

## Związki bioaktywne w owocach *Aronia melanocarpa* oraz ich potencjalne działanie przeciwwzapalne i przeciwmiadycowe.

Celem projektu jest wskazanie związków odpowiedzialnych za działanie biologiczne owoców aronii poprzez znalezienie korelacji pomiędzy składem chemicznym produktów (ekstrakty, soki), ich pojemnością antyoksydacyjną a działaniem przeciwwzapalnym i przeciwmiadycowym na komórkach róbłonka. Spodziewamy się, że standaryzowane preparaty, przygotowane na podstawie naszych wyników, w połączeniu ze zbilansowaną dietą, mogą mieć duże zastosowanie profilaktyczne chorób sercowo-naczyniowych, a także cukrzycy typu 2.

Aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa*) to cenny owoc jagodowy, ostatnio zyskuje popularność na całym świecie, także w formie zielonej herbaty (katechiny) i czerwonego wina (antocyjany). Pochodzi z Ameryki Północnej, w Polsce pojawił się w latach 70-tych, ale przez kilkadziesiąt lat selekcji wyhodowano u nas przemysłowe odmiany (Nero, Galicjanka/Eggert) o jednocześnie nie dojrzałych, dużych owocach nadających się do zbioru kombajnem. Jako gatunek uprawny, aronia czarnoowocowa ma niewielkie wymagania glebowe, jest odporna na choroby, szkodniki i mróz. Z tych powodów polecana jest do produkcji ekologicznej i wiele plantacji aronii w Polsce ma certyfikat ECO. W Polsce jest największy na świecie areal upraw, corocznie zbieramy ponad 50 000 ton. Ponieważ surowe owoce mają dojrzały smak, najczęściej aronię spożywa się w postaci przetworów, takich jak soki, dżemy, koncentraty soku czy wino, posiadające ciemno-czerwoną barwę. Niestety, w polskich sklepach trudno kupić sok z aronii, praktycznie cała produkcja jest kierowana na eksport. Ten polski skarb w niewystarczającym stopniu wspiera zdrowie Polaków i obywateli UE. Nie ma też promocji aronii i pokazania konsumentom jej prozdrowotnych właściwości. **Tymczasem aronia mogłaby przysłużyć się do obniżenia ryzyka chorób układu krążenia tworząc „polski paradoks”, podobnie jak czerwone wino i znany „francuski paradoks”.**

Aronia ma unikalny skład chemiczny – bogactwo cennych dla zdrowia związków polifenolowych o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. Są to: antocyjany, katechiny, procyanidyny, taniny, kwasy hydroksycynamonowe, w tym kwas chlorogenowy. Owoce aronii mogą zawierać 10-20 g polifenoli w 1 kg, w tym ok. 5 g antocyjanów. [1]. To jedno z najbogatszych źródeł antocyjanów w przyrodzie; nadające owocom intensywne, ciemny kolor. Polifenolowe antyoksydanty przeciwdziałają miażdżycy naczyń, poprawiają mikrokrążenie, zmniejszają kruchość naczyń, działają antyagregacyjnie na płytki krwi. Podawanie antocyjanów aronii powoduje istotne obniżenie ciśnienia krwi i zmniejszenie stresu oksydacyjnego. Zaobserwowano [2,3], że produkty aroniowe (ekstrakt aroniowy) korzystnie regulują poziom biomarkerów zespołu metabolicznego u pacjentów, wpływają na obniżenie stężenia całkowitego cholesterolu, cholesterolu frakcji LDL i triglicerydów u chorych. Antocyjany aroniowe mają także właściwości antymutagenne oraz radioprotekcyjne [4].

Ważną grupę związków w owocach stanowią garbniki, ich wysoka zawartość nadaje owocom aronii cierpki smak, ale jednocześnie nie powoduje ich odporności na procesy gnilne, dzięki czemu mogą być stosunkowo długo przechowywane po zbiorze. Związki te wykazują zdolność wiązania toksycznych metali i alkaloidów, posiadają także właściwości antyoksydacyjne i przeciwwzapalne. Należące do tej grupy procyanidyny oligomeryczne okazały się pomocne w zapobieganiu miażdżycy i zachorowaniu na cukrzycę typu 2, oraz wykazywały działanie przeciwzakrzepowe [5].

Kwasy fenolowe to kolejna grupa związków występujących w aronii. Wąжным przedstawicielem jest tu kwas chlorogenowy, spotykany także w dużych ilościach w kawie, nasionach kakaowca, owocach czarnej jagody, morwy i innych. Wykazuje on silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwwzapalne. Kwas chlorogenowy opóźnia także wchłanianie glukozy do krwi. Zaletą kwasów fenolowych jest dobra wchłanialność do organizmu.

