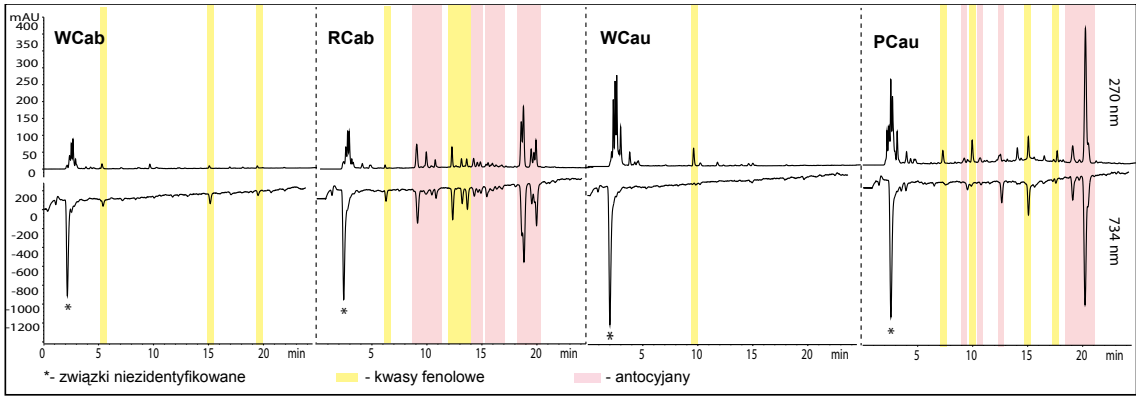
III.3.3.2.3. Profile przeciwutleniaczy w odmianach kapusty i kalafiora

Profile przeciwutleniaczy uzyskane w wyniku analizy HPLC dla ekstraktów z kapust i kalafiorów (Rys. 26) potwierdziły dane uzyskane za pomocą techniki TLC, t.j. że białe odmiany tych roślin charakteryzują się ubogim profilem związków o charakterze przeciwutleniaczy, właściwie głównym ich źródłem wydają się być niezidentyfikowane polarne związki, które w profilach uzyskanych techniką TLC

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

prawdopodobnie zostawały na starcie chromatogramu. W przypadku czerwonej kapusty i fioletowego kalafiora, profile przeciwuteniaczy są znacznie bogatsze, a na aktywność przeciwutleniającą tych odmian mają wpływ, obok niezidentyfikowanych związków polarnych, również związki fenolowe, przede wszystkim antocyjany.

Profile przeciwutleniaczy otrzymane techniką HPLC z postkolumnową derywatyzacją rodnikiem ABTS charakteryzowały się także podwyższeniem linii bazowej, tym większym im bogatszy był profil rozdzielonych przeciwutleniaczy. Zmianę poziomu linii bazowej można uznać za odpowiednik smugi obserwowanej na profilach TLC.



Rys. 26. Profile przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach z białej (WCab) i czerwonej (RCab) kapusty oraz białego (WCau) i fioletowego (PCau) kalafiora otrzymane z użyciem postkolumnowej derywatyzacji analitów w eluacie HPLC za pomocą rodnika ABTS

Świadczy ona o obecności przeciwutleniaczy, które albo nie są rozdzielane w stosowanych warunkach chromatograficznych albo powstają w trakcie analizy. Niezależnie od ich pochodzenia można jednak się spodziewać, że będą one wpływały na całkowitą aktywność przeciwutleniającą ekstraktów. W przypadku obu odmian malin i winogron, wpływ ten może być znaczący, dla warzyw kapustowatych raczej niewielki.

III.3.3.3. Oznaczenie składu i zawartości związków z grupy betalain w ekstraktach z opuncji figowej i buraków

Skład i zawartość związków z grupy betalain w ekstraktach z żółtych (YOp), pomarańczowych (OOp) i czerwonych (ROp) opuncji oraz białych (WBeet) i czerwonych (RBeet) buraków zostały oznaczone za pomocą techniki HPLC-TOF-MS/MS (Tab. 11) we współpracy z dr hab. inż Wiesławem Wiczkowskim z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela. 10. Parametry chromatograficzne, spektrofotometryczne i spektroskopowe będące podstawą do identyfikacji związków z grupy betalain

Związek	Rt [min]	λ_{max} [nm]	MS [m/z]	MS/MS [m/z]
indykaksantyna	0,55	479	309	263,1/219,1
izoindykaksantyna	0,65	479	309	263,1/219,1
3-metoksytyramino-betaksantyna	1,62	456	361,1	317,2
3-metoksytyramino-izobetaksantyna	1,81	456	361,1	317,2
glutamino-betaksantyna (vulgaksantyna I	0,41	475	340,1	323,1/277,1
dopamino-betaksantyna	1,87	459	347	303,1
fenylalanino-izobetaksantyna	1,52	472	359,1	315,1
tyramino-betaksantyna (miraksantyna III)	1,58	452	331,2	287,1
tryptofano-betaksantyna	1,55	470	398,1	354,1
2-dekarboksy-neobetanina	1,47	485	505,1	343,1/297,1
17-dekarboksy-neobetanina	1,35	485	505,1	343,1/297,1
betanina	1,28	537	551,1	389,1
izobetanina	1,34	537	551,1	389,1

Identyfikacji związków dokonano na podstawie analizy czasów retencji oraz widm MS i MS/MS (Tab.10).

Betalainami występującymi w największych ilościach w opuncjach były żółta indykaksantyna oraz czerwona betanina (Tab 11). Najbogatszym źródłem tych związków wśród badanych odmian opuncji okazała się być odmiana pomarańczowa (4,90 ± 0,04 mg/g s.m.) zawierająca głównie żółte betaksantyny (indykaksantynę, oraz jej izomer izoindykaksantynę), następnie odmiana czerwona (2,87 ± 0,03 mg/g s.m.) i żółta (0,22 ± 0,04 mg/g s.m.).

Tabela 11. Skład i zawartość związków z grupy betalain w odmianach opuncji figowej i buraków oznaczone za pomocą HPLC-TOF-MS/MS

Związek	YOp	OOp	ROp	WBeet	RBeet
	[mg/g s.m.]				
indykaksantyna	0,121 ± 0,003	4,202 ± 0,031	2,199 ± 0,026	nw	nw
izoindykaksantyna	0,061 ± 0,002	nw	nw	nw	nw
3-metoksytyramino-betaksantyna	0,016 ± 0,000	nw	nw	nw	nw
3-metoksytyramino-izobetaksantyna	0,016 ± 0,000	nw	nw	nw	nw
wulgaksantyna I	nw	0,106 ± 0,002	0,089 ± 0,001	nw	1,925 ± 0,075
dopamino-betaksantyna	nw	nw	nw	nw	2,135 ± 0,079
fenylalanino-betaksantyna	nw	0,293 ± 0,008	0,164 ± 0,003	nw	1,151 ± 0,030
tyrozyno-betaksantyna	nw	0,140 ± 0,001	0,106 ± 0,002	nw	0,826 ± 0,008
tryptofano-betaksantyna	nw	0,139 ± 0,003	0,113 ± 0,000	nw	0,800 ± 0,007
2-dekarboksy-neobetanina	nw	nw	nw	nw	0,034 ± 0,002
17-dekarboksy-neobetanina	nw	nw	nw	nw	0,035 ± 0,001
betanina	nw	0,023 ± 0,001	0,178 ± 0,001	nw	3,234 ± 0,014
izobetanina	nw	nw	0,017 ± 0,000	nw	0,510 ± 0,016
Σ betalain	**0,215 ± 0,005**	**4,904 ± 0,036**	**2,868 ± 0,028**	**0**	**10,649 ± 0,112**

Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD.
Oznaczenia: nw (nie wykryto), s.m (sucha masa)

Biała odmiana buraka nie zawierała betalain. Natomiast odmiana czerwona była najbogatszym źródłem tych związków spośród wszystkich badanych roślin (10,65 ± 0,11 mg/g s.m.). Głównymi pigmentami z tej grupy obecnymi w ekstrakcie z czerwonego buraka były czerwone betanina i izobetanina oraz żółta wulgaksantyna I, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Sawicki, i in. 2016). Interesujący jest fakt, że jedynie czerwony burak zawierał dopamino-betaksantynę, pochodną neurotransmitera -

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

dopaminy. Dopamina jest stosowana dożylnie jako lek stymulujący w leczeniu spowolnionego rytmu serca, zatrzymania krążenia i niskiego ciśnienia krwi. Nie znaleziono jednak informacji czy betaksantynowa pochodna dopaminy może być wchłaniana z przewodu pokarmowego. Wiadomo jednak, że sok z czerwonego buraka poprawia wydolność organizmu ludzkiego przy wysiłku sportowym, a dopamina jest znanym środkiem dopingowym (Dominguez, i in. 2016).

III.3.3.4. Oznaczenie składu i zawartości związków z grupy polifenoli w ekstraktach z malin, winogron, morwy i porzeczk

Tabela. 12. Parametry chromatograficzne, spektrofotometryczne i spektroskopowe będące podstawą do identyfikacji związków z grupy polifenoli

Rt [min]	λ_{max} [nm]	MS (+)	MS (-)	Wyznaczona M_m(Da)	Związek	Obecność w ekstraktach z owoców (+/-) / nr piku na chromatogramie								
						YRas	RRas	WGra	RGra	WMul	BMul	WCur	RCur	BCur
3,2	240	215 (M+Na)	191 (M-H)	192	kwas chinowy	+/1	+/1	-	-	-	+/1	-	-	-
4,6	270	171 (M+H)	169 (M-H)	170	kwas galusowy	-	-	-	+/1	-	-	-	-	-
5,1	250	229 (M+Na)	205 (M-H)	206	nd	+/2	+/2	-	-	-	+/2	-	-	-
6,0	260	323 (M+Na)	299 (M-H)	300	heksoza *p*-hydroksybenzenu	-	-	-	-	-	+/3	-	-	-
6,8	250, 300	132	198, 331	nd	nd	-	-	-	+/2	-	-	-	-	-
7,1	280	127	198, 523	nd	nd	-	-	-	+/3	-	-	-	-	-
7,2	260, 290sh	392 (M+Na)	368 (M-H)	369	nd	+/3	+/3	-	-	-	+/4	-	-	-
7,3	260	323 (M+Na)	299 (M-H)	300	heksoza *p*-hydroksybenzenu	-	-	+/4	-	-	-	+/1	+/1	+/1
7,4	260	367 (M+Na)	343 (M-H)	344	nd	+/4	+/4	-	-	-	-	-	-	-
7,9	260, 290sh	635 (M+Na)	647 (M-Cl)	612	nd	-	-	-	-	-	+/5	-	-	-
8,5	260, 280sh, 325	-	353 (M-H)	354	kwas chlorogenowy	-	-	-	-	-	-	-	-	+/2
8,7	280	291 (M+H)	279 (M-H)	290	katechina	-	+/5	-	+/5	+/6	+/6	-	-	-
8,9	265, 295	353 (M+Na)	329 (M-H)	330	heksoza waniliny	-	-	+/6	-	-	-	+/3	+/3	-
9	260, 330	618 (M+H)	616 (M-H)	617	nd	-	-	-	+/7	-	-	-	-	-
9,2	260, 290, 325	365 (M+Na)	341 (M-H)	342	heksoza kawowa	+/6	+/6	-	-	-	+/7	+/4	+/4	-
10,0	280	579 (M+H)	577 (M-H)	578	dimer procyjanidyny	-	-	-	+/8	-	+/8	-	-	-
10,2	300	349 (M+Na)	361 (M-Cl)	326	heksoza *p*-kumaryny	-	-	+/9	-	-	-	+/5	+/5	+/5
10,9	260,280sh	-	934 (M-H)	935	gallo-bis-haksahydroksydifenylo)-glukoza	+/7	+/7	-	-	-	+/9	-	-	-
11,0	280	579 (M+H)	577 (M-H)	578	dimer procyjanidyny	-	-	-	+/10	-	-	-	-	-
11,6	260, 300sh	467 (M+Na)	443 (M-H)	444	nd	-	-	-	+/11	-	-	-	-	-
11,7	300	349 (M+Na)	361 (M-Cl)	326	heksoza *p*-kumaryny	-	-	+/12	-	-	-	+/6	+/6	+/6
12,1	280	317	729	nd	nd	-	-	-	+/13	-	-	-	-	-
12,2	300	349 (M+Na)	361 (M-Cl)	326	heksoza *p*-kumaryny	-	-	+/14	-	-	-	+/7	+/7	+/7
12,4	300	349 (M+Na)	361 (M-Cl)	326	heksoza *p*-kumaryny	-	-	+/15	-	-	-	-	-	-
12,5	275	188, 205	-	nd	nd	-	-		+/16	-	-	+/8	+/8	+/8
12,6	280, 325	797 (M+Na)	773 (M-H)	774	nd	-	+/8	-	-	-	+/10	-	-	-
12,9	260, 325	651 (M+Na)	627 (M-H)	628	nd	-	+/9	-	-	-	+/11	-	-	-
13,5	280	291	289	290	epikatechina	-	-	-	+/17	-	+/12	-	-	-
13,9	275	338 (M+H)	372 (M-Cl)	337	nd	-	-	+/18	-	-	-	+/9	+/9	-
13,9	525	611 (M+H)	609 (M-H)	610	soforozyd cyjanidyny	-	+/10	-	-	-	+/13	-	-	-

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

14,2	525	465 (M+H)	463 (M-H)	464	glukozyd delfinidyny	-	-	-	+/19	-	-	-	-	+/10
14,4	525	757 (M+H)	755 (M-H)	756	glukozydorutynozyd cyjanidyny	-	+/11	-	-	-	+/14	-	-	-
14,9	525	611 (M+H)	609 (M-H)	610	rutynozyd delfinidyny	-	-	-	-	-	-	-	-	+/11
15,0	525	581 (M+H)	579 (M-H)	580	sambubiozyd cyjanidyny	-	-	-	-	-	-	-	+/12	-
15,2	525	727 (M+H)	725 (M-H)	726	ksylozydorutynozyd cyjanidyny	-	-	-	-	-	-	-	+/13	-
15,3	525	449 (M+H)	447 (M-H)	448	glukozyd cyjanidyny	-	+/12	-	+/20	-	+/15	-	-	+/14
15,9	525	595 (M+H)	593 (M-H)	594	rutynozyd cyjanidyny	-	+/13	-	-	-	+/16	-	+/15	+/15
16,1	525	479 (M+H)	477 (M-H)	478	glukozyd petunidyny	-	-	-	+/21	-	-	-	-	-
16,4	260, 360	619 (M+Na)	595 (M-H)	596	arabinozyd kwercetyny	-	+/14	-	-	-	-	-	-	-
16,7	525	271, 433	431, 467	432	heksozyd pelargonidyny	-	-	-	-	-	+/17	-	-	-
16,9	260, 360	649 (M+Na)	625 (M-H)	626	heksozydoheksozyd kwercetyny	-	-	-	-	-	+/18	-	-	-
17,0	260	418 (M+Na)	394 (M-H)	395	nd	-	-	-	-	-	-	+/16	+/16	+/16
17,2	250, 300sh, 360	435 (M+H)	433 (M-H)	434	koniugat pentozy i kwasu elagowego	-	+/15	-	-	-	-	-	-	-
17,4	525	463 (M+H)	499 (M+Cl)	462	glukozyd peonidyny	-	-	-	+/22	-	-	-	-	-
17,6	260, 350	487 (M+Na)	499 (M+Cl)	464	heksozyd kwercetyny	-	-	+/23	-	-	-	-	-	-
17,8	525	493 (M+H)	527 (M+Cl)	492	glukozyd malwidyny	-	-	-	+/24	-	-	-	-	-
17,9	525	697 (M+H)	695 (M-H)	696	malonylodiglukozyd cyjanidyny	-	-	-	-	-	+/19	-	-	-
18,1	260, 360	487 (M+Na)	499 (M+Cl)	464	heksozyd kwercetyny	-	-	+/25	-	-	-	-	-	-
18,2	260, 360	463 (M+H)	479 (M+Cl)	462	heksozyd izoramentyny	-	-	-	+/26	-	-	-	-	-
18,4	260, 360	503 (M+Na)	479 (M-H)	480	glukozyd myrecytyny	-	-	-	-	-	-	-	-	+/17
18,8	260, 360	633 (M+Na)	609 (M-H)	610	galaktozydoramnozyd kwercetyny	-	+/16	-	-	-	+/20	-	-	-
19,3	260, 300sh,360	597 (M+H)	595 (M-H)	596	glukozydoksylozyd kwercetyny	-	-	-	-	-	+/21	-	-	-
19,8	525	303, 507	505	506	acetyloglukozyd delfinidyny	-	-	-	+/27	-	-	-	-	-
19,9	525	507, 773	771	772	kumarylodiglukozyd delfinidyny	-	-	-	+/28	-	-	-	-	-
20,0	250, 300sh, 360	435 (M+H)	433 (M-H)	434	koniugat pentozy i kwasu elagowego	-	+/17	-	-	-	+/22	-	-	-
20,4	260, 360	479 (M+H)	477 (M-H)	478	glukoronid kwercetyny	-	-	-	+/29	-	-	-	-	-
20,6	260, 360	633 (M+Na)	609 (M-H)	610	rutyna	-	-	+/30	-	-	-	+/18	+/18	+/18
20,7	260, 360	487 (M+Na)	463 (M-H)	464	heksozyd kwercetyny	-	-	-	+/31	-	+/23	-	-	+/19
21,1	525	787 (M+H)	821 (M+Cl)	786	kumarylodiglukozyd petunidyny	-	-	-	+/32	-	-	-	-	-
21,2	260, 360	529 (M+Na)	541 (M+Cl)	506	nd	-	-	-	-	-	-	+/20	+/20	+/20
21,4	260, 360	303 (M+H)	301 (M-H)	302	kwercetyna	-	-	-	-	-	+/24	-	-	-
21,5	525	521 (M+H)	519 (M-H)	520	acetyloglukozyd petunidyny	-	-	-	+/33	-	-	-	-	-
21,7	250, 300sh, 360	435 (M+H)	433 (M-H)	434	koniugat pentozydy i kwasu elagowego	-	-	-	-	-	+/25	-	-	-
21,9	525	801 (M+H)	835 (M-H)	800	kumarylodiglukozyd malwidyny	-	-	-	+/34	-	-	-	-	-
22,5	260, 360	471 (M+Na)	447 (M-H)	448	ramnozyd kwercetyny	-	-	-	-	-	-	-	+/21	-
22,6	250, 300sh, 360	449 (M+H)	447 (M-H)	448	koniugat pentozy i kwasu metyloelagowego	-	+/18	-	-	-	-	-	-	-
22,7	525	535 (M+H)	569 (M+Cl)	534	acetyloglukozyd malwidyny	-	-	-	+/35	-	-	-	-	-
22, 9	260, 310, 360sh	617 (M+Na)	593 (M-H)	594	kumaryloglukozyd kampferolu	-	-	-	-	-	-	-	+/22	+/22
23,1	525	611 (M+H)	609 (M+Cl)	610	kumaryloglukozyd delfinidyny	-	-	-	+/36	-	-	-	-	-
23,3	260, 310	-	475 (M-H)	476	acetyloheksozyd kwasu elagowego	-	+/19	-	-	-	-	-	-	-
23,4	525	611 (M+H)	609 (M-H)	610	rutynozyd peonidyny	-	-	-	-	-	-	-	-	+/23
23,9	310	-	475 (M-H)	476	acetyloarabinozyd kwasu elagowego	-	+/20	-	-	-	-	-	-	-
24,1	525	595 (M+H)	593 (M-H)	594	kumaryloglukozyd cyjanidyny	-	-	-	-	-	-	-	-	+/24
24,1	525	625 (M+H)	623 (M-H)	624	kumaryloglukozyd petunidyny	-	-	-	+/37	-	-	-	-	-
24,6	525	639 (M+H)	673 (M+Cl)	638	kumaryloglukozyd malwidyny	-	-	-	+/38	-	-	-	-	-

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Kolorem pomarańczowym zaznaczono pochodne kwasu hydroksybenzoesowego, żółtym pochodne kwasu hydroksycynamonowego, fioletowym flawan-3-ole, czerwonym antocyjany i niebieskim flawonole.

Skład i zawartość związków z grupy polifenoli w ekstraktach z żółtych (YRas) i czerwonych (RRas) malin, białych (WGra) i czerwonych (RGra) winogron, białej (WMul) i czarnej (BMul) morwy oraz białych (WCur), czerwonych (RCur) i czarnych (BCur) porzeczek zostały oznaczone za pomocą techniki HPLC-DAD-MS (Tab. 13). Identyfikacji związków dokonano na podstawie analizy czasów retencji oraz widm MS i porównania z danymi literaturowymi (Tab.12).

Analiza składu i zawartości związków z grupy polifenoli (kwasów fenolowych, flawonoli, flawan-3-oli i antocyjanów) potwierdziła wnioski wyciągnięte na podstawie profili otrzymanych z użyciem technik TLC oraz HPLC z derywatyzacją postkolumnową rodnikiem ABTS - kolorowe odmiany owoców są znacznie bogatszymi źródłami substancji o charakterze przeciwutleniaczy niż odmiany jasne.

