

Wpływ fermentacji mlekowej na sok wiśniowy (*Prunus cerasus* L.): Skład flawonoli i aktywności zdrowotne

Celem naukowym projektu jest pogłębienie wiedzy dotyczącej flawonoli z wiśni pospolitej i ich aktywności biologicznych. Główna uwaga skupiona jest na flawonolach z fermentowanego soku wiśniowego, głównie aglikonach flawonolowych, co planuje się osiągnąć poprzez proces fermentacji z udziałem bakterii *Lactobacillus* sp. Bakterie kwasu mlekowego należą do mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania enzymu β -glukozydazy i hydrolizowania połączeń glikozydowych do wolnych aglikonów. Po zoptymalizowaniu procesu fermentacji zaplanowano charakterystykę składu otrzymanych soków przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS). Na koniec zostaną zbadane aktywności biologiczne zidentyfikowanych flawonoli z wykorzystaniem ich wzorców w analizach *in vitro* (aktywności przeciwutleniające, przeciwzapalne, anty-cholinesterazowe (anty-ChE) oraz zdolność hamowania agregacji amyloidu β (1-42)) oraz w modelu zwierzęcym – larwy i dorosłe ryby danio przegowanego (*Danio rerio*).

Opis badań. Biodostępność polifenoli po podaniu doustnym jest uzależniona od hydrolizy wiązania glikozydowego przez bakterie obecne w jelicie cienkim. Dodatkowo fermentacja mlekowa soku wiśniowego jest zasadna w celu szczegółowej charakterystyki jego składu flawonolowego. Dlatego też dobór odpowiednich szczepów bakterii (*Lactobacillus* sp.) wykazujących najwyższą aktywność β -glukozydazy może usprawnić proces fermentacji. Następnie zostanie przeprowadzona analiza profilu i zawartości flawonoli w otrzymanym soku metodą HPLC-MS. Zaplanowano również przeprowadzenie eksperymentu *in vivo* z wykorzystaniem larw rybek danio w celu oceny wpływu flawonoli z wiśni na ich zachowanie. Test ostrej toksyczności (FET) zostanie przeprowadzony w celu określenia zakresu skutecznych stężeń i dawki śmiertelnej wyrażonej wskaźnikiem LC50. Potencjalne działanie neuroprotektoryjne i neuronaprawcze flawonoli będzie badane w modelu larw rybek danio z neurodegeneracją wywołaną 6-OH-dopaminą (model choroby Parkinsona). Ocena wspomnianych wyżej aktywności biologicznych testami *in vitro* jest ważnym elementem projektu w celu zidentyfikowania flawonoli wykazujących działanie kluczowe dla potencjalnego leczenia zaburzeń neurodegeneracyjnych. Wreszcie 30-dniowemu działaniu flawonoli zostaną poddane 3-miesięczne rybki danio. Na koniec zaplanowano potwierdzenie obecności flawonoli w ich mózgach metodą HPLC-MS. Dodatkowo zostanie określona aktywność enzymów antyoksydacyjnych i cyklooksygenazy-2 (COX-2), wybranych markerów stanu zapalnego (IL-1 β , IL-6, TNF- α) oraz ekspresja genów (iNOS, NF- κ B, TNF- α) w mózgach, w celu zbadania wpływu flawonoli na homeostazę oksydacyjną i stan zapalny.

Uzasadnienie podjęcia badań. Wiele badań naukowych skupia się na poprawie jakości zdrowia publicznego ze względu na wysoką częstotliwość występowania chorób cywilizacyjnych. Jako przyczyny zaburzeń neurodegeneracyjnych wymienia się nadmierne reakcje wolnych rodników oraz nasilenie procesu zapalnego. Z kolei związkom fenolowym obecnym w żywności przypisuje się działania prozdrowotne. Dlatego biologiczne aktywności wiśni, tj. wysoka zawartość polifenoli, aktywność antyoksydacyjna, hamowanie aktywności cholinesteraz i COX-2, są przedmiotem naszego zainteresowania. Co więcej, flawonole z diety są cząsteczkami o znanym działaniu prozdrowotnym, tj. antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym i wielu innych. Nadal jednak poszukujemy odpowiedzi na pytanie dotyczące roli poszczególnych flawonoli w aktywnościach całego owocu. Wiadomo też, że biodostępność spożytych polifenoli zależy od hydrolizy wiązania glikozydowego. Dlatego zaproponowano fermentację soku przy użyciu wybranych bakterii *Lactobacillus* sp., która jest też istotna dla szczegółowej charakterystyki flawonoli. Rybki danio zostały wybrane do oceny toksyczności i aktywności neurobiologicznej flawonoli *in vivo*. Danio staje się bowiem coraz bardziej popularnym modelem zwierzęcym w badaniach przedklinicznych. Jego genom został w pełni zsekwencjonowany i wykazuje około 70% zgodność z genomem człowieka, jak również 80% zgodność genów zaangażowanych w patogenezę chorób człowieka. I wreszcie zainteresowanie aktywnością antyoksydacyjną flawonoli, anty-ChE, anty-COX-2 i ich zdolnością do hamowania agregacji amyloidu β (1-42) zostało zaplanowane z powodu amyloidowo-cholinergicznego hipotezy rozwoju choroby Alzheimera.

Spodziewane efekty. Wyniki będą doskonałym podsumowaniem licznych aktywności biologicznych poszczególnych flawonoli a nie złożonego ekstraktu. Zakłada się także uzyskanie odpowiedzi na dwa pytania: (i) w jakim stopniu rozmieszczenie podstawników w cząsteczce determinuje jej aktywności biologiczne; (ii) czy istotniejszą aktywność prozdrowotną wykażą pojedyncze flawonole czy raczej ich mieszanina? W efekcie uzyskamy informacje niezbędne do formułowania przyszłych zaleceń żywieniowych.