Do tej pory w badaniach biologicznych *in vitro* i klinicznych stosowano sok lub ekstrakt z owoców. Wiele badań wykonano dla preparatu Aronox (obecnie nie jest produkowany) opisywanym jako „antocyjany aroniowe”, który zawierał 25% antocyjanów, 50% oligomerycznych procyanidyn i 9% kwasów fenolowych [3]. Nie ma prac pokazujących, jakie związki lub grupa związków z aronii jest odpowiedzialna za dany efekt biologiczny, ponieważ w każdej preparacie była ich złożona mieszanina. Niejednoznaczny wynik wielu badań klinicznych wynika z braku standaryzacji podawanych preparatów roślinnych. **Nowością w naszym projekcie jest to, że chcielibyśmy wykazać, które z substancji występujących w aronii są odpowiedzialne za działanie przeciwwzapalne i przeciwmiadycowe, wykorzystując nowoczesne metody statystyczne (chemometria).**

Planujemy nie tylko zbadać skład związków chemicznych występujących w dojrzałych owocach aronii, ale również określić zmienność składu w trakcie dojrzwania (od owoców zielonych do przemarzniętych) oraz w zależności od miejsca zbioru. Z pobranych próbek będą wykonane ekstrakty, które następnie zostaną poddane pomiarom metodami magnetycznego rezonansu jądrowego <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analiza HPLC umożliwi rozdzielenie mieszaniny na poszczególne składniki, ich identyfikację i oznaczenie ilościowe. Celem pomiarów NMR jest poznanie profilu związków obecnych w aronii, ich identyfikacja w widmach NMR. Wszystkie ekstrakty zostaną także przebadane pod kątem właściwości antyoksydacyjnych. Wykonane zostaną testy: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) oraz badanie zdolności zmiatania rodników przy użyciu metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Zaletą pomiarów EPR jest to, że można badać wszystkie próbki niezależnie od ich stanu skupienia, gęstości, koloru, w przeciwieństwie do spektrofotometrii UV/Vis, która wymaga płynnych, klarownych próbek.

Wyniki uzyskane z HPLC, NMR i pomiarów antyoksydacyjnych posłużą jako dane wejściowe do analizy chemometrycznej. Chemometria jest dziedziną zajmującą się wydobyciem użytecznej informacji z wielowymiarowych danych pomiarowych, wykorzystując metody statystyki i matematyki. Celem jest znalezienie powiązań i korelacji

pomiędzy zmiennymi. Opracowanie wyników NMR, HPLC, EPR z pomocą metod chemometrycznych (analiza głównych składowych (PCA), metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS)) umożliwi powiązanie składu chemicznego z właściwościami antyoksydacyjnymi, a następnie z wynikami testów *in vitro*.

W tym etapie pracy badano wpływ próbek aronii na funkcjonowanie komórek śródbłoka naczy krwionośnych (endothelium). Komórki te pełnią aktywny rolę w biologii naczy krwionośnych, m.in. w procesach krzepnięcia krwi, regulacji ciśnienia, w procesach miażdżycowych i zapalnych [5]. Nieprawidłowe działanie śródbłoka jest typowe dla wielu chorób naczyniowych, co prowadzi do miażdżycy. W naszych badaniach oceniane będzie działanie ochronne na śródbłonek naczyniowy, efekt przeciwzapalny oraz antyagregacyjny płytek. Analiza chemometryczna pozwoli na skorelowanie składu chemicznego podawanych próbek z ich działaniem na komórki, a w rezultacie na wyselekcjonowanie próbek aronii zawierających określone aktywne biologicznie składniki.

[1] Oszmiański J., Wojdyło A. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 2005; 221:809–813. [2] Broncel M., i in. Wpływ antocyjanin z aronii czarnoowocowej na ciśnienie tętnicze oraz stężenie endoteliny-1 i lipidów u pacjentów z zespołem metabolicznym. *Pol. Merk. Lek.* 2007; 134: 116–119. [3] M. Naruszewicz, i in. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infarction (MI). *Atherosclerosis* 2007, 194: 179–184. [4] K. G. Siorowski, K. i in., Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from Aronia melanocarpa fruits, *Cancer Lett.* 1997: 119 37-46. [5] Zapolska-Downar D. i in. Aronia melanocarpa fruit extract exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Eur. J. Nutr.* 2012, 51: 563-572.