Profile przeciwutleniaczy uzyskane za pomocą postkolumnowej derywatyzacji pokazały, że najważniejszymi związkami z grupy polifenoli z punktu widzenia aktywności przeciwutleniającej są antocyjany. Najwięcej tych związków spośród badanych owoców zawierała czarna morwa (11,208 mg/g d.m.), następnie czerwona malina (3,142 mg/g s.m), czarna porzeczka (1,529 mg/g s.m), czerwone winogrona (0,962 mg/g s.m.) i czerwona porzeczka (0,425 mg/g s.m). Jasne odmiany badanych roślin nie zawierały w ogóle bądź w śladowych ilościach związków z tej grupy. Czarna morwa zawierała najwięcej antocyjanów, jednakże nie charakteryzowała się ona najbogatszym profilem tych związków. Zdecydowanie największą różnorodność antocyjanów oznaczono w czerwonej odmianie winogron (14 różnych antocyjanów).

Inną istotną grupą polifenoli ze względu na ich wysoką zawartość w badanych roślinach są pochodne kwasu hydroksycynamonowego i hydroksybenzoesowego. Największa zawartość tych związków cechowała czerwoną malinę (odpowiednio 6,01 i 1,08 mg/g s.m.), następnie czarną morwę (1,74 i 2,87 mg/g s.m.) i żółtą malinę (1,98 i 0,98 mg/g s.m.). W przypadku żółtej maliny pochodne kwasów fenolowych były jedynymi obecnymi związkami z grupy polifenoli. W czerwonej odmianie maliny zawartość kwasów fenolowych była największa ze wszystkich związków fenolowych, podobnie wyglądała sytuacja w przypadku białych porzeczek, czerwonych porzeczek i białych winogron.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela 13. Skład i zawartość związków z grupy polifenoli w malinach, winogronach, porzeczkach i morwie oznaczony za pomocą HPLC-DAD-MS

Związek	YRas	RRas	WGra	RGra	WMul	BMul	WCur	RCur	BCur
Σ Pochodnych Kwasu Hydroksycynamonowego [mg/g s.m]	**1,978 ± 0,083**	**6,009 ± 0,646**	**0,861 ± 0,022**	**0,203 ± 0,040**	**0**	**1,744 ± 0,157**	**0,465 ± 0,101**	**0,791 ± 0,085**	**0,650 ± 0,077**
Σ Pochodnych Kwasu Hydroksybenzoesowego [mg/g s.m]	**0,976 ± 0,033**	**1,078 ± 0,153**	**0,911 ± 0,035**	**0,346 ± 0,083**	**0**	**2,872 ± 0,223**	**0,895 ± 0,023**	**0,968 ± 0,048**	**0,478 ± 0,064**
Flawan-3-ole [mg/g s.m]									
Katechina	nw	0,738 ± 0,045	nw	0,278 ± 0,074	0,177 ± 0,005	1,888 ± 0,161	nw	nw	nw
Epikatechina	nw	nw	nw	0,642 ± 0,096	nw	2,836 ± 0,282	nw	nw	nw
Σ Flawan-3-oli [mg/g s.m]	**0**	**0,738 ± 0,045**	**0**	**2,008 ± 0,085**	**1,888 ± 0,161**	**8,465 ± 0,826**	**0**	**0**	**0**
Flawonole [mg/g s.m]									
Kwercytyna	nw	nw	nw	nw	nw	0,195 ± 0,003	nw	nw	nw
Rutyna	nw	nw	0,134 ± 0,006	nw	nw	0,201 ± 0,005	0,111 ± 0,007	0,180 ± 0,024	0,065 ± 0,006
Σ Flawonoli [mg/g s.m]	**0**	**0,193 ± 0,015**	**0,274 ± 0,010**	**0,259 ± 0,009**	**0**	**1,487 ± 0,156**	**0,181 ± 0,005**	**0,359 ± 0,031**	**0,833 ± 0,132**
Antocyjany [mg/g s.m]									
Delph-3-O-Glu	nw	nw	nw	0,216 ± 0,016	nw	nw	nw	nw	0,315 ± 0,049
Delph-3-O-Rut	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	0,569 ± 0,068
Cy-3-O-Samb	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	0,035 ± 0,001	nw
Cy-3-O-(Xyl-Rut)	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	0,314 ± 0,018	nw
Cy-3-O-Glu	nw	0,458 ± 0,005	nw	0,073 ± 0,003	nw	4,636 ± 0,586	nw	nw	0,161 ± 0,024
Cy-3-O-Rut	nw	0,206 ± 0,003	nw	nw	nw	0,111 ± 0,018	nw	0,077 ± 0,004	0,483 ± 0,086
Peo-3-Rut	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	0,079 ± 0,012
Cy-3-O-(6”-p-Coum-Glu)	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	0,029 ± 0,004
Cy-3-O-Soph	nw	1,970 ± 0,045	nw	nw	nw	5,686 ± 0,609	nw	nw	nw
Cy-3-O-(Glu-Rut)	nw	0,507 ± 0,021	nw	nw	nw	0,521 ± 0,063	nw	nw	nw
Pet-3-O-Glu	nw	nw	nw	0,205 ± 0,012	nw	nw	nw	nw	nw
Peo-3-O-Glu	nw	nw	nw	0,011 ± 0,001	nw	nw	nw	nw	nw
Malv-3-O-Glu	nw	nw	nw	0,142 ± 0,007	nw	nw	nw	nw	nw
Delph-3-O-(6-O-acetyl)-Glu	nw	nw	nw	0,033 ± 0,003	nw	nw	nw	nw	nw
Delph-3-O-(6-O-p-Coum)-5-diGlu	nw	nw	nw	0,035 ± 0,002	nw	nw	nw	nw	nw
Pet-3-O-(6-O-p-Coum)-5-diGlu	nw	nw	nw	0,046 ± 0,003	nw	nw	nw	nw	nw
Pet-3-O-(6-O-acetyl)-Glu	nw	nw	nw	0,014 ± 0,001	nw	nw	nw	nw	nw
Malv-3-O-(6-O-p-Coum)-5-diGlu	nw	nw	nw	0,025 ± 0,001	nw	nw	nw	nw	nw
Malv-3-O-(6-O-acetyl)-Glu	nw	nw	nw	0,061 ± 0,007	nw	nw	nw	nw	nw
Delph-3-O-(6-O-p-Coum)-Glu	nw	nw	nw	0,015 ± 0,002	nw	nw	nw	nw	nw
Pet- 3-O-(6-O-p-Coum)-Glu	nw	nw	nw	0,056 ± 0,003	nw	nw	nw	nw	nw
Malv-3-O-(6-O-p-Coum)-Glu	nw	nw	nw	0,031 ± 0,002	nw	nw	nw	nw	nw
Σ Antocyjanów [mg/g d.w]	**0**	**3,142 ± 0,074**	**0**	**0,962 ± 0,064**	**0**	**11,208 ±1,315**	**0**	**0,425 ± 0,023**	**1,529 ± 0,102**

Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD

Oznaczenia: Cy (cyjanidyna), Delph (delfinidyna), Pet (petunidyna), Peo (peonidyna), Malv (malwidyna), Samb (sambubiozyd), xyl (ksylozyl), Coum (kumaryl), acetyl (acetyl), Rut (rutynozyd), Glu (glukozyd), Soph (soforozyd), nw (nie wykryto), s.m (sucha masa)

W przypadku flawan-3-oli nie wykryto ich obecności w żółtej malinie, białych winogronach, białej morwie, i wszystkich odmianach porzeczek. Stosunkowo duża ich zawartość została oznaczona w białej i czarnej morwie oraz czerwonych winogronach, jednakże, jak pokazały profile uzyskane z użyciem derywatyzacji postkolumnowej, związki te nie wpływały istotnie na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z tych owoców.

Ostatnią oznaczaną grupą polifenoli były flawonole, wśród nich rutyna i kwercytyna, które obecne były we wszystkich badanych roślinach z wyjątkiem żółtej maliny i białej morwy. Związki te jednak występowały w niskich stężeniach i nie wpływały znacząco na aktywność przeciwutleniającą. Najbogatszym ich źródłem okazała się być czarna morwa (1,48 mg/g s.m).

Wyniki analizy składu i zawartości związków polifenolowych pozwoliły wyodrębnić 5 głównych grup tych związków obecnych w badanych owocach, tzn. pochodne kwasu hydroksybenzoesowego, pochodne kwasu hydroksycynamonowego, flawan-3-ole, flawonole i antocyjany. Na podstawie profili otrzymanych z użyciem derywatyzacji postkolumnowej określono, że z punktu widzenia aktywności przeciwutleniającej najistotniejszą z tych grup związków są antocyjany. Najbogatszym źródłem antocyjanów okazała się czarna odmiana morwy, która zawierała również najwięcej innych polifenoli, co potwierdza jej bogaty profil przeciwutleniaczy. Ciemne odmiany charakteryzowały się znacznie większą zawartością związków polifenolowych niż odmiany jasne.

III.3.3.5. Oznaczenie składu i zawartości związków z grupy polifenoli w ekstraktach kapust i kalafiorów

Analiza składu i zawartości związków z grupy polifenoli w ekstraktach białej (WCab) i czerwonej (RCab) odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora została przeprowadzona z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD-MS (Tab. 15) we współpracy z dr hab. inż. Wiesława Wiczkowskiego z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN. Identyfikacji związków z grupy antocyjanów dokonano na podstawie analizy czasów retencji oraz widm MS i MS/MS (Tab.14), natomiast w przypadku flawonoli i kwasów fenolowych ich identyfikację przeprowadzono na podstawie odpowiednich wzorców.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wyniki analizy ekstraktów z badanych warzyw kapustowatych wykazały, że spośród polifenoli grupą związków występujących w największej ilości w badanych roślinach są kwas fenolowe. Ich zawartość była znacząco większa niż zawartość pozostałych grup przeciwutleniaczy. Najbogatszym źródłem tych związków okazała się być czerwona odmiana kapusty (26,9 mg/g s.m.), następnie fioletowy kalafior (21,2 mg/g s.m.), biała kapusta (17,1 mg/g s.m.) i biały kalafior (13,5 mg/g s.m.). Spośród kwasów fenolowych, w największej ilości we wszystkich badanych warzywach występowały kwasy synapowy (89 - 885 μg/g m.m.), p-kumarynowy (16,8 - 819,3 μg/g m.m.) i wanilinowy (34,84 – 524,6 μg/g m.m.). Pomimo ich dużego stężenia, wspomniane kwasy fenolowe prawdopodobnie nie mają znaczącego wpływu na aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów, ze względu na swoją słabą rozpuszczalność w wodzie i stosunkowo wysoki potencjał redukcyjny, co potwierdzają profile przeciwutleniaczy otrzymane z użyciem derywatyzacji postkolumnowej.

Tabela. 14. Parametry chromatograficzne, spektrofotometryczne i spektroskopowe będące podstawą do identyfikacji związków z grupy polifenoli w kapustach i kalafiorach

Związek	**skrót**	**λ_{vis} [nm]**	**λ_{acyl} [nm]**	**E_{acyl}/E_{vis} [%]**	**MS [m/z]**	**MS/MS [m/z]**
Cyjanidyno-3-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-diGlu-5-Glu	513	X	X	773	611/449/287
Cyjanidyno-3-glukozyd-5-glukozyd	Cy-3-Glu-5-Glu	512	X	X	611	449/287
Cyjanidyno-3-(sinapinylo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Sin)-diGlu-5-Glu	527	330	56	979	817/449/287
Cyjanidyno-3-(sinapinylo)-triglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Sin)-triGlu-5-Glu	525	321	53	1141	979/449/287
Cyjanidyno-3-(kafeilo)(p-kumarylo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Caff)(*p*-Coum)-diGlu-5-Glu	521	314	95	1081	919/449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)-triglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)-triGlu-5-Glu	522	320	60	1111	949/449/287
Cyjanidyno-3-(sinapinylo)-triglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Sin)-triGlu-5-Glu	525	321	54	1141	979/449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)(feruilo)-triglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)(Fer)-triGlu-5-Glu	536	321	93	1287	1125/449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)-diGlu-5-Glu	522	328	60	949	787/449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)(sinapinylo)-triglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)(Sin)-triGlu-5-Glu	536	324	95	1317	1155/449/287
Cyjanidyno-3-(kafeilo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Caf)-diGlu-5-Glu	522	315	68	935	773/449/287
Cyjanidyno-3-(p-kumarylo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(*p*-Coum)-diGlu-5-Glu	521	312	69	919	757/449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)-diGlu-5-Glu	523	329	58	949	787/449/287
Cyjanidyno-3-(sinapinylo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Sin)-diGlu-5-Glu	526	328	59	979	817/449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)-glukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)-Glu-5-Glu	522	328	62	787	449/287
Cyjanidyno-3-(sinapinylo)-glukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Sin)-Glu-5-Glu	527	330	70	817	449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)(feruilo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)(Fer)-diGlu-5-Glu	535	328	101	1125	963/449/287
Cyjanidyno-3-(feruilo)(sinapinylo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Fer)(Sin)-diGlu-5-Glu	535	330	109	1155	993/449/287
Cyjanidyno-3-(sinapinylo)(sinapinylo)-diglukozyd-5-glukozyd	Cy-3-(Sin)(Sin)-diGlu-5-Glu	535	332	119	1185	1023/449/287
Cyjanidyno-3-diglukozyd-5(maloilo)-glukozyd	Cy-3-diGlu-5-(Mal)-Glu					
Cyjanidyno-3-(kumarylo)-diglukozyd-5-(maloilo)-glukozyd	Cy-3-(Coum)-diGlu-5-(Mal)-Glu					
Cyjanidyno-3-(kumarylo)(kafeilo)-glukozyd-5-(maloilo)-glukozyd	C-3-(Coum)(Caff)-Glu-5-(Mal)-Glu					
Cyjanidyno-3-(feruilo)(kafeilo)-glukozyd-5-(maloilo)-glukozyd	C-3-(Fer)(Caff)-Glu-5-(Mal)-Glu					

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Związki z grupy flawonoli występowały w badanych roślinach w najmniejszej ilości spośród badanych grup przeciwutleniaczy. Największa zawartość tych substancji została oznaczona dla fioletowego kalafiora, następnie czerwonej kapusty, białego kalafiora i białej kapusty.

Tabela 15 Skład i zawartość związków z grupy polifenoli w kapustach i kalafiorach oznaczone za pomocą HPLC

Związek	WCab	RCab	WCau	PCau
Kwasy fenolowe [µg/g s.m.]				
Ferulowy	115,30 ± 1,74	2768,48 ± 29,18	53,20 ± 0,15	2450,10 ± 16,40
Synapowy	405,62 ± 4,30	10067,37 ± 46,01	436,21 ± 1,84	555,84 ± 4,69
p-Kumarowy	304,96 ± 1,40	4518,52 ± 15,83	224,56 ± 1,38	9103,71 ± 32,49
Trans-cynamonowy	5,99 ± 0,03	11,38 ± 0,02	4,81 ± 0,03	7,54 ± 0,07
Chlorogenowy	3,81 ± 0,02	5,89 ± 0,01	3,76 ± 0,04	11,94 ± 0,04
Wanilinowy	745,85 ± 3,99	5961,13 ± 29,08	464,61 ± 4,88	1650,49 ± 5,37
Izowanilinowy	9,90 ± 0,05	16,72 ± 0,04	9,42 ± 0,11	15,11 ± 0,05
Kofeinowy	53,45 ± 0,32	650,41 ± 0,88	39,49 ± 0,37	2426,89 ± 54,43
Protokatechinowy	70,81 ± 0,12	2881,17 ± 15,59	111,27 ± 0,82	4931,97 ± 35,42
Σ Kwasów fenolowych	**1715,69 ± 7,69**	**26881,07 ± 41,76**	**1347,33 ± 8,99**	**21153,59 ± 97,20**
Flawonole [µg/g s.m.]				
Kwercytyna	5,69 ± 0,01	9,21 ± 0,05	8,51 ± 0,06	32,63 ± 0,08
Izoramnetyna	1,12 ± 0,02	1,94 ± 0,01	0,59 ± 0,01	4,59 ± 0,02
Kampferol	10,22 ± 0,06	15,43 ± 0,10	8,97 ± 0,02	13,06 ± 0,05
Σ Flawonoli	**17,02 ± 0,06**	**26,58 ± 0,07**	**18,07 ± 0,06**	**50,27 ± 0,06**
Antocyjany [µg/g s.m.]				
Cy-3-diGlu-5-Glu	nw	640,88 ± 8,39	nw	99,29 ± 5,23
Cy-3-Glu-5-Glu	nw	29,74 ± 3,19	nw	9,67 ± 0,60
Cy-3-(Sin)-diGlu-5-Glu	nw	83,02 ± 1,92	nw	nw
Cy-3-(Sin)-triGlu-5-Glu	nw	67,51 ± 1,01	nw	nw
Cy-3-(Caff)(*p*-Coum)-diGlu-5-Glu	nw	137,32 ± 3,88	nw	nw
Cy-3-(Fer)-triGlu-5-Glu	nw	65,02 ± 1,93	nw	nw
Cy-3-(Sin)-triGlu-5-Glu	nw	97,22 ± 3,44	nw	nw
Cy-3-(Fer)(Fer)-triGlu-5-Glu	nw	53,25 ± 1,46	nw	nw
Cy-3-(Fer)-diGlu-5-Glu	nw	31,55 ± 7,98	nw	nw
Cy-3-(Fer)(Sin)-triGlu-5-Glu	nw	47,88 ± 4,66	nw	nw
Cy-3-(Caf)-diGlu-5-Glu	nw	32,15 ± 0,63	nw	nw
Cy-3-(*p*-Coum)-diGlu-5-Glu	nw	921,49 ± 3,96	nw	179,84 ± 4,62
Cy-3-(Fer)-diGlu-5-Glu	nw	540,92 ± 16,48	nw	nw
Cy-3-(Sin)-diGlu-5-Glu	nw	852,24 ± 0,137	nw	nw
Cy-3-(Fer)-Glu-5-Glu	nw	23,05 ± 0,75	nw	nw
Cy-3-(Sin)-Glu-5-Glu	nw	57,12 ± 3,44	nw	nw
Cy-3-(Fer)(Fer)-diGlu-5-Glu	nw	404,03 ± 36,01	nw	nw
Cy-3-(Fer)(Sin)-diGlu-5-Glu	nw	316,87 ± 9,97	nw	nw
Cy-3-(Sin)(Sin)-diGlu-5-Glu	nw	582,87 ± 1,39	nw	nw
Cy-3-diGlu-5-(Mal)-Glu	nw	nw	nw	269,13 ± 5,73
Cy-3-(Coum)-diGlu-5-(Mal)-Glu	nw	nw	nw	63,23 ± 0,73
C-3-(Coum)(Caff)-Glu-5-(Mal)-Glu	nw	nw	nw	2790,10 ± 94,68
C-3-(Fer)(Caff)-Glu-5-(Mal)-Glu	nw	nw	nw	511,79 ± 8,18
Σ Antocyjanów	**nw**	**4984,13 ± 101,62**	**nw**	**3923,05 ± 112,97**

*Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych powtórzeń ± SD

**Skróty nazw chemicznych: Caff, Kawoilo; Coum, kumarylo; Cy, cyjanidyna; Fer, ferulo; Glu, glukozyd; Sin, synapylo, nw – nie wykryto

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Przeprowadzona analiza wykazała, że czerwona kapusta i fioletowy kalafior różnią się nie tylko zawartością związków z grupy antocyjanów, ale również ich profilem. Zidentyfikowane antocyjany występowały w formie związanej z różnymi kwasami hydroksycynamonowymi, m.in. p-kumarynowym, kawowym i ferulowym. Najbogatszym źródłem antocyjanów spośród badanych warzyw okazała się czerwona kapusta (49,8 mg/g s.m.). Zidentyfikowano w niej 19 różnych związków z tej grupy, wśród których 3-(ferulo)-diglukozydo-5-glukozyd cyjanidyny oraz 3-(synapyl)(synapyl)-diglukozydo-5-glukozyd cyjanidyny wystepowały w największej ilości. Zawartość i skład antocyjanów w czerwonej kapuście był porównywalny z danymi literaturowymi (Wiczkowski i in., 2013; Arapitsas, 2008; Park, 2014).

W porównaniu z czerwoną kapustą, różnorodność antocyjanów w fioletowym kalafiorze jest znacznie mniejsza (zidentyfikowano 7 różnych cyjanidyn), jednakże całkowita zawartość antocyjanów nie była dużo niższa (39,23 mg/g s.m.). Spośród tych związków 3-(kumarylo)(kawoilo)-glukozydo-5-(malonylo)-glukozyd cyjanidyny wystepował w największej ilości (25,1 μg/g f.w.). Uzyskane wyniki były porównywalne z danymi literaturowymi (Li i in., 2012).

III.3.3.6. Aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów roślinnych

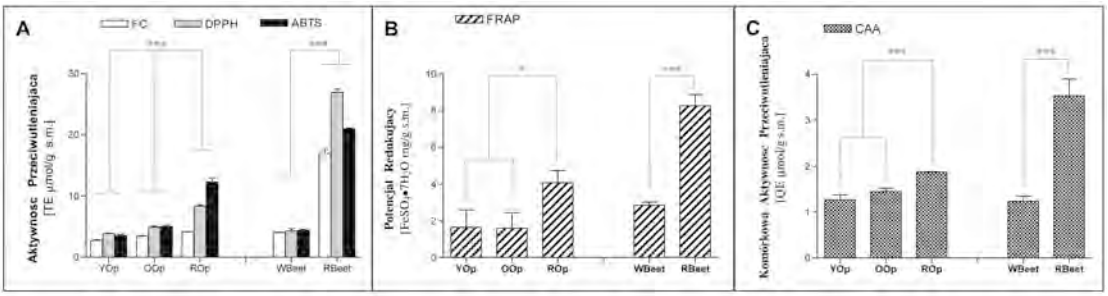
Aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów roślinnych została oznaczona w warunkach *in vitro* za pomocą standardowych testów spektrofotometrycznych (ABTS, FC, DPPH, FRAP) oraz w modelu komórkowym z użyciem testu CAA (ang. Cellular Antioxidant Activity). Zastosowanie kilku różnych metod w celu oznaczenia potencjału przeciwutleniającego jest wskazane ze względu na różną specyficzność substratową stosowanych metod. Testy ABTS i DPPH badają zdolność przeciwutleniaczy do wyłapywania wolnych rodników, jednakże DPPH jest bardziej specyficzny w stosunku do związków o charakterze lipofilowym, a ABTS – hydrofilowym. Test FC (od użytego odczynnika Folin-Ciacalteu) jest dedykowany do oznaczania tzw. Aktywnych grup hydroksylowych, a więc przede wszystkim związków fenolowych i witaminy C. W teście FRAP (od ang. Ferric Reducing Antioxidant Power) istotne znaczenie ma stopień hydroksylacji przeciwutleniaczy jak również ich zdolność do chelatowania jonów metali. Wszystkie powyższe testy są szeroko wykorzystywane do oceny potencjału antyoksydacyjnego w badaniach żywności, jednakże żaden w nich nie odwzorowuje warunków fizjologicznych.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Nie biorą pod uwagę metabolizmu i biodostępności badanych substancji, dlatego też wnioskowanie na temat ich aktywności przeciwutleniającejw organizmie na podstawie wyników uzyskanych z użyciem tych metod jest często kwestionowane. Z tego względu proponowane jest stosowanie dla porównania testu CAA, który służy do badania aktywności przeciwutleniającej wewnątrz żywej komórki, dzięki czemu bierze pod uwagę wszystkie wspomniane zjawiska, które są pomijane w przypadku testów czysto chemicznych. W przypadku wielu przeciwutleniaczy obserwuje się znaczące różnice oznaczonej aktywności antyoksydacyjnej w warunkach komórkowych i *in vitro*.

III.3.3.6.1. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z opuncji i buraków

Porównanie aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów z opuncji i buraków za pomocą standardowych metod spektrofotometrycznych (ABTS, DPPH i FC), wykazało iż w przypadku wszystkich tych testów najwyższą aktywnością charakteryzował się czerwony burak (RBeet) (Rys. 27A). Porównanie struktur chemicznych betalain obecnych w próbkach wyjaśnia najwyższą aktywność tego ekstraktu. Zawierał on bowiem największą ilość betaniny i izobetaniny, które w swojej strukturze zawierają najwięcej gryp hydroksylowych ze wszystkich betalain, co wpływa na wyniki nie tylko testu FC, ale również testu FRAP.



Rys. 27. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) odmiany opuncji figowej oraz białej (WBeet) i czerwonej (RBeet) odmiany buraka oznaczona za pomocą standardowych testów spektrofotometrycznych (FC, DPPH i ABTS) (A), testu FRAP (B) oraz komórkowego testu CAA (C). Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech pomiarów ± SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testu T-studenta: * p<0,05,;** p<0,01; *** p<0,001

Zastanawiająca jest stosunkowo duża aktywność przeciwutleniająca wykazana przez białą odmianę buraka, może być ona wynikiem obecności cukrów redukujących. Na aktywność przeciwutleniającą opuncji oprócz betalain miała również wpływ obecna w ekstraktach witamina C. Można to zaobserwować na podstawie wyników uzyskanych w testach spektrofotometrycznych w zestawieniu z wynikami zawartości betalain i witaminy C. Gdyby na aktywność przeciwutleniającą wpływały tylko betalainy to

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

pomarańczowa a nie czerwona odmiana wykazywałaby najwyższą aktywność. Uzyskane wyniki są zgodne z tymi uzyskanymi dla różnych odmian opuncji przez Stintzinga i in. (2002), którzy udowodnili związek pomiędzy zawartością betalain a aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów z opuncji. W teście FRAP (Rys. 27B) również najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazał burak czerwony, następnie czerwona opuncja, ale biały burak wykazał wyższą aktywność niż pomarańczowa i żółta opuncja (Phisut i Jiraporn, 2013).

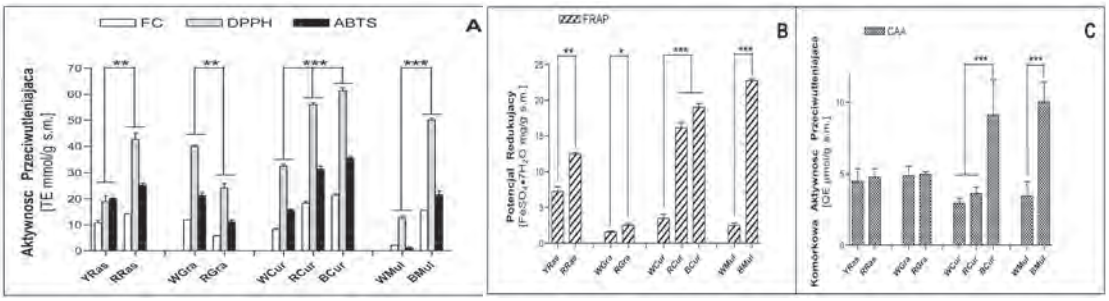
Pomimo różnic w wartościach aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów uzyskanej za pomocą różnych testów, wykazały one silną korelację (współczynnik Pearson'a 0,906 – 0,996). Czerwony burak, którego ekstrakt miał największą aktywność przeciwutleniającą we wszystkich testach znajduje się na liście warzyw o największej aktywności przeciwutleniającej (Vinson, i in. 1998), a jego potencjał przeciwutleniający pochodzi w większości od betaniny i izobetaniny.

W przypadku testu CAA (28C) również zauważalne są wyraźne różnice między odmianami jasnymi i ciemnymi badanych roślin. Najwyższą aktywnością tak jak w pozostałych testach charakteryzował się burak czerwony, kolejna była czerwona odmiana opuncji, a następnie odmiany pomarańczowa i żółta, najniższą aktywność, podobnie jak w przypadku testów spektrofotometrycznych, wykazywał burak biały. Również w przypadku testu CAA widać silną korelację pomiędzy wynikami tego testu a wynikami pozostałych oznaczeń przeprowadzonych w systemach bezkomórkowych (współczynniki Pearsona w zakresie 0,97-0,99).

III.3.3.6.2. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z malin, winogron, morw i porzeczek

Porównanie aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów roślinnych zawierających lub nie związki z grupy antocyjanów (Rys. 28) wykazało, że w tym przypadku, w przeciwieństwie do uprzednio omówionych roślin zawierających betalainy, nie można zaobserwować wyraźnej korelacji pomiędzy tą aktywności określoną przy użyciu testów chemicznych a oznaczoną z użyciem testu CAA, co może wynikać ze stusunkowo mniejszej biodostępności antocyjanów w porównaniu z betalainami.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



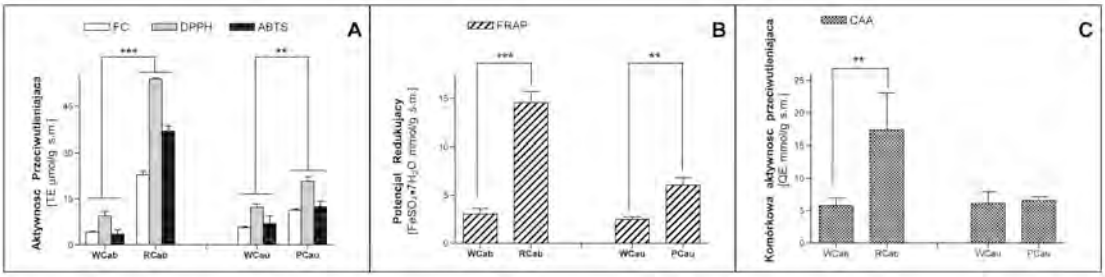
Rys. 28. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) odmiany maliny, białej (WGra) i czerwonej (RGra) odmiany winogron, białej (WMul) i czarnej (BMul) odmiany morwy oraz białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) odmiany porzeczki oznaczona za pomocą standardowych testów spektrofotometrycznych (FC, DPPH i ABTS) (A), testu FRAP (B) oraz komórkowego testu CAA (C). Wyniki są średnią z 3 pomiarów ± SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testu T-studenta: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Ponadto analiza profili przeciwutleniaczy wykonana z użyciem techniki postkolumnowej derywatyzacji odczynnikiem ABTS pozwoliła na oszacowanie udziału związków z grupy antocyjanów w końcowej aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów. W przypadku czerwonych malin udział ten wynosił 56 %, w przypadku czerwonych winogron – 49 %, czerwonych porzeczek – 22 %, czarnych porzeczek – 33 %, a w przypadku morwy aż 62 %. Porzeczki i maliny oprócz antocyjanów zawierają też znaczną ilość witaminy C, która jako silny przeciwutleniacz wpływa znacząco na wykazywaną przez te ekstrakty aktywność antyoksydacyjną, przynajmniej w przypadku testów chemicznych. Widać to szczególnie w przypadku białych winogron, które wykazują wyższą aktywność przeciwutleniającą w testach chemicznych (poza FRAP) od zawierających antocyjany czerwonych winogron.

III.3.3.6.3. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z kapust i kalafiorów

Porównanie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z roślin z grupy *Brassica,* które zawierają lub nie związki z grupy antocyjanów oznaczonej za pomocą standardowych metod chemicznych (ABTS, DPPH, FC, FRAP) oraz z użyciem testu biologicznego CAA wykazało silny związek pomiędzy tymi wynikami (Rys. 29). Współczynniki Pearsona wynosiły od 0,950 (FC:CAA) do 0,983 (DPPH:CAA). Tak jak w przypadku betalain, silna korelacja pomiędzy aktywnością przeciwutleniająca oznaczoną z użyciem metod chemicznych i biologicznych może świadczyć o stosunkowo wysokiej biodostępności tych związków. Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą wśród badanych próbek charakteryzowała się czerwona kapusta, następnie kalafior fioletowy i kolejno biała kapusta i kalafior.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 30. Porównanie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z białej (WCab) i czerwonej (RCab) odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora oznaczonej za pomocą standardowych testów spektrofotometrycznych (FC, DPPH i ABTS) (A), testu FRAP (B) oraz komórkowego testu CAA (C). Wyniki są średnią z trzech pomiarów ± SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testu T-studenta: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Podobnie jak w przypadku ekstraktów z roślin zawierających związki z grupy betalain, również w tej grupie próbek zaobserwowano wyraźne zależności pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą oraz składem jasnych i ciemnych odmian danej rośliny. Jasne odmiany kapusty i kalafiora w testach chemicznych wykazywały się niższą aktywnością przeciwutleniającą od odmian ciemnych, co dało wynik zgodny z oczekiwanym, jako że odmiany ciemne zawierają znaczne ilości związków z grupy antocyjanów. Różnice te w przypadku kapust były także obserwowane w teście komórkowym CAA, w którym aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z fioletowego kalafiora nie różniła się wyraźnie od aktywności ekstraktu z odmiany białej.

III.3.3.7. Oznaczenie skład i zawartości związków z grupy glukozynolanów (GLS) oraz produktów ich rozpadu (ITC i indoli) w kapustach i kalafiorach

Rośliny z rodziny *Brassicaceae* oprócz związków z grupy polifenoli zawierają także inną charakterystyczną grupę biologicznie aktywnych fitozwiązków – glukozynolany (GLS). Aktywność biologiczna nie jest jednak przypisywana glukozynolanom *per se*, ale produktom ich rozpadu, szczególnie izotiocyjanianom (ITC) i indolom (Piekarska i in. 2014).

Ponieważ substancje te mogą bardzo znacząco modyfikować aktywność biologiczną przeciwutleniaczy fenolowych wykonane zostały oznaczenia ich zawartości w badanych odmianach kapust i kalafiorów. Skład glukozynolanów w odmianach kapust i kalafiorów okazał się być podobny, z wyjątkiem epiprogoitryny (ePRO) i glukonapiny (GNA), które zostały wykryte tylko w ekstraktach z kapust (Tab. 14).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela 14. Skład i zawartość GLs, ITC i indoli w próbkach białej (WCab) i czerwonej (RCab) odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora.

	Związek	Skrót	WCab	RCab	WCau	PCau
***Glukozynolany [µmol/g d,w,]**						
1	Glukoiberyna	GIB	0,949 ± 0,097	0,031 ± 0,013	0,755 ± 0,119	0,475 ± 0,116
2	Progoitryna	PRO	0,331 ± 0,050	0,636 ± 0,115	0,029 ± 0,005	0,170 ± 0,014
3 prekursory ITC	Epiprogoitryna	ePRO	0,034 ± 0,003	0,022 ± 0,002	nw	nw
4 prekursory ITC	Glukorafanina/Sinigryna	GRA/SIN	3,122 ± 0,369	0,326 ± 0,044	0,277 ± 0,053	2,010 ± 0,111
5 prekursory ITC	Glukonapina	GNA	0,137 ± 0,014	0,862 ± 0,087	nw	nw
6 prekursory ITC	Glukoiberweryna	GIV	0,081 ± 0,004	0,704 ± 0,114	0,984 ± 0,098	1,671 ± 0,035
7 prekursory ITC	Desulfoglukonasturcyna	GST	0,147 ± 0,004	0,048 ± 0,013	0,252 ± 0,063	0,279 ± 0,097
8 prekursory indoli	Glukobrassycyna	GBS	0,570 ± 0,036	0,235 ± 0,043	0,136 ± 0,030	0,255 ± 0,016
9 prekursory indoli	Metoksyglukobrassycyna	meGBS	0,202 ± 0,093	0,138 ± 0,022	0,068 ± 0,020	0,178 ± 0,012
10 prekursory indoli	Neoglukobrassycyna	neoGBS	0,127 ± 0,023	0,085 ± 0,025	0,131 ± 0,045	0,162 ± 0,039
Σ GLs			**5,701 ± 0,438**	**3,087 ± 0,101**	**2,633 ± 0,023**	**5,202 ± 0,592**
Izotiocyjaniany [µmol/g d,w,]						
źródłowy GLs						
GIB	3-(Metylsulfinyl)propyl	3-MSP	0,297 ± 0,036	nw	0,094 ± 0,006	0,216 ± 0,019
GRA	4-(Metylsulfinyl)butyl	SFN	0,179 ± 0,008	0,071 ± 0,006	nw	0,051 ± 0,002
SIN	2-Propenyl	AITC	0,259 ± 0,019	nw	0,070 ± 0,003	0,272 ± 0,009
GIV	3-(Metyltio)-propyl	3-MTP	0,018 ± 0,001	nw	nw	nw
Σ ITC			**0,752 ± 0,046**	**0,071 ± 0,006**	**0,164 ± 0,008**	**0,539 ± 0,022**
Całkowite ITC (metoda Zhanga)			**1,028 ± 0,083**	**0,075 ± 0,003**	**0,191 ± 0,009**	**0,533 ± 0,039**
Indole [nmol/g s,m,]						
źródłowy GLs						
GBS	Indolo-3-karbinol	I3C	44,830 ± 5,527	8,236 ± 0,717	8,993 ± 0,475	7,195 ± 0,071
GBS	Kwas indolo-3-octowy	I3AA	10,478 ± 0,521	2,506 ± 0,256	4,367 ± 0,239	3,891 ± 0,078
GBS	Indolo-3-acetonitryl	I3ACN	81,739 ± 7,462	9,934 ± 0,305	48,086 ± 0,394	34,537 ± 4,329
GBS	Dimer 3,3′-diindolylometanu	DIM	19,710 ± 2,014	0,429 ± 0,033	0,441 ± 0,003	0,395 ± 0,004
Σ indoli			**156,761 ± 4,516**	**21,105 ± 1,302**	**61,887 ±1,071**	**46,018 ± 4,249**

Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych oznaczeń ± SD

Najbogatszym źródłem GLS okazała się być kapusta biała, w której najwięcej było glukoiberyny (GIB – 17 % całkowitej zawartości GLS), glukobrassycyny (GBS, 10 %), glukorafaniny i sinigryny (GRA i SIN, 55 %). Zawartość tych dwóch związków (3,122 μmol/g s.m.) została podana jako suma, gdyż w podanych warunkach analizy nie ulegały one pełnemu rozdzieleniu. Czerwona odmiana kapusty zawierała mniej GLS niż biała; związki z tej grupy, które występowały w największej ilości to: progoitryna (PRO, 20 %), glukonapina (GNA, 28 %) i glukoiberweryna (GIV, 23 %). Według danych literaturowych całkowita zawartość GLS w różnych odmianach kapusty jest na podobnym poziomie: 5,18 μmol/g s.m. dla kapusty białej i 4,22 μmol/g s.m. dla kapusty czerwonej (Kusznierewicz, i in. 2013). Biały kalafior okazał sie najuboższym źródłem GLS spośród badanych roślin kapustowatych. W największych ilościach występowały w nim GIB i GIV, odpowiednio 29 % i 37 % wszystkich GLS. Według danych literaturowych kalafior zawiera około 5,49 μmol/g s.m. (Kusznierewicz i in., 2013). Kalafior fioletowy (PCau) zawierał najwięcej GRA i SIN (39 %) oraz GIV (31 %). Glukozynolany ulegają hydrolizie enzymatycznej do szeregu pochodnych (Rozdział II.5., Rys.7), zatem można oczekiwać, że zawartość ITC i indoli w badanych ekstraktach będzie niższa niż związków z których powstają. Najbardziej efektywną konwersję GLS do ITC i indoli zaobserwowano dla białej kapusty (15 % dla ITC, 17 % dla indoli). Ta roślina okazała się również najbogatszym źródłem tych związków. Stopień konwersji GLs do wspomnianych pochodnych dla czerwonej kapusty jest znacznie niższy (odpowiednio 3 % i 5 %) W czerwonej kapuście, która okazała się najuboższym źródłem ITC spośród badanych roślin kapustowatych (Tab. 14), jedynym zidentyfikowanym ITC był znany ze swej silnej aktywności chemoprewencyjnej sulforafan (SFN). W przypadku obu odmian kalafiora stopień konwersji GLs był stosunkowo niski dla białego kalafiora – 7 % ITC i 18 % indole, a dla fioletowego – 12 % ITC i 8 % indole.

ITC stanowią jedną z najbardziej chemoprewencyjnie aktywnych grup fitozwiązków Udowodniono ich zdolność do przeciwdziałania powstawaniu różnych typów nowotworów (płuc, sutka, wątroby, jelita, pęcherza) głównie ze względu na ich zdolność do stymulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za kodowanie enzymów detoksykacyjnych będących pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz genów powiązanych ze stanami zapalnymi kontrolowanych przez czynnik transkrypcyjny NF-κB (Manchali i in., 2012). Obecność ITC w ekstraktach z badanych warzyw kapustowatych może się w związku z tym uwidocznić w badaniach biologicznych.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Z grupy indoli związkiem występującym w największej ilości we wszystkich badanych roślinach okazał się być indolo-3-acetonitryl (I3ACN), który też jest ważnym czynnikiem chemoprewencyjnym (Tab. 14), gdyż podobnie jak izotiocyjaniany wykazuje zdolność do indukcji enzymów II fazy detoksykacji (Manchali i in., 2012). Również pozostałe indole (I3C, DIM) mają zdolność do indukcji enzymów detoksykacyjnych, zahamowania cyklu komórkowego, indukcji apoptozy, spowalniania kancerogenezy (Chen, i in. 2014). Kwas indolo-3-octowy (I3AA) odgrywa natomiast ważną rolę w neutralizowaniu RFT, może więc podobnie do polifenoli hamować stres oksydacyjny (López-Otín, i in. 2013).

III.3.4. Aktywność biologiczna ekstraktów z badanych roślin

III.3.4.1. Oznaczenie zdolności badanych ekstraktów roślinnych do hamowania wzrostu komórek rakowych

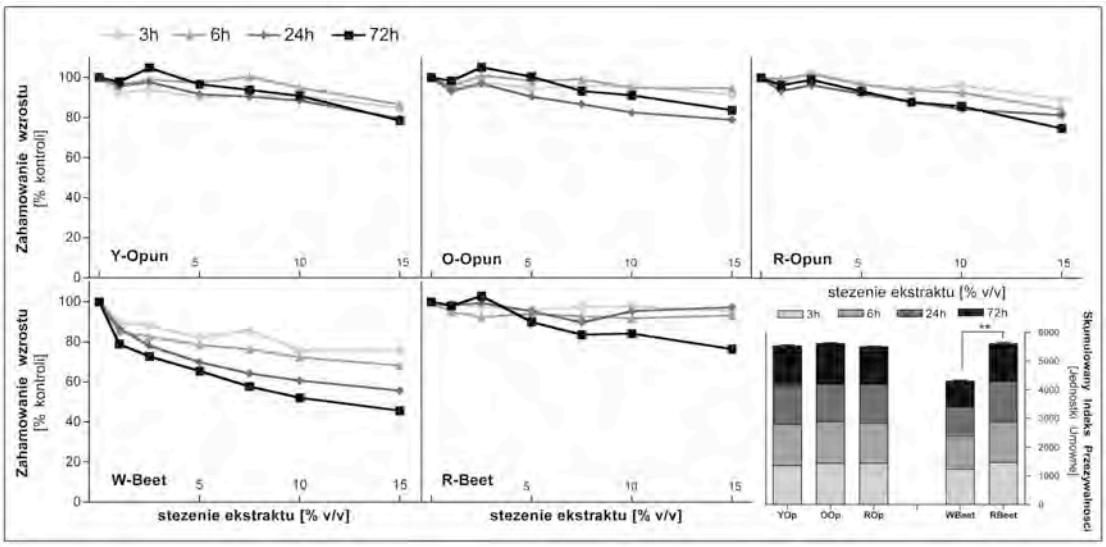
III.3.4.1.1. Zdolność ekstraktów z opuncji figowej i buraków do zahamowania wzrostu komórek HT29

Zdolność do hamowania wzrostu komórek rakowych jest często uważana za cechę potwierdzającą chemoprewencyjne właściwości bioaktywnych fitozwiązków. W niniejszej pracy zbadana została ta zdolność dla badanych ekstraktów roślinnych w modelu komórek ludzkiego raka jelita grubego HT29. W celu liczbowego porównania tego efektu zastosowano parametr "Skumulowany Indeks Przeżywalności" (SIP), który obliczany był na drodze sumowania pól powierzchni pod wykresami przeżywalności.

Spośród badanych ekstraktów opuncji i buraków najwyższą zdolność do hamowania wzrostu komórek HT29 wykazał ekstrakt z białego buraka (Rys. 30). Fakt, iż czerwony burak mimo podobnego składu substancji odżywczych nie wykazywał znaczącego efektu cytotoksycznego może wskazywać, że albo biała odmiana zawierała substancje działające toksycznie na komórki, albo odmiana czerwona zawierała substancje, które mogą działać na te komórki ochronnie. Ponieważ komórki nowotworowe ze względu na przyspieszony metabolizm są szczególnie narażone na działanie endogennych RFT, obecność betalain mogłaby obniżać zagrożenie stresem oksydacyjnym. Zhou i in, w swojej publikacji pokazali, ze ekstrakty oraz soki z opuncji figowej wykazują zdolność do hamowania wzrostu komórek.oraz indukcji procesu apoptozy, zahamowania cyklu komórkowego, a także modulacji

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

ekspresji genów odpowiedzialnych za hamowanie wzrostu guza (Zhou i in., 2014), jednakże uzyskane przeze mnie wyniki nie potwierdziły tych badań.



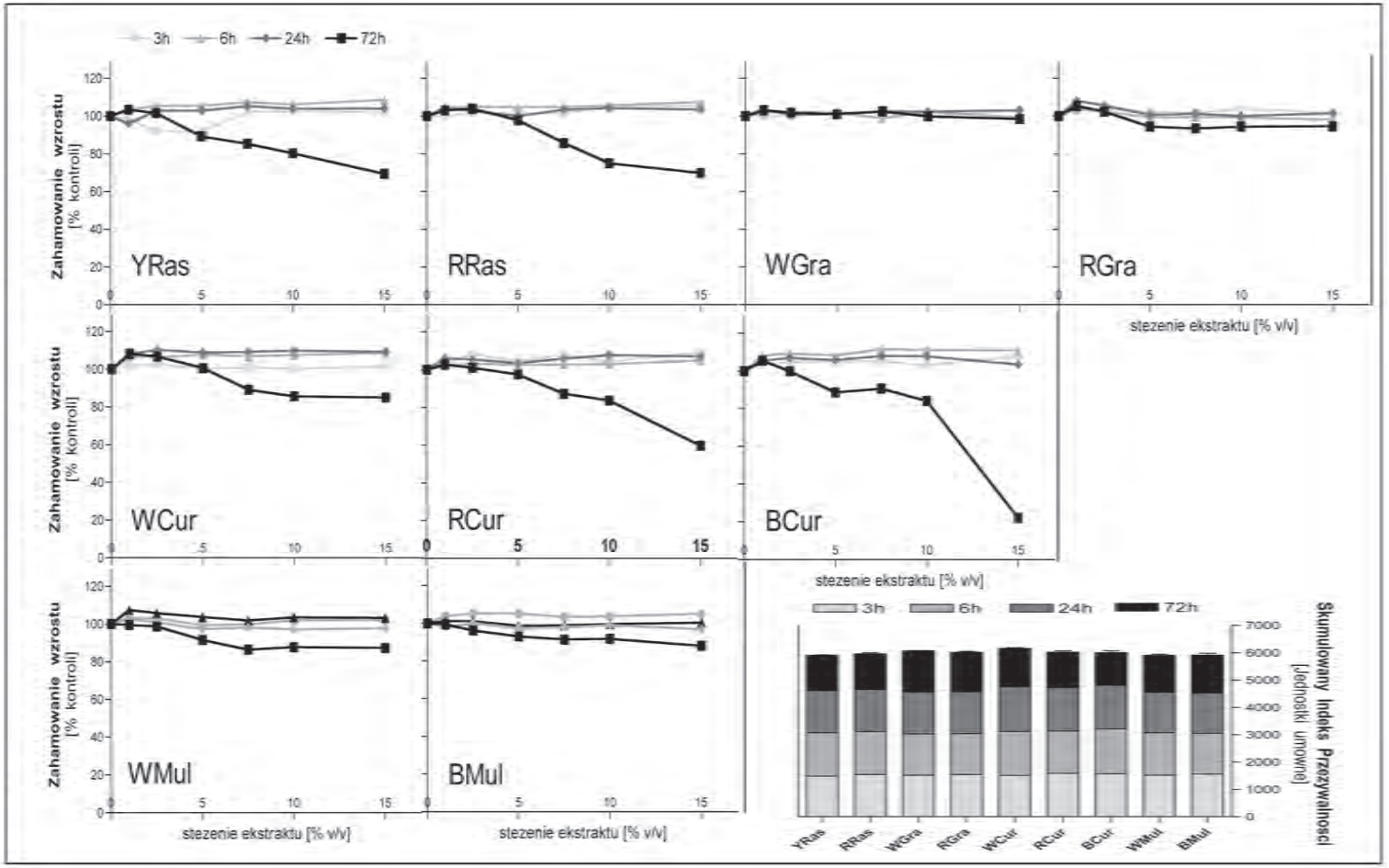
Rys 30. Porównanie zdolności do hamowania wzrostu komórek raka jelita grubego HT29 przez ekstrakty z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) odmiany opuncji figowej oraz białej (WBeet) i czerwonej (RBeet) odmiany buraka w wyniku 3, 6, 24 lub 72 h inkubacji, oznaczonej za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testu T-studenta: ** $p<0,01$

III.3.4.1.2. Zdolność ekstraktów z malin, winogron, morw i porzeczek do hamowania wzrostu komórek HT29

W przypadku ekstraktów z żółtych (YRas) i czerwonych (RRas) malin, białych (Wgra) i czerwonych (RGra) winogron, białej (WMul) i czarnej (BMul) morwy oraz białych (WCur), czerwonych (RCur) i czarnych (BCur) porzeczek wyniki badań zdolności do zahamowania wzrostu komórek HT29 dla 3, 6, i 24 h traktowania komórek ekstraktami wyglądają podobnie jak w przypadku opuncji. Istnieją liczne dane literaturowe mówiące o właściwościach cytotoksycznych związków z grupy polifenoli w postaci oczyszczonej. Jednakże wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań (Rys. 31) nie wskazują, aby którykolwiek z badanych ekstraktów był zdolny do statystycznie istotnego zahamowania wzrostu tych komórek. Dla najdłuższego 72-godzinnego traktowania komórek ekstraktami z owoców zawierających witaminę C (maliny i porzeczki) obserwowano pewien poziom zahamowania wzrostu komórek. Jednakże analiza statystyczna Skumulowanego Indeksu Przeżywalności nie wykazała znaczących różnic w cytotoksyczności badanych próbek.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

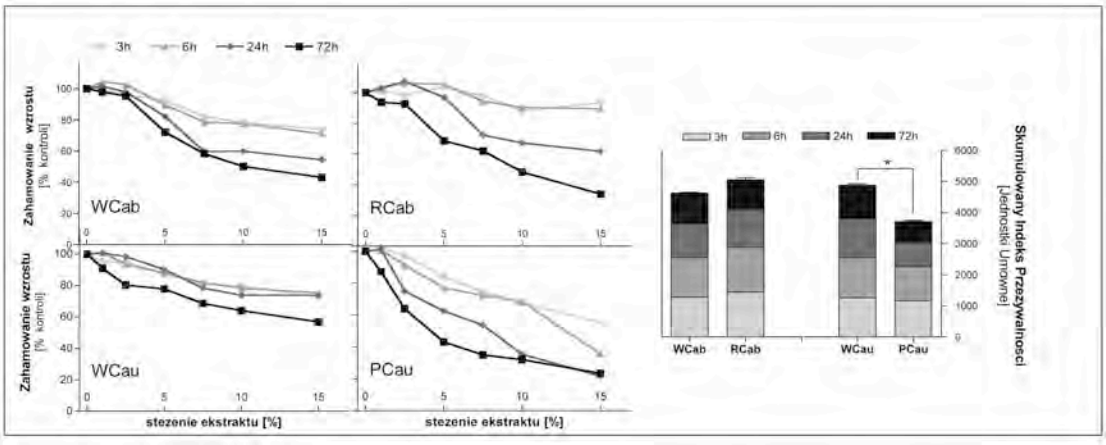


Rys. 31. Porównanie zdolności do hamowania wzrostu komórek raka jelita grubego HT29 przez ekstrakty z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) odmiany malin, białej (WGra) i czerwonej (RGra) odmiany winogron, białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) odmiany porzeczek oraz białej (WMul) i czarnej (BMul) odmiany morwy w wyniku 3, 6, 24 i 72 h inkubacji oznaczone za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów

Nie zaobserwowano różnic pomiędzy odmianami o odmiennej pigmentacji danego gatunku rośliny, ani nawet pomiędzy roślinami różnych gatunków. Może to oznaczać, podobnie jak w przypadku ekstraktów z opuncji i buraków, że inkubacja z badanymi ekstraktami nie tylko nie wywołała efektu cytotoksycznego, ale wręcz ochroniła komórki przez skutkami endogennego stresu oksydacyjnego na który mogły być one narażone.

III.3.4.1.3. Zdolność ekstraktów z kapust i kalafiorów do hamowania wzrostu komórek HT29

Odmienny wpływ na wzrost komórek HT29 zaobserwowano w przypadku ekstraktów z warzyw kapustowatych. Ze względu na obecność w roślinach z rodziny *Brassicaceae* fitozwiązków o silnych właściwościach biologicznych takich jak indole i izotiocyjaniany rośliny te od dawna uważane są za jedne z najbardziej obiecujących składników żywności w chemoprewencji chorób cywilizacyjnych. Można zauważyć że w porównaniu z pozostałymi ekstraktami roślinnymi, ekstrakty z kapust i kalafiorów rzeczywiście wykazują silniejsze działanie cytotoksyczne w stosunku do badanej linii komórkowej. Obliczone dla nich Skumulowane Indeksy Przeżywalności były o co najmniej 20 % niższe od wyznaczonych dla ekstraktów z pozostałych roślin badanych.



Rys 32. Porównanie zdolności do hamowania wzrostu komórek raka jelita grubego HT29 przez ekstrakty z białej (WCab) i czerwonej (RCab) odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora w wyniku 3, 6, 24 i 72 h inkubacji oznaczonej za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testy T-studenta: * $p<0,05$

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Największą zdolność do hamowania wzrostu komórek wykazał ekstrakt z fioletowego kalafiora, następnie z białej kapusty, białego kalafiora i czerwonej kapusty (Rys. 32). Zestawienie aktywności cytotoksycznej z badanych ekstraktów z zawartością poszczególnych grup bioaktywnych metabolitów wtórnych nie pozwoliło jednoznacznie określić, które z nich są odpowiedzialne za tę aktywność. Różniece pomiędzy efektem cytotoksycznym wywołanym przez białą i czerwoną odmianę kapusty nie są statystycznie istotne chociaż różnice w zawartościach bioaktywnych fitozwiązków w przypadku tych roślin są znaczące. Pomimo, że badane ekstrakty z warzyw kapustowatych zawierały ITC i indole, które mogą hamować wzrost komórek, nie sposób zauważyć prostą zależność, bowiem najbardziej cytotoksyczny ekstrakt z fioletowego kalafiora zawierał dwukrotnie niższe stężenia obu tych rodzajów produktów rozpadu GLS niż ekstrakt z białej kapusty.

III.3.4.2. Genotoksyczność ekstraktów roślinnych oraz ich zdolność do ochrony DNA przed stresem oksydacyjnym

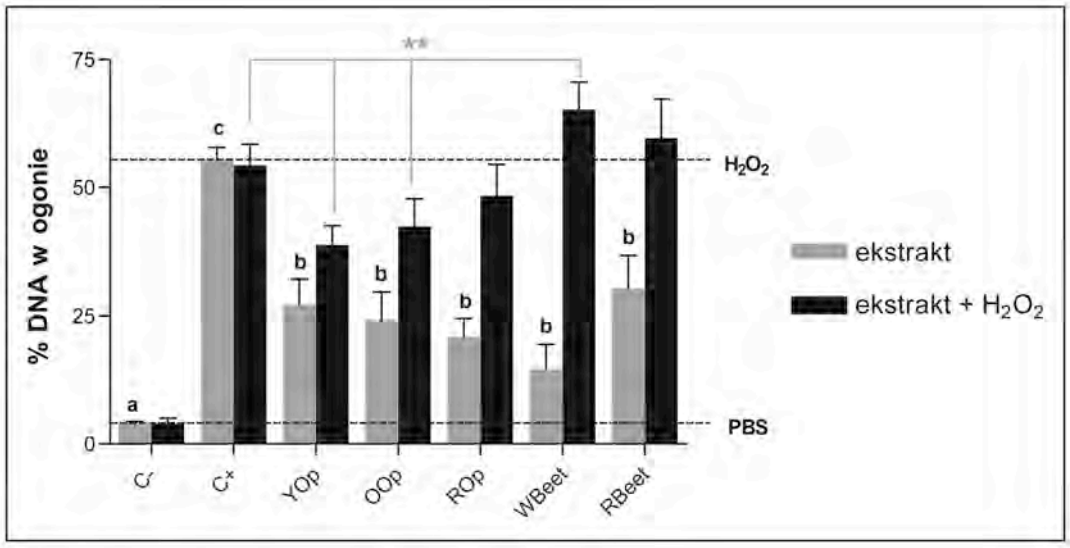
Jak już wspomniano, ograniczenia w interpretacji wyników uzyskanych z użyciem metod chemicznych do oznaczania aktywności przeciwutleniającej sprawiły, że rozpoczęto poszukiwania innych podejść, które zapewniłyby możliwość uzyskania wyników lepiej odzwierciedlających działanie przeciwutleniaczy w komórkach i co a tym idzie żywych organizmach. Jedną z pierwszych metod zaproponowanych do oceny wpływu przeciwutleniaczy na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach był tzw. test kometowy (elektroforeza pojedynczych komórek w żelu agarozowym). Test ten oryginalnie służący do wykrywania fragmentacji jądrowego DNA, po odpowiednich modyfikacjach pozwala śledzić ochronny efekt działania przeciwutleniaczy. W tym przypadku, w komórkach traktowanych czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny, co może skutkować indukcją uszkodzeń nici DNA, obserwuje się zmniejszenie fragmentacji (ogona komety) w obecności substancji przeciwutleniającej (Klaude, 1996 i in.; Rahman, i in. 2012). Przeprowadzenie badań z użyciem testu kometowego prowadzi do uzyskania wyników, które mogą być źródłem informacji czy dana substancja ma zdolność do wywoływania uszkodzeń DNA lub przeciwdziałania genotoksycznym uszkodzeniom wywołanym przez RFT. Uzyskane wyniki nie stanowią jednak podstawy do ilościowej oceny aktywności przeciwutleniającej różnych próbek

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

czy też jednoznacznego stwierdzenia czy ochronne działanie wynikało z neutralizacji prooksydantów, czy też np. z indukcji naprawy DNA (Klaude, i in.1996).

III.3.4.2.1. Genotoksyczność ekstraktów z opuncji i buraków oraz ich zdolność do ochrony DNA przed stresem oksydacyjnym

Wyniki testu kometowego udowodniły, że w warunkach doświadczenia ekstrakty z opuncji i buraka wykazują zdolność do wywoływania uszkodzeń DNA komórek HT29 (Rys. 33). Spośród tej grupy największą aktywność genotoksyczną posiadał ekstrakt z czerwonego buraka. Jak pokazała analiza HPLC ekstrakt ten charakteryzował się najwyższą zawartością związków z grupy betalain – głównie betaniny, która ma udowodnione działanie genotoksyczne.



Rys. 33. Zdolność badanych ekstraktów roślinnych do ochrony DNA komórek HT29 przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem H_2O_2. Oznaczenia stosowane na rysunku: Kontrola negatywna (C-) - jądra komórek nietraktowanych ani H_2O_2 ani badanymi ekstraktami; Kontrola pozytywna (C+) - jądra komórek traktowanych czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny; jądra komórek traktowanych ekstraktami z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) odmiany opuncji figowej oraz białej (WBeet) i czerwonej (RBeet) odmiany buraka (słupki szare), oraz jądra komórek traktowanych ekstraktami oraz H_2O_2 (słupki czarne). Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ±SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testu T-studenta: ** $p<0,01$

Autorzy poprzednich badań sugerowali, że zwiększenie poziomu fragmentacji DNA przez betaninę może wynikać z aktywacji enzymów naprawczych, które w trakcie naprawy uszkodzonego DNA powodują powstawanie pęknięć nici (Zielińska-Przyjemska, i in. 2012; Zielińska Przyjemska, i in. 2016). Innym potencjalnym wyjaśnieniem tej sytuacji może być działanie prooksydatywne betaniny w obecności

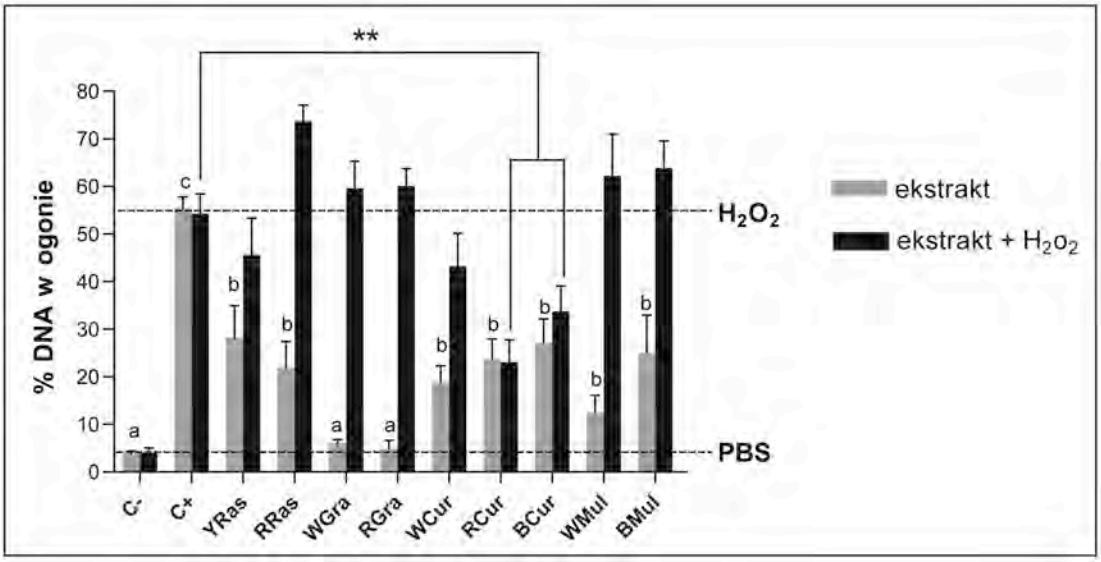
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

jonów metali, które prowadzi do powstawania uszkodzeń DNA (Hadi i in., 2010). Działanie to nie wydaje się być bardzo niebezpieczne dla użytych komórek raka jelita grubego HT29, ponieważ ekstrakt ten nie był cytotoksyczny.

Porównanie zdolności badanych ekstraktów roślinnych bogatych w związki z grupy betalain do ochrony DNA przed uszkodzeniami wywołanymi RFT (Rys. 33) wykazało, że wszystkie 3 ekstrakty z opuncji, niezależnie od zawartości betalain wykazują zbliżoną zdolność do ochrony DNA. Różnice w stopniu uszkodzeń w porównaniu z kontrolą pozytywną wykazały statystycznie istotne zmniejszenie fragmentacji w wyniku inkubacji z badanymi ekstraktami z opuncji, podczas gdy w przypadku buraka raczej wzmocnienie efektu genotoksycznego H_2O_2 zostało zaobserwowane. Biorąc pod uwagę wyniki tego eksperymentu oraz wyniki analizy HPLC z derywatyzacją postkolumnową, która wykazała iż w przypadku ekstraktów z opuncji ich aktywność przeciwutleniająca jest wynikiem wysokiej zawartości kwasu askorbinowego a nie betalain, zawartych w próbce które wnosiły jedynie niewielki wkład w aktywność przeciwutleniającą można wyciągnąć wniosek, że za ochronę DNA przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym odpowiada w większej mierze kwas askorbinowy niż betalainy. Ponieważ wyniki testu CAA sugerowały niską biodostępność tego pierwszego, wnosić można, że neutralizacja RFT zachodzi jeszcze przed ich wniknięciem przeciwutleniacza do komórek. Natomiast buraki, które kwasu askorbinowego nie zawierały, nie wykazywały zdolności ochrony DNA przed RFT pomimo dużej zawartości łatwo wnikających do komórek betalain. Poprzednio opublikowane badania (Zielińska-Przyjemska, i in. 2012; Zielińska-Przyjemska, i in. 2014) sugerowały, że betanina pomimo, wspomnianego działania genotoksyczne może również chronic DNA przed uszkodzeniami wywołanymi przez prooksydanty. Prezentowane badania nie potwierdziły, tej obserwacji. Czerwona odmiana buraka, zawierająca najwięcej tego związku nie wykazała aktywności przeciwutleniającej w tym teście.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.3.4.2.2. Oznaczenie genotoksyczności ekstraktów z malin, winogron, morw i porzeczek oraz ich zdolności do ochrony DNA przed stresem oksydacyjnym



Rys. 34. Zdolność badanych ekstraktów roślinnych do ochrony DNA komórek HT29 przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem H_2O_2. Oznaczenia stosowane na rysunku: Kontrola negatywna (C-) - jądra komórek nie traktowanych ani H_2O_2 ani badanymi ekstraktami; Kontrola pozytywna (C+) - jądra komórek traktowanych czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny; jądra komórek traktowanych ekstraktami z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) odmiany maliny, białej (WGra) i czerwonej (RGra) odmiany winogron, białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) odmiany porzeczek oraz białej (WMul) i czarnej (BMul) odmiany morwy (słupki szare), oraz jądra komórek traktowanych ekstraktami oraz H_2O_2 (słupki czarne). Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testy T-studenta: ** $p<0,01$

Podobnie jak w przypadku ekstraktów z opuncji i buraków, również w przypadku różnych odmian malin, morwy i porzeczek zaobserwowano zdolność samych ekstraktów do powodowania fragmentacji DNA w komórkach HT29. Wyjątek stanowiły ekstrakty z obu odmian winogron(Rys. 34). Jednakże również tutaj efekt genotoksyczny był znacznie niższy niż ten obserwowany tzw. kontroli pozytywnej dla H_2O_2 kontrolę pozytywną, którą stanowiły komórki traktowane 100 μM H_2O_2.

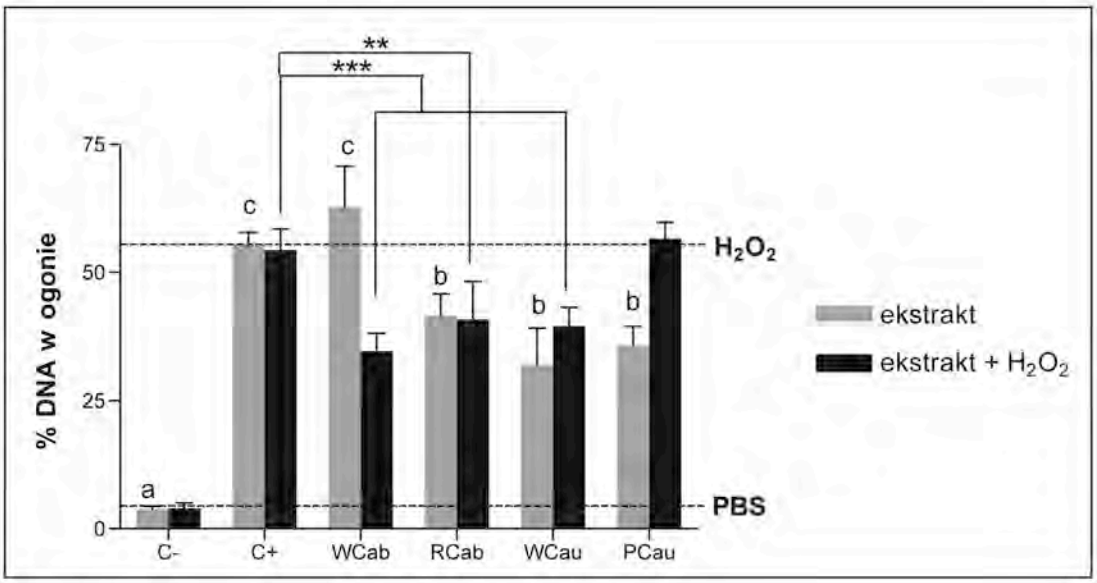
Natomiast porównanie zdolności badanych ekstraktów z owoców zawierających (czerwona malina, czerwone winogrona, czerwona i czarna porzeczka oraz czarna morwa) lub nie (żółta malina, białe winogrona, biała porzeczka, biała morwa) związki z grupy antocyjanów do ochrony DNA komórek HT29 przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym (Rys. 34) wykazało, że najsilniejsze właściwości ochronne miały ekstrakty ze wszystkich badanych odmian porzeczek. Statystycznie istotny efekt ochronny zaobserwowano również dla ekstraktu z żółtej maliny. Pozostałe ekstrakty roślinne nie wykazały zdolności do ochrony DNA przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem H_2O_2 służącego jako modelowy czynnik wywołujący stres

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

oksydacyjny w komórkach. Na przykładzie wyników tego doświadczenia widać, że wysoka zawartość przeciwutleniaczy i udowodniona wysoka aktywność przeciwutleniająca nie gwarantują ochrony komórek przed uszkodzeniami DNA wynikającymi z narażenia na stres oksydacyjny.

III.3.4.2.1. Genotoksyczność ekstraktów z kapust i kalafiorów oraz ich zdolność do ochrony DNA przed stresem oksydacyjnym

Porównanie zdolności badanych ekstraktów z roślin z rodziny *Brassicaceae* zawierających (czerwona kapusta i fioletowy kalafior) lub nie (biała kapusta i biały kalafior) związki z grupy antocyjanów do ochrony DNA przed uszkodzeniami wywołanymi przez RFT (Rys. 35) wykazało, że odmiany niezawierające antocyjanów oraz czerwona kapusta wykazują zdolność do ochrony DNA przed stresem oksydacyjnym na podobnym poziomie, podczas gdy wyniki uzyskane dla DNA traktowanego ekstraktem z fioletowego kalafiora nie wykazały statystycznie istotnych różnic w stopniu uszkodzenia DNA w stosunku do kontroli.



Rys. 35. Zdolność badanych ekstraktów roślinnych do ochrony DNA przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem H_2O_2. Oznaczenia stosowane na rysunku: Kontrola negatywna (C-) - jądra komórek nie traktowanych ani H_2O_2 ani badanymi ekstraktami; Kontrola pozytywna (C+) - jądra komórek traktowanych czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny; jądra komórek traktowanych ekstraktami z białej (WCab) i czerwonej odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora (słupki szare), oraz jądra komórek traktowanych ekstraktami oraz H_2O_2 (słupki czarne). Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ±SD. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testy T-studenta: ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W tym przypadku jednak interpretacja wyników nie jest łatwa, ponieważ same ekstrakty, szczególnie z kapusty białej, powodowały silną fragmentację DNA. Można przypuszczać, że efekt ten na tyle zaburzył funkcjonowanie komórek, że znajdowało to odzwierciedlenie w omawianym uprzedniohamowaniu ich wzrostu. Ponieważ komórki HT29 są komórkami nowotworowymi, uzyskane wyniki potwierdzają znane przeciwnowotwórcze działanie roślin kapustowatych.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń mających na celu określenie właściwości genotoksycznych badanych ekstraktów roślinnych oraz ich zdolności do ochrony DNA przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego udowodniły dualistyczną naturę bioaktywnych fitozwiązków. Z jednej strony przynajmniej niektóre z bioaktywnych drugorzędowych metabolitów wykazują właściwości genotoksyczne, z drugiej jednak mogą chronić biomolekuły przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego. W przypadku roślin o tak dużej zawartości substancji bioaktywnych brak jednoznacznego wyniku nie jest zaskakujący.

III.3.4.3. Wpływ ekstraktów roślinnych na aktywność enzymów II fazy detoksykacji

Większość kancerogenów występuje w formie nieaktywnych i w zasadzie nieszkodliwych prokancerogenów, które wymagają metabolicznej aktywacji do reaktywnych, elektrofilowych form - właściwych kancerogenów - uszkadzających DNA. Kancerogeny chemiczne i inne ksenobiotyki jako substancje obce usuwane są z komórek w trakcie dwuetapowego procesu detoksykacji. Pierwszy etap polega na zmianie właściwości fizykochemicznych cząsteczki w kierunku zwiększenia jej rozpuszczalności i nadania jej cech reaktywności chemicznej, aby mogły związać się z endogennymi substancjami i w takiej postaci zostać usunięte z organizmu. Taka aktywacja metaboliczna, która niestety w przypadku prokancerogenów często zamiast chronić organizm ludzki prowadzi do powstania wspomnianych właściwych kancerogenów, przebiega przy udziale enzymów fazy I należących do licznej rodziny białek zależnych od cytochromu P450.

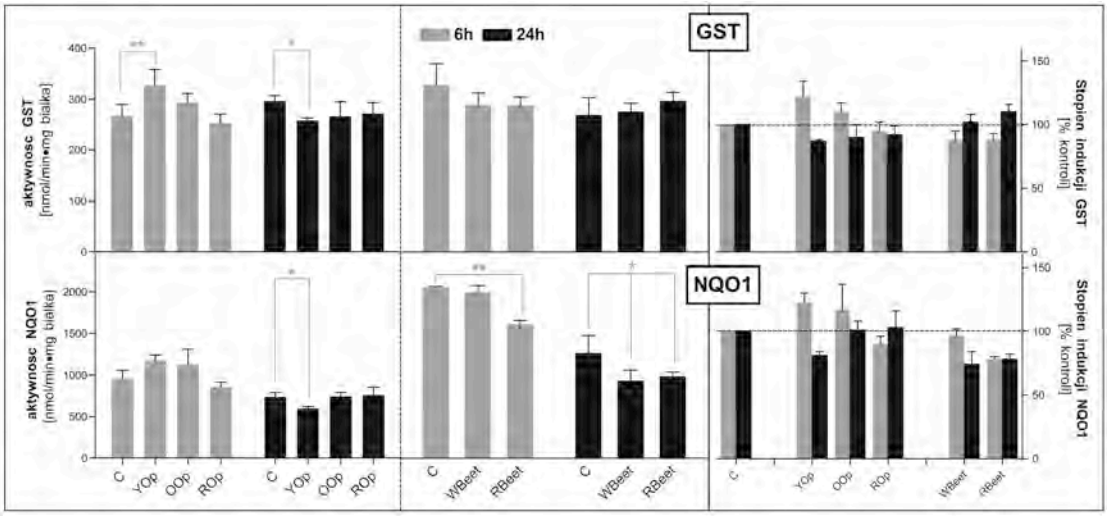
Aktywowane ksenobiotyki, w tym właściwe kancerogeny (produkty reakcji enzymatycznych fazy I) są substratami dla enzymów fazy II odgrywających istotną rolę w ich detoksykacji. Zadaniem enzymów II fazy jest sprzęganie aktywowanych kancerogenów, wydalanie z komórki i ostatecznie usuwanie wraz z moczem z organizmu. Podwyższony poziom enzymów fazy II, do których należą między innymi

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

S-transferazy glutationowe, N-acetylotransferazy, oksydoreduktaza chinonowa NQO1, pomaga w ochronie organizmu przed substancjami zbędnymi, toksycznymi, a takżechemicznymi kancerogenami.. Zdolność do indukcji tych enzymów jest zatem ważnym wyróżnikiem chemoprewencyjnych właściwości danej substancji.

W celu określenia zdolności badanych ekstraktów roślinnych do aktywacji enzymów II fazy detoksykacji, komórki ludzkiego raka jelita grubego HT29 poddane zostały inkubacji z badanymi ekstraktami roślinnymi przez okres 6 i 24 h, a następnie wyizolowana została z nich frakcja cytozolowa, która stanowi źródło tych enzymów. Zróżnicowanie okresów inkubacji uwzględniało ewentualne różnice w kinetyce indukcji enzymów z obu grup. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że aktywność GST i NQO1 odmiennie zmienia się pod wpływem działania ekstraktów roślinnych bogatych w bioaktywne fitozwiązki (Piekarska i in., 2014).

III.3.4.3.1. Wpływ ekstraktów z opuncji i buraków na aktywność enzymów II fazy detoksykacji



Rys. 36. Porównanie zdolności ekstraktów z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (R) odmiany opuncji figowej oraz białej (WBeet) i czerwonej (RBeet) odmiany buraków do aktywacji enzymów II fazy detoksykacji w komórkach HT29. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD. Litera C odnosi się do aktywności enzymatycznych w komórkach nietraktowanych. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testy T-studenta: * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Wyniki pomiarów aktywności enzymatycznej S-transferaz glutationowych (GST) oraz oksydoreduktazy chinonowej (NQO1) wykazały (Rys. 36), że ekstrakty z żółtej i pomarańczowej opuncji indukują oba enzymy po 6-godzinnej inkubacji, natomiast po inkubacji 24-godzinnej aktywność obu enzymów maleje. W przypadku ekstraktów z czerwonej opuncji oraz ekstraktów z obu odmian buraka nie zauważono znaczącej aktywacji badanych enzymów w porównaniu do nietraktowanych komórek

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

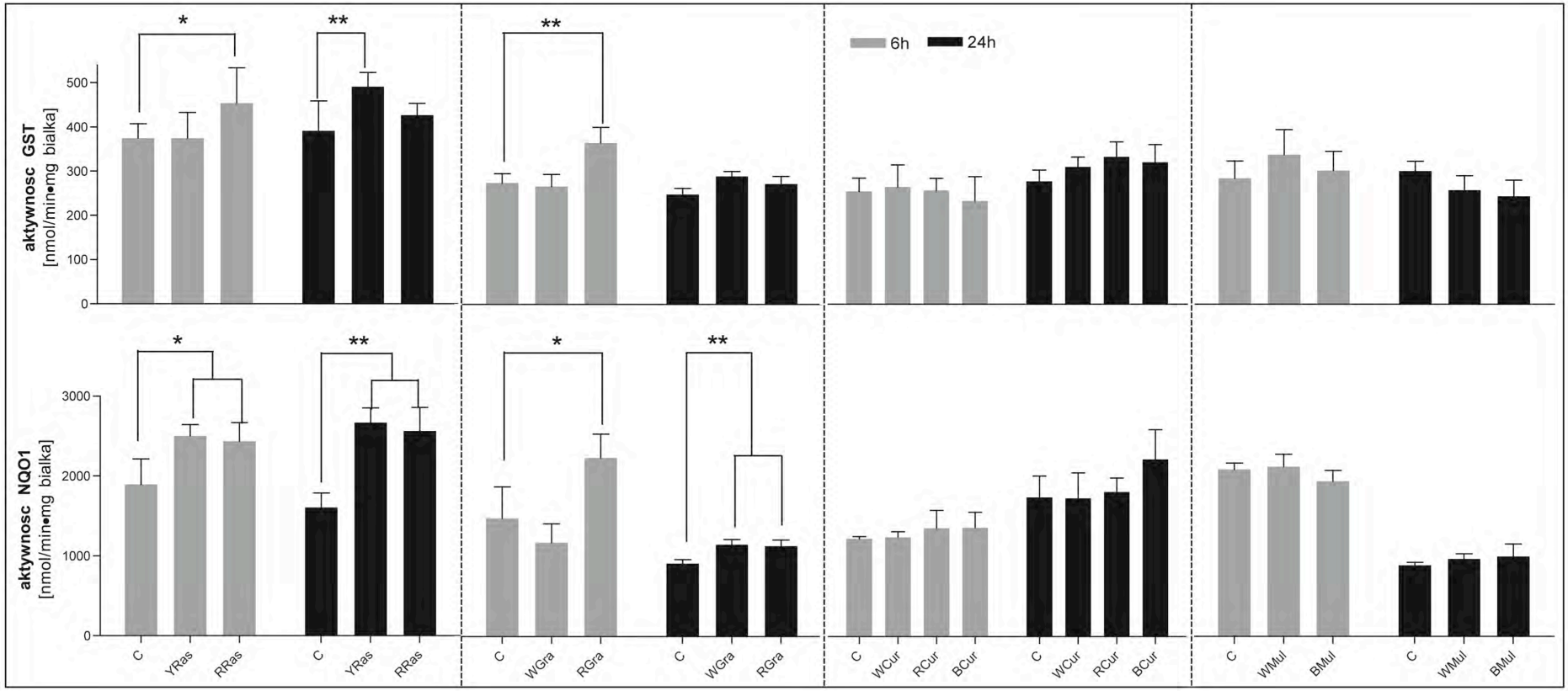
kontrolnych. Można więc wnioskować na podstawie uzyskanych wyników, że związki z grupy betalain nie wykazują zdolności do indukcji badanych enzymów II fazy detoksykacji. Doświadczenia przeprowadzone przez Wettasinghe (Wettasinghe, i in. 2002) wskazały jednak, że wodne ekstrakty z różnych odmian buraka (białej, pomarańczowej i czerwonej) są w stanie aktywować enzymy II fazy detoksykacji w komórkach wątrobowych (Hepa 1c1c7). Największy stopień aktywacji zaobserwowano dla odmiany czerwonej buraka, natomiast odmiana biała nie wykazała zdolności do indukcji tych enzymów. Różnice pomiędzy omawianymi eksperymentami, a tymi przeprowadzonymi przez Wettasinghe – czas inkubacji i inna linia komórkowa – mogły wpłynąć na wynik eksperymentu. W publikacji Krajka-Kuźniak (Krajka-Kuźniak, i in. 2013) wykazała wpływ roztworu betaniny (2-20 μM) na aktywność GST i NQO1 w ludzkich komórkach wątrobowych (THLE-2) oraz linii nowotworowej komórek wątroby (HepG2). Obie linie są komórkami wątrobowymi, ale jedna z nich jest zmieniona nowotworowo i to właśnie w niej nastapiła indukcja enzymów detoksykacyjnych w wyniku działania betaniny, co może wskazywać na zmiany metabolizmu ksenobiotyków w komórkach raka wątroby w porównaniu z komórkami zdrowymi. Efekt ten może być specyficzny tkankowo.

III.3.4.3.2. Wpływ ekstraktów z malin, winogron, morwy i porzeczek na aktywność enzymów II fazy detoksykacji

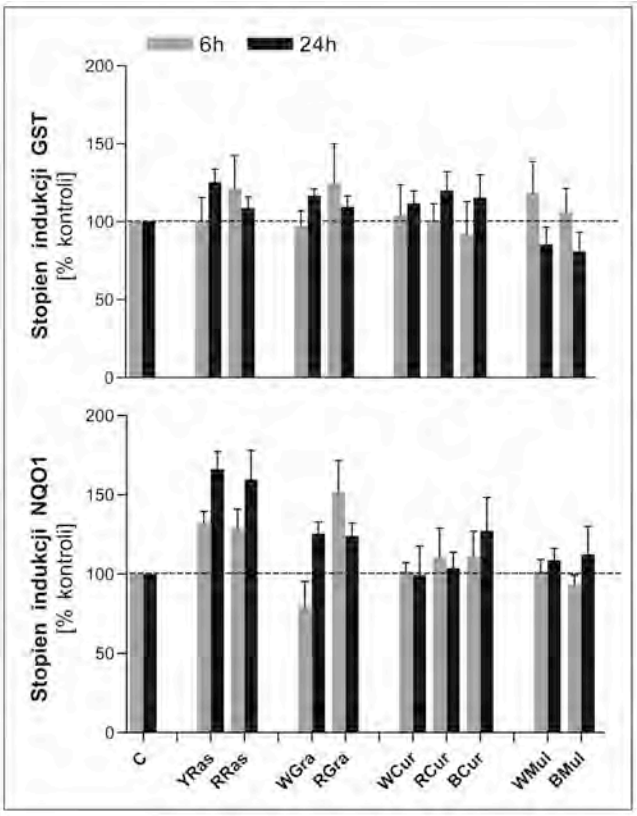
Wyniki pomiarów aktywności enzymatycznej S-transferaz glutationowych (GST) oraz oksydoreduktazy chinonowej (NQO1) zebrane na Rys. 37 oraz pomiarów stopnia indukcji przedstawione na Rys. 38, wskazują, że ekstrakty z żółtej i czerwonej maliny, czerwonych winogron oraz białej i czerwonej porzeczki posiadają zdolność do indukcji badanych enzymów w komórkach HT29 tak po 6-, jak i 24-godzinnej inkubacji. Natomiast ekstrakty z białych winogron i czarnej porzeczki wydają się mieć zdolność do indukcji badanych enzymów po 24-godzinnej inkubacji, a ekstrakty z obu odmian morwy do indukuji aktywności GST po 6 godzinach, a NQO1 po 24 godzinach, choć w tych przypadkach zmiany nie osiągnęły statystycznej istotności. Jak widać nie można zaobserwować wyraźnej zależności pomiędzy zdolnością do indukcji enzymów dotoksykacyjnych II fazy a zawartością związków z grupy antocyjanów. W większości przypadków odmiany jasna i ciemna nie różniły się znacząco zdolnością stymulacji aktywności enzymów II fazy detoksykacji.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 37. Porównanie zdolności ekstraktów z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) odmiany maliny, białej (WGra) i czerwonej (RGra) odmiany winogron, białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) odmiany porzeczek oraz białej (WMul) i czarnej (BMul) odmiany morwy do aktywacji enzymów II fazy detoksykacji w komórkach HT29. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD. Litera C odnosi się do aktywności enzymatycznych w komórkach nietraktowanych. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testy T-studenta: * $p<0,05$, ** $p<0,01$.



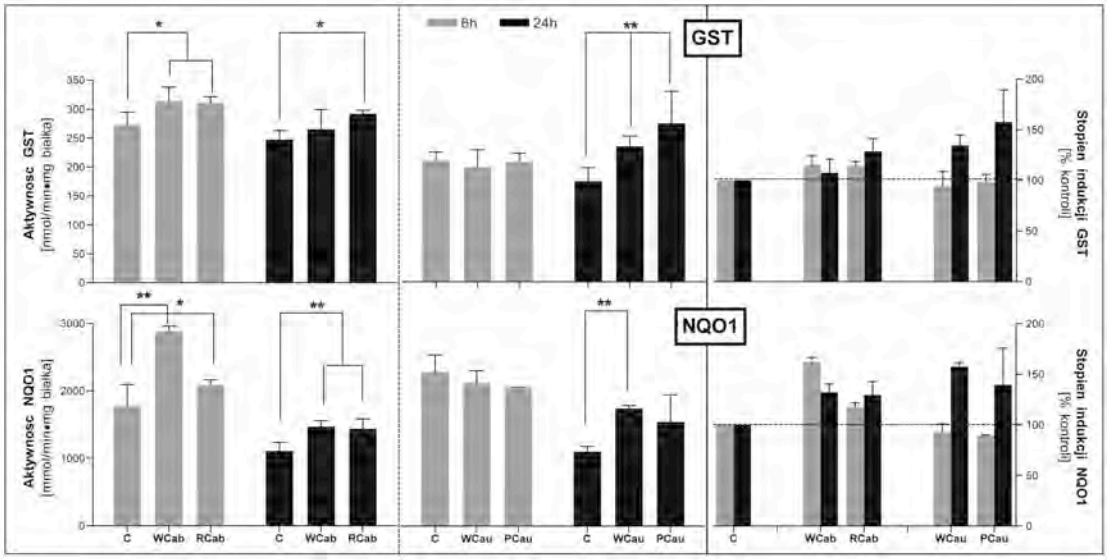
Rys. 38. Stopień indukcji enzymów II fazy detoksykacji w komórkach HT29 przez ekstrakty z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) maliny, białych (WGra) i czerwonych (RGra) winogron, białych (WCur), czerwonych (RCur) i czarnych (BCur) porzeczek oraz białej (WMul) i czarnej (BMul) morwy. Litera C odnosi się do aktywności enzymatycznych w komórkach nietraktowanych. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ±SD.

III.3.4.3.3. Wpływ ekstraktów z kapust i kalafiorów na aktywność enzymów II fazy detoksykacji

Wyniki pomiarów aktywności enzymatyczneych S-transferaz glutationowych (GST) oraz oksydoreduktazy chinonowej (NQO1), przedstawione na Rys. 39., pokazały, że ekstrakty z białej i czerwonej kapusty mają zdolność do indukcji badanych enzymów zarówno, po 6- jak i 24-godzinnej inkubacji. Ekstrakty z obu odmian kalafiora powodowały indukcję obu badanych aktywności enzymatycznych dopiero po inkubacji 24-godzinnej w porównaniu do komórek nietraktowanych.

W przypadku roślin z rodziny *Brassicaceae* trudno jest określić, na podstawie omówionych badań, które z wielu występujących w nich bioaktywnych fitozwiązków mogą odpowiadać za zdolność do indukcji enzymów II fazy detoksykacji, ponieważ ekstrakty oprócz związków z grupy polifenoli zawierają również produkty rozpadu glukozynolanów, o których wiadomo, że mają zdolność aktywacji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 39. Porównanie zdolności białej (WCab) i czerwonej (RCab) odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora do aktywacji enzymów II fazy detoksykacji w komórkach HT29. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD. Litera C odnosi się do aktywności enzymatycznych w komórkach nietraktowanych. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona przy pomocy testy T-studenta: * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

III.3.4.4. Zbadanie zdolności badanych ekstraktów roślinnych do indukcji mutacji

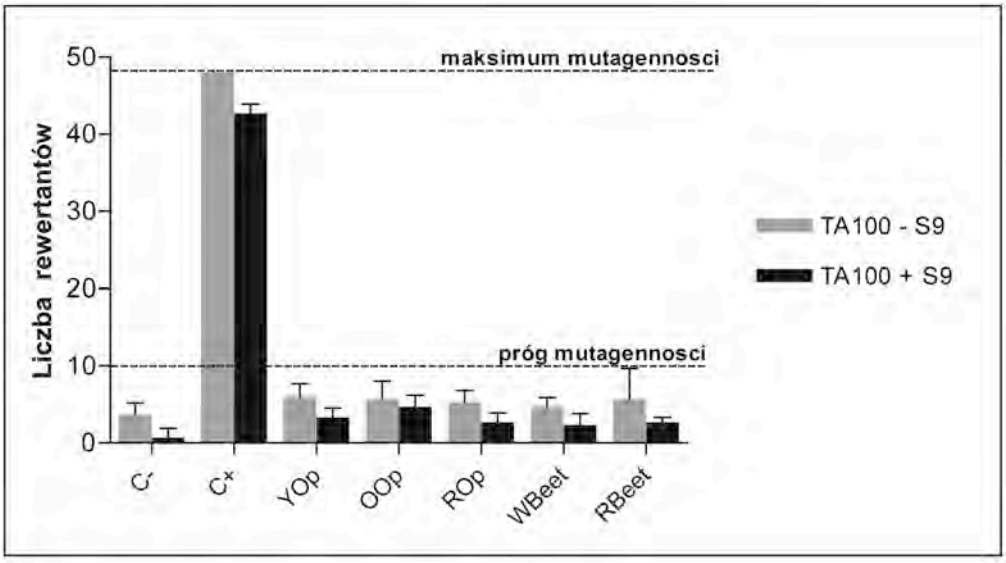
Zdolność badanych ekstraktów do wywoływania mutacji została zbadana za pomocą mikropłytkowej wersji testu Amesa (Xenometrix). Użyty został szczep *Salmonella typhimurium* TA100, z oraz bez aktywacji metabolicznej promutagenów za pomocą frakcji S9 izolowanej z wątroby szczura. Zbadanie zdolność badanych ekstraktów do indukcji mutacji stanowiło uzupełnienie oznaczeń genotoksyczności. Chodziło o to, aby sprawdzić czy udowodniona w teście kometowym zdolność badanych ekstraktów do wywoływania uszkodzeń DNA jest wynikiem działania mutagenów bądź promutagenów zawartych w tych roślinach.

III.3.4.4.1. Zbadanie zdolności ekstraktów z opuncji figowej i buraków do indukcji mutacji

Ekstrakty z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) opuncji oraz białego (WBeet) i czerwonego (RBeet) buraka nie wykazały aktywności mutagennej w stosunku do testowanego szczepu bakteryjnego (Rys. 40). Brak zdolności do wywoływania mutacji w zestawieniu z wynikami testu kometowego, które wskazały na zdolność badanych ekstraktów do powodowania uszkodzeń nici DNA może

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

wskazywać, że obserwowana w teście kometowym fragmentacja DNA nie powstała w wyniku działania mutagenów.

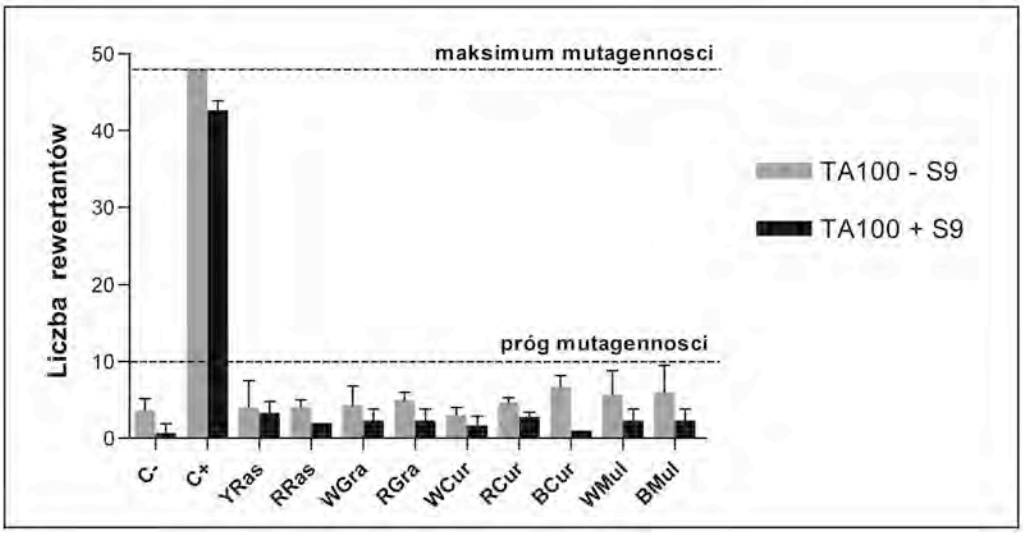


Rys. 40. Porównanie zdolności indukowania mutacji w bakteriach *S. typhimurium* TA100 przez badane ekstrakty z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) odmiany opuncji oraz białej (WBeet) i czerwonej (RBeet) odmiany buraka za pomocą testu Amesa. Kontrolę negatywną (C-) stanowiła sterylna woda dejonizowana, natomiast kontrolę pozytywną (C+) stanowiły tlenek 4-nitrochinoliny (TA100 – S9) lub 2-aminoantracen (TA100 + S9). Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD.

III.3.4.4.1. Zbadanie zdolności ekstraktów z malin, winogron, morwy i porzeczek do indukcji mutacji

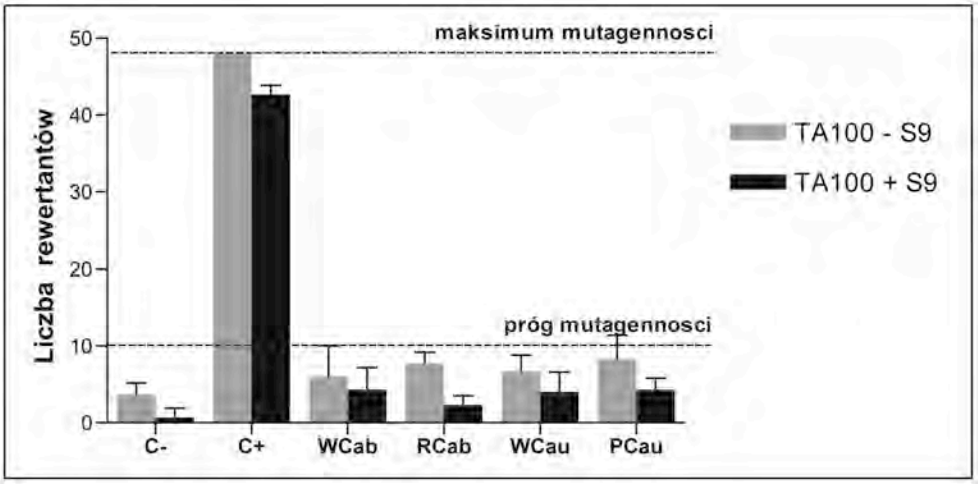
Podobnie jak w przypadku ekstraktów z opuncji i buraków, również ekstrakty z żółtych (YRas) i czerwonych (RRas), białych (WGra) i czerwonych (RGra) winogron, białej (WMul) i czarnej (BMul) morwy oraz białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) porzeczki nie wykazały w teście Amesa zdolności do wywoływania mutacji (Rys. 41). Aktywacja metaboliczna za pomocą frakcji S9 również nie wpłynęła na mutagenność badanych ekstraktów

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 41. Porównanie zdolności indukowania mutacji w bakteriach *S. typhimurium* TA100 przez badane ekstrakty z żółtej (YRas), i czerwonej (RRas) odmiany maliny, białej (WGra) i czerwonej (RGra) odmiany winogron, białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) odmiany porzeczki oraz białej (WMul) i czarnej (BMul) odmiany morwy za pomocą testu Amesa. Kontrolę negatywną (C-) stanowiła sterylna woda dejonizowana, natomiast kontrolę pozytywną (C+) stanowiły tlenek 4-nitrochinoliny (TA100 – S9) lub 2-aminoantracen (TA100 + S9). Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD.

III.3.4.4.1. Zbadanie zdolności ekstraktów z kapust i kalafiorów do indukcji mutacji



Rys. 42. Porównanie zdolności indukowania mutacji w bakteriach *S. typhimurium* TA100 przez badane ekstrakty z białej (WCab) i czerwonej (RCab) odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora za pomocą testu Amesa. Kontrolę negatywną (C-) stanowiła sterylna woda dejonizowana, natomiast kontrolę pozytywną (C+) stanowiły tlenek 4-nitrochinoliny (TA100 – S9) lub 2-aminoantracen (TA100 + S9). Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD.

Według danych literaturowych niektóre glukozynolany obecne w warzywach kapustowatych mają zdolność do wywoływania mutacji (Sannjasin-Gerber, et al., 2011). Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, jednak iż podobnie jak w przypadku pozostałych ekstraktów roślinnych żaden z badanych ekstraktów

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

nie wykazywał zdolności do indukcji procesu mutagenezy w szczepie *S. typhimurium* TA100 ani w warunkach normalnych ani w wyniku aktywacji metabolicznej potencjalnych promutagenów za pomocą frakcji S9 (Rys. 42).

III.3.4.5. Oznaczenie wpływu ekstraktów roślinnych na aktywność α-amylazy i α – glukozydazy.

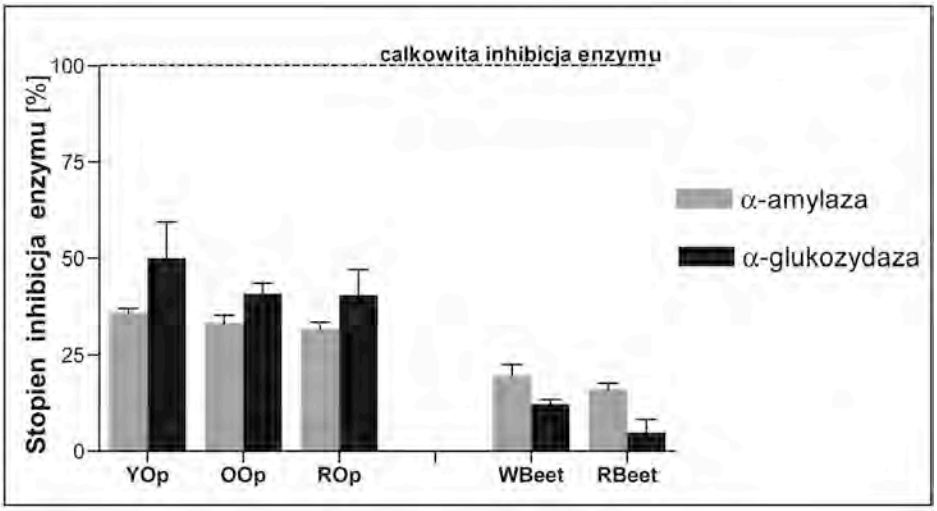
Cukrzyca typu 2 to choroba charakteryzująca się hiperglikemią spowodowaną niedoborem lub opornością na insulinę. Towarzyszą jej zaburzenia w metabolizmie cukrów, tłuszczów i białek. W związku ze skutkami ubocznymi standardowych terapii przeciwcukrzycowych rośnie zainteresowanie naturalnymi substancjami, które mogą wspomagać leczenie i zapobiegać objawom tej choroby. Wiadomo, że kontrolowanie poziomu glukozy we krwi ma duże znaczenie w ograniczaniu długoterminowych komplikacji zdrowotnych. Jednym z podejść terapeutycznych w leczeniu cukrzycy jest zmniejszenie hiperglikemii występującej po spożyciu pokarmu. Można to osiągnąć poprzez opóźnienie absorpcji glukozy poprzez zahamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za proces hydrolizy złożonych węglowodanów do monocukrów – α-amylazy i α -glukozydazy. Wiele doniesień naukowych wskazuje, że zdolność do hamowania aktywności tych enzymów często mają fitozwiązki wykazujące aktywność przeciwutleniającą, np. polifenole (Liége Alves de Souza, i in. 2015). Dlatego też zasadne wydaje się być uwzględnienie tych testów w badaniach nad właściwościami prozdrowotnymi ekstraktów roślinnych bogatych w przeciwutleniacze.

III.3.4.5.1. Oznaczenie wpływu ekstraktów opuncji figowej i buraków na aktywność α-amylazy i α – glukozydazy.

Rysunek 43 przedstawia porównanie zdolności ekstraktów z opuncji oraz buraków do inhibicji enzymów α -amylazy i α -glukozydazy. Wszystkie odmiany opuncji wykazały zdecydowanie większą zdolność do hamowania aktywności badanych enzymów od ekstraktów z obu odmian buraka. Zestawiając uzyskane dane z wynikami analiz HPLC można wysnuć wniosek, że za inhibicję tych enzymów nie odpowiadają w tym przypadku związki z grupy betalain. Gdyby tak było wówczas większą zdolność do inhibicji wykazywałby czerwony burak, który stanowi najbogatsze źródło tej grupy związków spośród badanych ekstraktów. Skład przeciwutleniaczy wskazywałby raczej na kwas askorbinowy, którego bogatym źródłem są owoce opuncji (Tab. 2), ale

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

wniosek ten podważają wyniki oznaczeń dla czarnej porzeczki (Rys. 44), która jest mniej efektywnym inhibitorem obu enzymów amylolitycznych od pozostałych odmian, pomimo najwyższej zawartości kwasu askorbinowego.

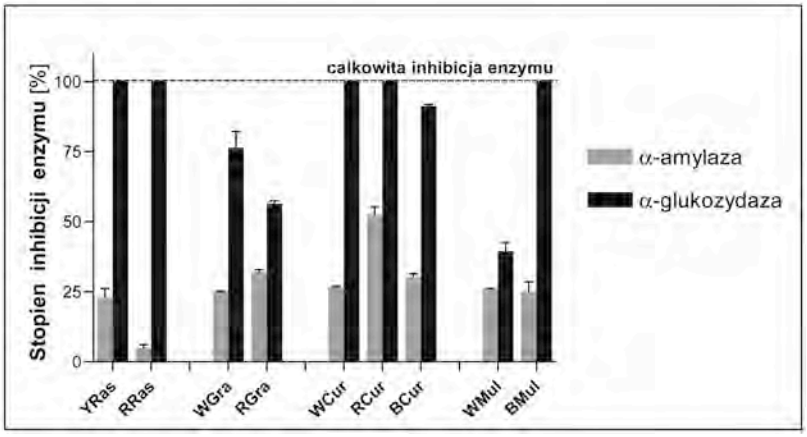


Rys. 43. Porównanie zdolności ekstraktów z żółtej (YOp), pomarańczowej (OOp) i czerwonej (ROp) odmiany opuncji, oraz białej (WBeet) i czerwonej (RBeet) odmiany buraka do inhibicji enzymów α-amylazy i α-glukozydazy. Wyniki są średnią z trzech pomiarów ± SD.

III.3.4.5.2. Oznaczenie wpływu ekstraktów z malin, winogron, morwy i porzeczek na aktywność α-amylazy i α – glukozydazy.

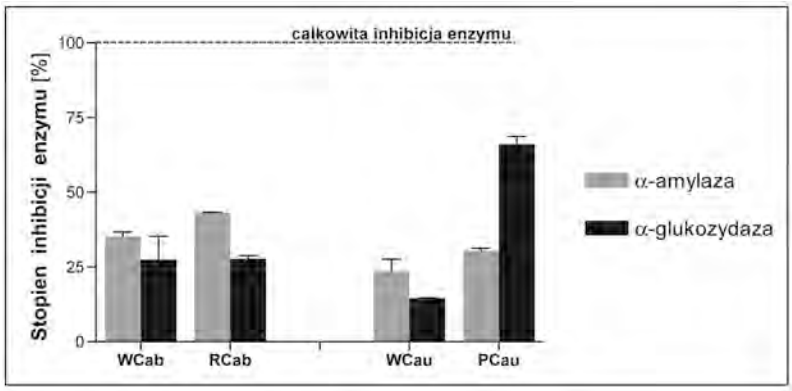
Rysunek 44 przedstawia porównanie zdolności ekstraktów z malin, winogron, morwy i porzeczek do inhibicji α-amylazy i α-glukozydazy. Podobnie jak w przypadku ekstraktów z opuncji i buraków, wszystkie badane ekstrakty hamowały działanie obu badanych enzymów. W przypadku α -amylazy zdolność badanych ekstraktów do inhibicji enzymu była znacznie niższa niż w przypadku α-glukozydazy. Drugi enzym ulegał niemal całkowitej dezaktywacji w przypadku ekstraktów ze wszystkich odmian malin, porzeczek oraz czarnej morwy. Najniższą zdolność do inhibicji tego enzymu wykazała morwa biała, ale w związku z niską zawartością związków biologicznie aktywnych w jej ekstrakcie nie jest to wynik niespodziewany. Również słabsza zdolność obu odmian winogron do inhibicji enzymów może być powiązana z niską, w porównaniu z innymi badanymi ekstraktami, zawartością bioaktywnych metabolitów wtórnych. W przypadku inhibicji α-amylazy, w zasadzie wszystkie badane ekstrakty wykazały zdolność do inhibicji tego enzymu na porównywalnym poziomie, niezależnie od odmiany.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 44. Porównanie zdolności ekstraktów z żółtej (YRas) i czerwonej (RRas) odmiany maliny, białej (WGra) i czerwonej (RGra) odmiany winogron, białej (WCur), czerwonej (RCur) i czarnej (BCur) odmiany porzeczek oraz białej (WMul) i czarnej (BMul) odmiany morwy do inhibicji enzymów α -amylazy i α -glukozydazy. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ± SD.

III.3.4.5.2. Oznaczenie wpływu ekstraktów z kapust i kalafiorów na aktywność α-amylazy i α – glukozydazy.



Rys. 45. Porównanie zdolności ekstraktów z białej (WCab) i czerwonej (RCab) odmiany kapusty oraz białej (WCau) i fioletowej (PCau) odmiany kalafiora do inhibicji enzymów α -amylazy i α-glukozydazy. Wyniki przedstawiają średnią z trzech pomiarów ±SD.

Podobnie jak w przypadku pozostałych roślin, również w przypadku kapust i kalafiorów wszystkie badane ekstrakty wykazały zdolność do inhibicji badanych enzymów amylolitycznych (Rys. 45). W przypadku α -amylazy zdolność badanych ekstraktów do inhibicji enzymu była na podobnym poziomie dla wszystkich odmian, natomiast w przypadku α -glukozydazy najwyższą zdolność do inhibicji enzymu wykazywał ekstrakt z fioletowego kalafiora.

Podsumowując, hamowanie aktywności enzymów α-amylazy, a zwłaszcza α-glukozydazy zachodziło najefektywniej pod wpływem ekstraktów z badanych owoców i nie było w prosty sposób powiązane z zawartością antocyjanin.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

IV. PODSUMOWANIE

Przez ostatnie dwie dekady najpopularniejszą strategią walki z chorobami cywilizacyjnymi było wykorzystanie izolowanych z roślin jadalnych substancji biologicznie aktywnych o poznanym mechanizmie działania w postaci suplementów diety. Podejście to weryfikowane w szeroko zakrojonych kontrolowanych badaniach epidemiologicznych nie spełniło jednak pokładanych w nim nadziei. Jednocześnie badania populacyjne prowadzone u różnych grup ludności dowodziły, że dieta bogata w warzywa i owoce zmniejsza zagrożenie chorobami cywilizacyjnymi. Obserwacje te wskazują, że aktywność biologiczna roślinnych substancji prozdrowotnych jest wynikiem interakcji pomiędzy tymi związkami, co zostało sformułowane w postaci hipotezy synergizmu żywieniowego, wskazującego na skojarzone działanie różnych składników danej rośliny jadalnej. W celu przełożenia tej hipotezy na strategie profilaktyczne niezbędne jest jej wsparcie badaniami naukowymi pozwalającymi na zrozumienie interakcji pomiędzy fitozwiązkami i matrycą roślinną, w której wstępują. Problem ten został podjęty w niniejszej pracy doktorskiej.

W badaniach prowadzonych w ramach projektu doktorskiego wykorzystywano pary owoców lub warzyw należących do tego samego gatunku, ale różniących się zasadniczo zawartością określonych grup związków o wysokim potencjale biologicznym. Wybrano następujące rośliny jadalne: malina żółta i czerwona, winogrona białe i czerwone, morwa biała i czarna, porzeczka biała, czerwona i czarna, kapusta biała i czerwona, kalafior biały i fioletowy, opuncja żółta, pomarańczowa i czerwona oraz burak biały i czerwony, zawierające lub nie fitozwiązki z grupy odpowiednio antocyjanów lub betalain.

Pierwszym etapem prac było scharakteryzowanie składu podstawowych składników odżywczych obecnych w badanych odmianach roślin jadalnych. Następnie wykonano profile bioaktywnych fitozwiązków z grupy antocyjanów, betalain, jak również innych związków fenolowych, a w przypadku warzyw kapustowatych również glukozynolanów i produktów ich hydrolizy. Obie wspomniane grupy pigmentów wykazują silne działanie antyoksydacyjne i postulowana jest ich skuteczność w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu, które to zjawisko jest wiązane z rozwojem chorób cywilizacyjnych. Dlatego też badania nad biologiczną aktywnością ekstraktów były przede wszystkim skierowane na ocenę ich potencjału przeciwutleniającego, zarówno metodami biochemicznymi w systemie bezkomórkowym, jak i biologicznymi w hodowli komórek ludzkiego raka jelita

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

grubego, linia HT29. Wyniki tych badań dowiodły, że aktywność przeciwutleniająca ekstraktów była wysoce skorelowana z zawartością przeciwutleniaczy, tak należących do betalain i antocyjanów, jak i będących składnikiem matrycy roślinnej (np. witamina C czy kwasy fenolowe), ale już ochrona komórek przed stresem oksydacyjnym nie była przewidywalna na tej podstawie. Podobnie inne badane aktywności chemoprewencyjne, takie jak indukcja aktywności enzymów detoksykacyjnych czy hamowanie wzrostu komórek nowotworowych, nie były w sposób jednoznaczny zależne od zawartości barwnych bioaktywnych fitozwiązków. Wskazuje to na bardzo znaczący wpływ kontekstu chemicznego w jakim pojawia się substancja biologicznie aktywna na jej potencjał chemoprewencyjny.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały brak jednoznacznej korelacji pomiędzy zawartością fitozwiązków należących do danej grupy wtórnych metabolitów a aktywnością biologiczną wykazywaną przez daną roślinę. Dotychczasowe badania prowadzone dla wyizolowanych fitozwiązków lub tylko jednego rodzaju ekstraktów roślinnych mylnie takie proste zależności sugerowały. Wyniki uzyskane dla ekstraktów roślinnych wyraźnie wskazały na silnie modyfikujący działanie biologiczne wpływ matrycy roślinnej, co może być podstawą do ogólnego wniosku, że kontekst chemiczny (uwarunkowany rodzajem produktu spożywczego, np. jogurt z owocami czy świeży owoc) będzie znacząco decydował o działaniu prozdrowotnym bioaktywnych substancji zawartych w pokarmach roślinnych zgodnie z koncepcją synergizmu żywieniowego.

Podsumowując otrzymane wyniki stwarzają punkt wyjścia do poszukiwania skutecznych strategii w chemoprewencji chorób cywilizacyjnych z wykorzystaniem podejścia żywieniowego (cała roślina), a nie farmakologicznego (wyizolowana substancja). Jest to bardzo istotne, ponieważ to ostatnie podejście jak dotąd nie przyniosło oczekiwanych rezultatów.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

WYKAZ LITERATURY

1. Aggarwal B.B., Shishodia S. (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 71:1397–1421

2. Ai Pham-Huy L., He H., Pham-Huy C. (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4: 89-96

3. AICR. American Institute for Cancer Research (1997) Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund.

4. AICR. American Institute for Cancer Research (2007) Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund.

5. Albano C., Negro C., Tommasi N., Gerardi C., Mita G., Micel A., De Bellis L., Blando F. (2015) Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [Opuntia ficus indica (L.) Mill.] Fruits from Apulia (Soutk Italy) genotypes. *Antioxidants*. 4: 269-280

6. Alemanno A., Garde A. (2013) The prevention of noncommunicable diseases in the European Union. *Regulating Tobacco, Alcohol and Unhealthy Foods: The legal issues*.

7. AOAC (1995). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. Association of Analytical Communities.

8. ATBC Cancer Prevention Study Group (1994) The effects if vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine*. 330: 1029-1035

9. Aunan J.R., Watson M.M., Hagland H.R., Søreide K. (2016) Molecular and biological hallmarks of ageing. *British Journal of Surgery*. 103: 29-46

10. Baasanjav-Gerber C., Hollnagel H., Brauchmann J., Iori R., Glatt H. (2011) Detection of genotoxicants in Brassicales using endogenous DNA as a surrogate target and adducts determined by 32P-postlabelling as an experimental endpoint. *Mutagenesis*. 26: 407-413

11. Baasanjev-Gerber C., Engst W., Florian S., Monien B., Barillari J., Iori R., Frank H., Seidel A., Krumbein A., Schreiner M., Glatt H. (2010) Glucosinolates: DNA adduct formation in vivo and mutagenicity in vitro. Senate Commission on Food Safety of the German Research Foundation. *Risk Assessment of Phytochemicals in Food – Novel Approaches*. 325-334

12. Baer-Dubowska W. (2000) Nieodżywcze składniki roślin w chemoprewencji

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

nowotworów oraz chorób serca i układu krążenia. *Farmacja Polska*, 56, 1064-1070.

13. Bahorun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI. (2006) Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. Internet *Journal of Medical Update*. 1: 1-17

14. Bartosz G. (2009) Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN

15. Benzie I.F., Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.

16. Berti E., Bartsch H., Gerhauser C. (2006) Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Molecular Cancer Therapy*. 5: 575-585

17. Boffeta P., Couto E., Wichmann J., Ferrari P., Trichopoulos D., (2010*)* Fruit and Vegetables Intake and Overall Cancer Risk in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC), *Journal of the National Cancer Institute*. 102: 529-537.

18. Boileau T.W., Liao Z., Kim S., Lemeshow S., Erdman J.W., Clinton S.K., (2003) Prostate carcinogenesis in Nmethyl- N-nitrosourea (NMU)-testosterone- treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *Journal of the National Cancer Institute*. 95: 1578–1586

19. Bryan H.K., Olayanju A., Goldring C.E., Park B.K. (2013) The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regula- tion. *Biochemical Pharmacology*. 85: 705-717

20. Burow M., Market J., Gershenzon J., Wittstock U. (2006) Comparative biochemical characterization of nitrile-forming proteins from plants and insects that alter myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates, *FEBS Journal*. 273: 2432-2446

21. Butera D., Tesoriere L., Di Gaudio F., Bongiorno A., Allegra M., Pintaudi A.M., Kohen R., Livrea M.A. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (Opuntia ficus indica) fruit extract and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50: 6895-6901.

22. Cassidy A., Mukamal K.J., Liu L., Franz M., Eliassen A.H., Rimm E.B. (2013) High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation*. 127:188-196.

23. Cassidy A., O'Reilly E.J., Kay C., Sampson L., Franz M., Forman J.P., Curhan G., Rimm E.B. (2011) Habitual intake of flavonoid subclasses and incident

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

hypertension in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 93: 338-347

24. Cejudo-Bastante M.J., Chaalal M., Louileche H., Parrado J., Heredia F.J. (2015) Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 8491-8499

25. Ceriello A. (2008) Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. Review. *Diabetes Care*. 31: S181-184

26. Chatterjee M., Saluja R., Kanneganti S., (2007) Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cell Molecular Biology*. 53: 84-93

27. Chen X., Zou L.Q., Niu J., Liu W., Peng S.F., Liu C.M. (2015) The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. *Journal of Molecules*. 20: 14293-14311

28. Chen L., Cheng P.H., Rao X.M., McMasters K.M., Zhou H.S. (2014). Indole-3-carbinol (I3C) increases apoptosis, repressess growth of cancer cells, and enhances adenowirus-mediated oncolysis. *Cancer Biology and Therapy,* 15: 1256-1267

29. Chyou P., Nomura A., Hankin J., Stemmermann G. (1990) A case-cohort study of diet and stomach cancer. *Cancer Research*. 50: 7501-7504

30. Clark L.C. (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinomaof the skin. A randomized, controlled trial. Nutrition Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*. 276: 1957-1963

31. Conklin K.A. (2000) Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectivness and development of side effects, *Nutrition and Cancer*. 37: 1-6

32. Cooke D., Steward W.P., Gescher A.J., Marczyło T. (2005) Anthocyans from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*. 41: 1931-1940

33. De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R.M., Noonan D., Albini A. (2001) Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutation Research*. 480: 9-22.

34. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardio- vascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 99: 779–785

35. Dinkova-Kostova A.T., Massiah M.A., Bozak R.E., Hicks R.J., Talalay P. (2001)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their re- activity with sulfhydryl groups. *Proceedings of National Academy of Science*. 98: 3404-3409

36. Dinu M., Pagliai G., Casini A., Sofi F. (2017) Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1*:* 1-14

37. Domínguez R., Cuenca E., Maté-Muñoz J.L., García-Fernández P., Serra-Paya N., Lozano Estevan M.C., Herreros P.V., Garnacho-Castaño M.V. (2016) Effects of Beetroot Juice Supplementation on Cardiorespiratory Endurance in Athletes. A Systematic Review. *Nutrients*. 9: 1-18

38. Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Review. *Physiological Rev*iews. 82: 47-95

39. Dudley J.I., Lekli I., Mukherjee S., Das M., Bertelli A.A., Das D.K., (2008) Does White Wine Qualify for French Paradox? Comparison of the Cardioprotective Effects of Red and White Wines and Their Constituents: Resveratrol, Tyrosol, and Hydroxytyrosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 20: 9362-9373

40. Dutta-Roy A.K. (2002) Dietary components and human platelet activity. *Platelets*. 13: 67–75

41. Eberhardt M.V., Lee C.Y., Liu R.H. (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*. 405:903–904.

42. Ellsworth J.L., Kushi L.H., Folsom A.R. (2001) Frequent nut intake and risk of death from coronary heart disease and all causes in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease*. 11: 372–377

43. Ercisli S., Orhan E. (2007) Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*. 103: 1380-1384

44. European Food Safety Authority. (2017) Draft Guidance for Scientific Requirements for Health Claims Related to Antioxidants, Oxidative Damage and Cardiovascular Health

45. Eurostat Statistical Books. (2009) Health Statistics – Atlas on mortality in the European Union

46. Fardet A., Boirie Y. (2014) Associations between food and beverage groups and major diet-related chronic diseases: an exhaustive review of pooled/ meta-analyses and systematic reviews. *Nutrition Reviews*. 72(12): 741–762

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

47. Fraga C.G., Gelleano M., Verstraeten S.V., Oteiza P.I. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. 31: 435-445

48. Fraser G.E., Sabaté J., Beeson W.L., Strahan T.M. (1992) A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease: the Adventist Health Study. *Archives of Internal Medicine*. 152: 1416–1424

49. Furukawa S., Fujita T., Schimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. (2017) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *American Society of Clinical Investigation*. 114: 1752-1761

50. Galetti S., Sala E., Leoni O., Cinti S., Cerato C. (2008) Aspergillus flavus transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and β - thio0glucosidase. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 2170-2173

51. García-Lafuente A., Moro C., Manchón N., Gonzalo-Ruiz A., Villares A., Guillamón E., Rostagno M., Mateo-Vivaracho L., (2014) *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*. 161: 216-223

52. Gaziano J.M. (2009) Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physician's Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*. 301: 52-62

53. George S.M., Park Y., Leitzmann M.F. (2009) Fruit and vegetable intake and risk of cancer: a prospective cohort study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 89: 347-353

54. Giudice A., Montella M. (2006) Activation of the Nrf2-ARE signaling path- way: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays*, 28: 169-181

55. Glatt H., Baasanjev-Gerber C., Schumacher F., Monien B., Schreiner M., Frank H., Seidel A., Engst W. (2011) 1-Methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate; a potent genotoxicant in bacterial and mammalian cells: mechanisms of bioactivation. *Chemico-biological Interactions*. 192: 81-86

56. Gokhale S.V., Lele S.S. (2014). Betalain content and antioxidant activity of Beta vulgaris: Effect of hot air convective drying and storage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 38: 585–590.

57. Gouda M., Moustafa A., Hussein L., Hamza M. (2016) Three week dietary intervention using apricots, pomegranate juice or/and fermented sour soya and impact on biomarkers of antioxidative activity, oxidative stress and erythrocytic glutathione transferase activity among adults. *Nutrition Journal*. 15: 52-62

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

58. Graham S., Marshall J., Mettlin C., Rzepka T., Nemoto T., Byres T. (1982) Diet in the epidemiology of breast cancer. *American Journal of Epidemiology*. 116: 68-75

59. Hadi S.M., Ullah M.F., Azmi A.S., Ahmad A., Shamim U., Zubair H., Khan H.Y. (2010) Resveratrol mobilizes endogenous copper in human eripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer. *Pharmacology Research*. 7: 979-988.

60. Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Trans*actions. 35: 1147-1150

61. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57–70

62. Hernández-García D. Wood C.D. Castro-Obregón S. Covarrubias L. (2010) Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology & Medicine*. 49: 130–143

63. Hung H.C., Joshipura K.J., Jiang R. (2004) Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of National Cancer Institute*. 96: 1577-1584

64. Jacobs D.R., Steffen L.M. (2003) Nutrients, foods, and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 78: 508-513

65. Jacobs D.R. (2006) Challenges in research in nutritional epidemiology. *Nutritional health: strategies for disease prevention*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press. 25-35

66. Jacobs D.R., Gross M.D., Tapsell T.C. (2009) Food Synergy: and operational concept for understanding nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 89: 1543-1548

67. Jacobs D.R., Tapsell L.C., Temple N.J. (2012) Food synergy: the key to balancing the nutrition research effort. *Public Health Reviews*. 33: 507- 29

68. Jelenc M., Van Hoof E., Albrecht T., Meglic M., Krnel S. (2012) Action European Partnership fo Action Against Cancer. *Archives of Public Health*. 70: 24-30

69. Jelenc N., Van Hoof E., Albreht T., Meglic M., Seljak M., Krnel S.R. (2012) Joint action European Partnership for Action Against Cancer. *Archives of Public Health*. 70: 24-27

70. Jennings A., Welch A.A., Fairweather-Tait S.J., Kay C., Minihane A.M., Chowienczyk P., Jiang B., Cecelja M., Spector T., Macgregor A., Cassidy A. (2012) Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 96: 781-788.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

71. Karadag A., Ozcelik B., Saner S. (2009) Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*. 2:41–60

72. Kaur M., Kaur A., Sharma R. (2012). Pharmacological actions of Opuntia ficus indica: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2: 15-18.

73. Kayama Y., Raaz U., JAgger A., Adam M., Schellinger I.N., Sakamoto M., Suzuki H., Toyama K., Spin J.M., Tsao P.S. (2015) Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *International Journal of Molecular Science*. 16: 25234-25263

74. Kelloff G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Jaye, I.A., Viner, J.L., Sigman, C.C. (2000) Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. *The Journal of Nutrition*. 130: 467-471

75. Kim H., Choi H., Moon J.Y., Kim Y.S., Mosaddik A., Cho S.K. (2011) Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. *Journal of Food Sciences*. 76: 38-45

76. Kirsh V.A., Peters U., Mayne S.T., Subar A.F., Chatterjee N., Johnson C.C., Hayes R.B. (2007) Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostatę cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 99: 1200-1209

77. Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrijm G., (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*. 363: 89-96

78. Klewicka E. (2012). Betacyanins – bioavailability and biological activity. *Food Science. Technology. Quality*. 2: 5-21.

79. Korge P., Calmettes G., Weiss J.N. (2015) Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochimica et Biophisica Acta*. 1847: 514-525

80. Koss-Mikołajczyk I., Kusznierewicz B., Namieśnik J., Bartoszek A. (2015). Juices from non-typical edible fruits as health-promoting acidity regulators for food industry. *LWT – Food Science and Technology*. 64: 845-852

81. Koss-Mikołajczyk I., Pilipczuk T., Lewandowska A., Kusznierewicz B., Bartoszek A. (2016). Composition of bioactive secondary metabolites and mutagenicity of elderberry (*Sambucus nigra* L.) fruits at different stages of ripeness. *Acta Alimentaria*. 45: 442-451

82. Krajka-Kuźniak V., Paluszczak J., Szaefer H., Baer-Dubowska W. (2013) Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *British Journal of Nutr*ition. 110: 2138-2149

83. Kuang,Y., Chen Y. (2004) Induction of apoptosis in a non-small human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with p53 and p21. *Food and Chemical Toxicology*. 42: 1711-1718

84. Kushi L.H., Meyer K.A., Jacobs D.R. (1999) Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 70: 451–458

85. Kusznierewicz B., Piasek A., Bartoszek A., Namieśnik J. (2011). Application of a commercially available derivatization instrument and commonly used reagents to HPLC on-line determination of antioxidants. *Journal of Food Composition and Anal*ysis. 24: 1073–1080

86. Kusznierewicz B., Piekarska A., Mrugalska B., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A. (2012) Phenolic composition and antioxidant properties of polish blue-berried honeysuckle genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC postcolumn derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 1755-1763.

87. Kusznierewicz B., Iori R., Namieśnik J., Bartoszek A. (2013) Convenient identification of desulfoglucosinolates on the basis of mass spectra obtained during liquid chromatography-diode array electrospray ionisation mass spectrometry analysis: method verification for sprouts of different Brassicacae species extracts. *Journal of Chromatography A*. 1278 (22): 108-115

88. Le Marchand L., Yoshizawa C.N., Kolonel L.N., Hankin J.H., Goodman M.T. (1989) Vegetable consumption and lung cancer risk. A population-based case-control study in Haweaii. *Journal of the National Cancer Institute*. 81: 1158-1164

89. Lee J.S., Surh Y.J. (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemopre- vention. *Cancer Letters,* 224: 171-184

90. Levine N. (1997) Trial of retinol isotretinoin I skin cancer prevention: a randomized, double-blind, controlled trial. Southwest Skin Cancer Prevention Study Group. Cancer Epidemiology. *Biomarkers & Prevention*. 6: 957-961

91. Li H., Horke S., Förstermann U. (2013) Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*. 34: 313-319

92. Li W., Guo Y., Zhang C., Wu R., Yuquing-Yang A., Gaspar J., Kong A.T. (2016) Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a perspective on oxidative stress, inflammation, and epigenetics. *Chemical Research in Toxicology*. 29: 2071-1095

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

93. Liége Alves de Souza R., Santana M.F.S., Macedo E.M.S., Sousa de Brito E., Correla R.T.P. (2015) Physicochemical, bioactive and functional evaluation of the exotic fruits Opuntia ficus indica and Pilosocereus pachycladus Ritter from Brazilian caatinga. *Journal of Food Science and Technol*ology. 52: 7329-7336.

94. Liu R.H. (2003) Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*. 78: 517-520

95. Liu R.H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention mechanism of action. *The Journal of Nutrition*. 134: 3479-3485

96. Liu R.H., Liu J., Chen B. (2005) Apples prevent mammary tumors in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 2341–2343

97. López-Otin C., Blasco M.A., Serrano M., Kroemer G., (2013) The hallmarks of aging. *Cell*. 153: 1194-1217

98. Loub W., Wattenberg L., Davis D. (1975) Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occuring indoles of crucifrous plants. *Journal of the National Cancer Institute*. 54: 985-988

99. Määttä K., Kamal-Eldin A., Törrönen R. (2001) Phenolic compounds in berries of black, red, green and white currants (*Ribes* sp.) *Antioxidant Redox Signaingl*. 3: 981-993

100. Magesh S., Chen Y., Hu L. (2012) Small molecule modulators of Keap1- Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews*. 32: 687-726

101. Manchali S., Murthy K.N.C., Patil B.S., (2012) Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *Journal of Functional Foods*. 4: 94-106

102. Matsufuji H., Ishikawa K., Nunomura O., Chino M., Takeda M. (2007) Enti-oxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annum* L.) *International Journal of Food Science and Technology*. 42: 1482-1488

103. McCullough M.L., Peterson J.J., Patel R., Jacques P.F., Shah R., Dwyer J.T. (2012) Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 95: 454-464

104. Mehta R.G., Murillo G., Naithani R., Peng X. (2010) Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come. *Pharmacological Research*. 27: 950-961

105. Merrlin C., Graham S. (1979) Dietary risk factors in human bladder cancer. *American Journal of Epidemiology*. 110: 255-263

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

106.Mi L., Xiao Z., Hood B., Dakshanamurthy S., Wang X., Govind S. (2008) Covalent binding to tubulin by isothiocyanates. A mechanism of cell growth arrest and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 283: 22136-22146

107.Mohanty P., Hamouda W., Garg R., Aljada A., Ghanim H., Dandona P. (2000) Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. *85: 2970-2973*

108.Moon T.E. (1998) Effect of retinol in preventing squamous cell skin cancer in moderate risk ubjects: a randomized, double-blind, controlled trial. Southwest Skin Cancer Prevention Study Group. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 6: 949-956

109.Morant A.V., Jørgensen K., Jørgensen C., Paquette S.M., Sánchez-Pérez R., Møller B.L., Bak S., (2008) Beta-glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*. 69: 1795-1813

110.Nugent R. (20008) Chronic diseases in developing countries. Health and economics burdens. *Annuals of New York Academy of Sciences*. 1136: 70-79

111.Olsen G., Mandel J., Gibson R., Wattenberg L., Schuman L. (1989) A case-control study of pancreatic cancer and cigarettes, alcohol, coffee and diet. *American Journal of Public Health*. 79: 1016-1019

112.Omenn G.S., (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*. 334: 1150-1155

113.Peters U. (2008) Vitamin E and selenium supplementation and risk of prostate cancer in the VITamins And Lifestyle (VITAL) study cohort. *Cancer Causes Control*. 19: 101-107

114.Phisut N., Jiraporn B. (2013). Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution. *International Food Research Journal*. 20: 1077-1085.

115.Piasek A., Bartoszek A., Namiesnik J. (2009) Substancje pochodzenia roślinnego przeciwdziałające kardiotoksyczności towarzyszącej chemioterapii nowotworów. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 63: 142-458

116.Piekarska A., Kołodziejski D., Pilipczuk T., Bodnar M., Konieczka P., Kusznierewicz B., Bartoszek A. (2014). The influence of selenium addition during germination of Brassica seeds on health-promoting potential of sprouts. *Food Sciences and Nutrition*. 65: 692-702

117.Pilipczuk T., Dawidowska N., Kusznierewicz B., Namieśnik J., Bartoszek A.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

(2015) Simultaneous determination of indolic compounds in plant extracts by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection. *Food Analytical Methods*. 8: 2169-2178

118. Pilipczuk T., Kusznierewicz B., Chmiel T., Przychodzeń W., Bartoszek A. (2016) Simultaneous determination of individual isothiocyanates in plant samples by HPLC-DAD-MS following SPE and derivatization with *N*-acetyl-l-cysteine. *Food Chemistry*. 214: 587-596

119. Poleska-Muchlado Z., Piekarska A., Szczygłowska M., Pilipczuk T., Namieśnik J., Konieczka P., Kusznierewicz B., Bartoszek A. (2013). The comparison of biological potential of white cabbage varieties using the Accumulated Survival Index (ASI) concept. *EuroFoodChem XVII Book of abstracts,* 595-595, Personal communication

120. Popkin B.M., Nielsen S.J. (2003) The sweetening of the world's diets. *Obesity Research*. 11: 1325–1332

121. Popkin B.M. (1993) Nutritional patterns and transitions. *Population and Development Review*. 19: 138–57

122. Popolo A., Autore G., Pinto A., Marzocco S. (2013) Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronić renal failure. *Free Radical Research*. 47: 346-356

123. Potter J.D. (2014) The failure of cancer prevention. *Carcinogenesis*. 35: 974-982

124. Rahman T., Hosen I., Islam M.M.T., Shekhar H.U. (2012) Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3: 997-1019

125. Russo G.L. (2007) Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer prevention. *Biochemical Pharmacology*. *74: 533-544*

126. Sánchez-Salceo E.M., Mena P., García-Viguera C., Martínez J.J., Hernandéz F. (2015) Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point fo the assessment of their beneficial properties. *Journal of Functional Foods*. 12: 399-408

127. Sawicki T., Bączek N., Wiczkowski W. (2016) Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods*. 27: 249-261

128. Schieber M., Chandel N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress.. *Current Biology*. 24: 453-462

129. Seeram N.P., Adams L.S., Henning S.M. (2005) In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

tannin extract are enhanced in combination with other poly- phenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 16: 360–367.

130. Shibata A., Paganini-Hill A., Ross R.K., Henderson B.E. (1992) Intake of vegetables, fruits, beta-carotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: a prospective study. *British Journal of Cancer*. 66: 673-679

131. Shon M., Choi S., Kahng G., Nam S., Sung N. (2004) Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chemical Toxicology*. 42: 659-666

132. Shu X., Gao Y., Yuan J., Ziegler R., Brinton L. (1989) Dietary factors and epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 59: 92-96

133. Sies H. (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Journal of Redox Biology*. 4: 180–183

134. Siti H.N., Karnisah Y., Karnisah J. (2015) The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*. 71: 40-56

135. Smeriglio A., Barreca D., Bellocco E., Trombetta D. (2016) Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. Phytotherapy Research. 30: 1265-1286

136. Sporn MB, Suh N. (2002) Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2: 537–543.

137. Sporn M.B. (1976) Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Research*. 36:2699–2702

138. Srivastava S., Singh S. (2004) Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B actition in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*. 25: 1701-1709

139. Stacewicz-Sapuntzakis M., Bowen P.E. (2005) Role of lycopene and tomato products in prostate health. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1740: 202–205

140. Steinmetz K.A., Potter J.D. (1996) Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*. 96: 1027–1039

141. Steinmetz K.A., Potter J.D., Folsom A.R. (1993) Vegetables, fruits and lung cancer in the Iowa Woma's Health Study. *Cancer Research*. 53: 536-543

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

142. Stintzing F.C., Schreiber A., Carle R. (2002) Identification of betalains from yellow beet (Beta vulgaris L.) and cactus pear [Opuntia ficus indica (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2302-2307.

143. Sumaya-Martínez M.T., Cruz-Jaime S., Madrigal-Santillán E., García-Peredes J.D., Cariño-Cortés R., Cruz-Cansino N., Valadez-Vega C., Martinez-Cardenas L., Alanís-García E. (2011) Betalain, acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of Purple, red, yellow and white cactus pear. *International Journal of Molecular Science*. 12: 6452-6468

144. Surh Y.J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*. 3: 768–780

145. Śmiechowska, A., Bartoszek, A., Namieśnik, J. (2008) Cancer chemoprevention agents: Glucosinolates and their decomposition products in white cabbage (Brassica oleracea var. capitata). *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 62: 325-332

146. Tesoriere L., Fazzari M., Angileri F., Gentile, C., Livrea M.A. (2008). In vitro digestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 10487-10492.

147. Ulrich C.M. (2007) Folate and cancer timing is everything. *JAMA*. 297: 2408-2409

148. Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266: 37-56

149. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Mini-review. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1-40

150. Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M.D., (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44-84

151. Van Dam R.M., Rimm E.B., Willett W.C., Stampfer M.J., Hu F.B. (2002) Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. *Annals of Internal Medicine*. 136: 201–209

152. Vig A., Rampa G., Thind T., Arora S., (2009) Bio-protective effects of glucosinolates – a review. *LWT- Food Science and Technology*. 42: 1561-1572

153. Vinson J.A., Hao Y., Su X., Zubik L. (1998) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

3630-3634.

154.Wald N. (1980) Low serum-vitamin A and subsequent risk of cancer. Preliminary results of a prospective study. *Lancet*. 2: 813-815

155.Waterborg J.H. (2009). The Lowry method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*. 7-10.

156.Wattenberg L., Loub W. (1978) Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occuring indoles. *Cencer Research*. 38: 1410-1413

157.Wen L., Guo X., Liu R.H, You L., Abbasi A.M., Fu X. (2015) Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn ''Crataegus pinnatifida''. *Food Chemistry*. 186: 54–62

158.Wettasinghe M., Bolling B., Plhak L., Xiao H., Parkin K. (2002). Phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of beetroot (Beta vulgaris L.) extracts from phenotypes of different pigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6704-6709.

159.Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Sawicki T., Mitrus J., Kasprzykowski Z., Horbowicz M. (2016). Profile of phenolic acids and antioxidant capacity in organs of common buckwheat sprout. *Acta Alimentaria*. 45, 250-257

160.Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Topolska J. (2013). Red cabbage anthocyanins: profile, isolation, identyfication, and antioxidant activity. *Food Research International*. 51: 303-309

161.Wittstock U., Agerbirk N., Stauber E.J., Olsen C.E., Hippler M., Mitchell-Olds T., Gershenson J., Vogel H. (2004) Succesful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceeding of the National Academy of Science*. 101: 4859-4864

162.Wolfe K.L., Rui H.L. (2007) Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8896-8907

163.WHO, World Health Organization (2014) Global Status Report on noncommunicable diseases 2014.

164.Yang B., Kortesniemi M. (2015) Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Current Opinion in Food Science*. 2: 36-42

165.Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S. (2004) Flavonoids and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. 59: 113-122

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

166. Young-Woong K., Byzova T.V. (2014) Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 123: 625-631

167. Yousuf B., Gul K., Wani A.A., Singh P. (2016) Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review.*Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56: 2223-2230

168. Zhang Y., Wade K.L., Prestera T., Talalay P. (1996) Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzodithiol. *Analytical Biochemistry*. 239: 160-167

169. Zhang Z., Ober J., Kliebestein D. (2006) The gene controlling the quantitative trait locus epithiospecifier modifier 1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 18: 1524-1536

170. Zhou C., Xu C., Sun C., Li X., Chen K. (2007) Carotenoids in white- and red-fleshed loquat fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7822-7830

171. Zia-Ul-Haq M., Ćavar S., Qayum M., Imran I., De Feo V. (2011). Compositional studies: antioxidant and antidiabetic activities of Capparis decidua (Forsk.) Edgew. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 8846-8861

172. Zielińska-Przyjemska M., Olejnik A., Kostrzewa A., Łuczak M., Jagodziński P.P., Baer-Dubowska W. (2012). The Beetroot Component Betanin Modulates ROS Production, DNA Damage and Apoptosis in Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Phytotherapy Research*. 26: 845–852

173. Zou D., Brewer M., Garcia F., Feugang J.M., Wang I., Zang R. (2014). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*. 4: 25-37

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

1. **Koss-Mikołajczyk I.,** Kusznierewicz B., Bartoszek A., (2014) Comparison of the content of phenolic compounds and antioxidant activity of white, red and black currants (Ribes sp.) extracts. *Camera Separatoria. 6:* 5-10

2. **Koss-Mikołajczyk I.,** Kusznierewicz B., Namieśnik J., Bartoszek A., (2015) Juices from non-typical edible fruits as health-promoting acidity regulators for food industry. *LWT- Food Science and Technology. 64*: 845-852

3. **Koss-Mikołajczyk I.,** Lewandowska A., Pilipczuk T., Kusznierewicz B., Bartoszek A., (2016) Composition of bioactive secondary metabolites and mutagenicity of *Sambucus nigra* L. fruit at different stages of ripeness. *Acta Alimentaria. 45:* 443-452

4. **Koss-Mikołajczyk I.,** Baranowska M., Namieśnik J., Bartoszek A., (2017) Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fitozwiązków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* , 71: 602-617

Monografie i druki zwarte:

1. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2011) Juices from untypical edible fruits as acidity regulators for food industry. Verification of health promoting properties. Comparison with typical acidity regulators. *14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Anvances in Chemical and Mechanical Engineering"*. 1: 340-347

Komunikaty ustne

1. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2011) Juices from untypical edible fruits as acidity regulators for food industry. Verification of health promoting properties. Comparison with typical acidity regulators. *14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Anvances in Chemical and Mechanical Engineering"*. Gdańsk, Polska

2. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2013) Ocena wpływu fitokompleksu na wybrane wyróżniki świadczące o prozdrowotnym działaniu bioaktywnych fitozwiązków wykorzystywanych jako surowce do produkcji żywności funkcjonalnej. *Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej,* Gdańsk, Polska

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

3. **Koss-Mikołajczyk I.,** Kusznierewicz B., Bartoszek A., (2014) Porównanie zawartości związków fenolowych oraz aktywności biologicznej ekstraktów z żółtych i czerwonych malin (Rubus idaeus L.). *Miedzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne : Symbioza*. Warszawa, Polska

4. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2014) Ocena wpływu matrycy żywieniowej na wybrane wyróżniki świadczące o prozdrowotnym działaniu bioaktywnych fitozwiązków wykorzystywanych jako surowce do produkcji żywności funcjonalnej. *Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej,* Gdańsk, Polska

5. **Koss-Mikołajczyk I.,** Kusznierewicz B., Bartoszek A. (2015) Relationship between the betalain composition in Opuncia ficus indica and Beta vulgaris varieties and biological activity of their extracts. *Frontiers in cancer prevention,* Gdańsk, Polska

6. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2015) Ocena wpływu matrycy żywieniowej na wybrane wyróżniki świadczące o prozdrowotnym działaniu bioaktywnych fitozwiązków wykorzystywanych jako surowce do produkcji żywności funcjonalnej.*Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej,* Gdańsk, Polska

7. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2016) Induction of phase II detoxification enzymes by fruit extracts rich in anthocyanins. *2nd Summer School on Nutrigenomics,* Camerino, Włochy

8. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2016) Aktywność chemoprewencyjna wybranych bioaktywnych fitozwiązków na tle metabolomu zawierających je roślin. *Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej,* Gdańsk, Polska

9. **Koss-Mikołajczyk I.,** Wiczkowski W., Sawicki T., Bartoszek A., (2017) The influence of food matrix on biological activity of extracts from betalain containing plants. *IUBMB Advanced School – A molecular view of the food-health relationship. Spetses, Grecja*

10. **Koss-Mikołajczyk I.,** Bartoszek A., (2017) Wpływ składników matrycy żywieniowej na aktywność biologiczną fitozwiązków roślin z rodziny Brassica. *XLIII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu Polskiej Akademii Nauk „Żywność dla przyszłości",* Wrocław, Polska

11. **Koss-Mikołajczyk I.,** (2017) Porównanie potencjału chemoprewencyjnego wybranych odmian roślin jadalnych. *Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium*

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, Polska

Doniesienia konferencyjne

1. **Koss-Mikołajczyk I.,** Röhrig T., Richling E., Bartoszek A., (2013) The influence of food phytochemicals on cyclic phosphodiesterase 4 (PDE4) activity. *48 Zjazjd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego*. Toruń, Polska

2. Pilipczuk T., **Koss-Mikołajczyk I.,** Dawidowska N., Osowicka M., Bartoszek A., (2014) Determination of the content of glucosinolates, isothiocyanates and indoles in white, green and violet cauliflower in relation to biological activity. *9th International Symposium on Chromatography of Natural Products*. Lublin, Polska

3. **Koss-Mikołajczyk I.,** Kusznierewicz B., Bartoszek A., (2014) Comparison of the content of phenolic compounds and biological activity of white, red and black currants (Ribes sp.) extracts. *9th International Symposium on Chromatography of Natural Products*. Lublin, Polska

4. Pilipczuk T., **Koss-Mikołajczyk I.,** Dawidowska N., Osowicka M., Bartoszek A., (2014) Zależność między składem produktów hydrolizy glukozynolanów a potencjałem biologicznym ekstraktów z wybranych roślin Brassica. III *Miedzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne : Symbioza*. Warszawa, Polska

5. **Koss-Mikołajczyk I.,** Lezner K., Kusznierewicz B., Bartoszek A., (2015) The influence of sterilization with EnbioJet Microwave Flow Pasteurizer on composition of phytocomplex and biological activity of blue-berried honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var *edulis*) pulp. *4th International Conference on Food Digestion*. Neapol, Włochy

6. Wieczerzak M., Kudłak B., **Koss-Mikołajczyk I.,** Namieśnik J., (2015) The role of the sewage treatment plant in the removal of genotoxic compounds from the environment. *Frontiers in cancer prevention,* Gdańsk, Polska

7. Kusznierewicz B., **Koss-Mikołajczyk I.,** Pilipczuk T., Lewandowska A., Bartoszek A., (2015) Composition of bioactive secondary metabolites and mutagenicity of elderberry (*Sambucus nigra* L.) fruits at different stages of ripeness, *58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego,* Gdańsk, Polska

8. **Koss-Mikołajczyk I.,** Pilipczuk T., Kusznierewicz B., Hanschen F., Dawidowska N., Osowicka M., Zieliński D., Bartoszek A., (2015) Correlation of the phytome

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

composition of three cauliflower varieties with their biological activity. *EuroFoodChem,* Madryt, Hiszpania

9. **Koss-Mikołajczyk I.,** Jędrzejczyk M., Kusznierewicz B., Bartoszek A., (2016) The influence of composition of betalains on biological activity of prickly pears *(Opuntia ficus indica)* and beetroots (*Beta vulgaris). 10th International Symposium on Chromatography of Natural Products,* Lublin, Polska

10. **Koss-Mikołajczyk I.,** Kusznierewicz B., Bartoszek A., (2016) Phenolic compounds composition and antioxidant activity of different varieties of Mirabelle plum fruits (*P. domestica* L., spp. *insititia, var. cerea). Porto Polyphenols 2016,* Porto, Portugalia

11. **Koss-Mikołajczyk I.,** Kusznierewicz B., Bartoszek A. (2016) *In vitro* evaluation of anticarcinogenic and antidiabetic activity of fruit extracts rich in anthocyanins. *1st International Conference on Food Bioactives and Health*. Norwich, Wielka Brytania

Granty

1. Grant: 2015/19/N/NZ9/02921 Porównanie potencjału chemoprewencyjnego różnych odmian wybranych owoców jadalnych w ramach konkursu PRELUDIUM 10 – kierownik i główny wykonawca

2. Grant: LIDER/029/605/L- 4/12/NCBR/2013 Wykorzystanie technologii mikrofalowych w przetwórstwie warzyw i owoców w celu uzyskania produktów żywnościowych o wysokiej jakości zdrowotnej (VEGFRUT) – wykonawca

3. Grant: ERA-NET SUSFOOD1 Zrównoważona produkcja żywności poprzez projakościową optymalizację produkcji surowców i technologii ich przetwarzania w celu uzyskania produktów warzywnych kategorii premium oraz półfabrykatów (SUNNIVA) - wykonawca

Staże zagraniczne i szkolenia

1. 20.11.2012-20.02.2013 Staż zagraniczny - LPP Erasmus, Kaiserslautern University of Technology, Wydział Chemii, grupa badawcza prof. Elke Richling, Kaiserslautern, Niemcy, Tytuł projektu badawczego: The influence of plant extracts on cyclic phosphodiesterase 4 (PDE4) activity.

2. 28.06.2015-28.09.2015 - 3-miesięczny staż w ramach programu InterPhD, Institute of Food Research w Norwich, grupa badawcza prof. Richarda Mithen, Norwich, Wielka Brytania, Tytuł projektu badawczego: Effect of broccoli bioactives on energy metabolism

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

3. 22.04.2013-26.042013 - The INFOGEST PhD Training School, Food Digestion and Human Health, Politechnika Gdańska, Gdańsk, Polska

4. 1.09.2014-4.09.2014 – 1st Summer school on nutrigenomics and nutrigenetics, Camerino, Włochy

5. 18.04.2015-19.04.2015 – kurs Podstawy prowadzenia hodowli komórkowych, Poznań, Poland

6. 24.06.2015-26.06.2015 – Summer School on Chemoprevention, Gdańsk, Polska

7. 5.09.2016-9.09.2016 – 2nd Summer school on nutrigenomics and nutrigenetics, Camerino, Włochy

Wyróżnienia i stypendia

1. Nagroda za najlepszą prezentację posterową w ramach sekcji: Biotechnologia i chemia żywności podczas konferencji: 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku za poster pt. „Composition of bioactive secondary metabolites and mutagenicity of elderberry (*Sambucus nigra* L.) fruits at different stages of ripeness"

2. Nagroda za najlepszą prezentację posterową od wydawnictwa Elsevier podczas konferencji 10th International Symposium on Chromatography of Natural Products w Lublinie za poster pt: The influence of composition of betalains on biological activity of prickly pears *(Opuntia ficus indica)* and beetroots (*Beta vulgaris)*.

3. Nagroda za najlepszy referat podczas konferencji XLIII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu Polskiej Akademii Nauk „Żywność dla przyszłości" we Wrocławiu za referat pt*:* Wpływ składników matrycy żywieniowej na aktywność biologiczną fitozwiązków roślin z rodziny Brassicacea.

4. 2012/13 - Stypendium z dotacji projakościowej

5. 2015/16 - Stypendium Rektora PG dla najlepszego doktoranta

6. 2016/17 - Stypendium Rektora PG dla najlepszego doktoranta

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl