



Rycina 17. Wybrane kwiaty jadalne jako przykłady surowców polifenolowych.

Fot. Małgorzata Kalemba-Drożdż

ROZDZIAŁ 3.

OWOCE, JADALNE KWIATY I LIŚCIE DZIKICH ROŚLIN – SUROWCE POLIFENOLOWE DZIAŁAJĄ JAKO SKUTECZNE CZYNNIKI PRZECIWUTLENIAJĄCE I GENOPROTEKCYJNE

**Małgorzata Kalemba-Drożdż¹, Agnieszka Cierniak²,
Inga Kwiecień³**

¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0002-7017-3279

² Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0001-6537-2954

³ Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0002-9057-6198

DOI: 10.48269/978-83-66007-99-4-003

Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie badań nad właściwościami przeciwutleniającymi i genoprotekcyjnymi ekstraktów z dzikich owoców, kwiatów jadalnych i jadalnych chwastów, które mogą stanowić czynnik chemoprewencyjny.

Po pierwsze zanalizowano, czy soki bezpośrednio wyciskane z dzikich owoców, będące bogatym źródłem antyoksydantów takich jak: polifenole, flawonoidy, antocyjany, witamina C, mogą chronić DNA przed uszkodzeniami indukowanymi przez heterocykliczne aminy aromatyczne. Po drugie zbadano, jak różne formy tradycyjnie przygotowywanych ekstraktów roślinnych różnią się pod względem właściwości przeciwutleniających i genoprotekcyjnych. W tym celu z ziół i owoców przygotowano: napary, nalewki, maceraty i octy fermentowane. Po trzecie zanalizowano, czy ekstrakty z jadalnych kwiatów mogą działać ochronnie na DNA zapobiegając uszkodzeniom generowanym przez reaktywne formy tlenu oraz czy pospolite chwasty, używane również jako rośliny jadalne, mogą wykazywać działanie przeciwutleniające i cytoprotekcyjne.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że dzięki owocom, kwiatom i jadalnym pospolitym roślinom dzikorosnącym są cennymi surowcami o działaniu przeciwutleniającym, cytoprotekcyjnym i genoprotekcyjnym, a za ich właściwości prozdrowotne w największym stopniu odpowiadają związki polifenolowe.

Słowa kluczowe: jadalne kwiaty; dzikie rośliny jadalne; przeciwutleniacze; uszkodzenia DNA; chemoprewencja

Abstract

Fruits, edible flowers and leaves of wild plants – polyphenolic raw materials act as effective antioxidant and genoprotective agents

The aim of the study is to present research on the antioxidant and genoprotective properties of extracts from wild fruit, edible flowers and edible weeds, which may be considered chemopreventive factors.

Firstly, it was analyzed whether juices directly squeezed from wild fruits, which are a rich source of antioxidants such as: polyphenols, flavonoids, anthocyanins, vitamin C, could protect DNA against damage induced by heterocyclic aromatic amines. Secondly, it was investigated how different forms of traditionally prepared plant extracts differ according to their antioxidant and genoprotective properties. For this purpose four types of extracts were prepared from herbs and fruits: infusions, tinctures, macerates and fermented vinegars. Thirdly, the edible flower aqueous-ethanol extracts were analyzed to protect DNA against damage generated by reactive oxygen species, and whether common weeds, also used as edible plants, may have antioxidant and cytoprotective effect on human cells.

The conducted research confirmed that wild fruit, edible flowers and edible common wild plants are valuable materials with antioxidant, cytoprotective and genoprotective properties, and that polyphenolic compounds are the most responsible for their health-promoting properties.

Key words: edible flowers; edible wild plants; antioxidants; DNA damage; chemoprevention

Wprowadzenie

Materiał genetyczny podlega ciągłemu działaniu szkodliwych czynników chemicznych i fizycznych pochodzących zarówno ze środowiska, jak i z metabolizmu komórkowego. Ilość wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, najczęściej odpowiedzialnych za uszkodzanie DNA w komórce, zależy od intensywności ich powstawania oraz od efektywności systemów antyoksydacyjnych. Pokarm jako jeden z czynników środowiskowych może modulować procesy generowania oraz usuwania reaktywnych form tlenu, ponieważ wydajność wielu systemów ochronnych zależy od spożywanych składników odżywczych. Przy deficytach przeciwutleniaczy, substancji regulacyjnych i budulcowych pochodzących z diety akumulacji może ulegać ilość uszkodzeń struktur komórkowych, łącznie z materiałem genetycznym, które mogą prowadzić do negatywnych skutków zdrowotnych, m.in. do inicjacji procesów nowotworowych.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. World Health Organisation) szacuje, że około 35% nowotworów swoją etiologię wywodzi

z niewłaściwego sposobu odżywiania [WHO 2003, 2020]. Z jednej strony szczególną zależność zaobserwowano w przypadku spożycia mięsa czerwonego i przetworów mięsnych. Udowodniono, że obróbka termiczna żywności wysokobiałkowej, m.in. mięsa wołowego, drobiu i ryb, jest główną przyczyną powstawania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA, ang. *heterocyclic aromatic amines*), które to związki chemiczne charakteryzują się właściwościami mutagennymi i rakotwórczymi [El-Zein i wsp. 2006, Nakagama i wsp. 2005, Oz i wsp. 2010]. Ponadto związki te są obecne w środowisku, m.in. w dymie papierosowym, spalinach, ściekach komunalnych i wodach rzecznych [Jamali i wsp. 2016]. Co ważniejsze, HCA zostały znalezione w tkankach i płynach ustrojowych człowieka, co wskazuje na możliwość akumulacji tych toksycznych substancji w organizmie ludzkim [Nakagama i wsp. 2005]. HCA są klasyfikowane jako czynniki rakotwórcze u ludzi przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC, ang. International Agency for Research of Cancer). Według Europejskiego Prospektywnego Badania Raka i Żywienia (EPIC, ang. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) podczas przetwarzania mięsa najczęściej i w największych ilościach powstaje PhIP (2-amino-1-metylo-6-fenylomidazo(4,5-bi)pirydyna), a regularne spożywanie przetworzonego mięsa zwiększa ryzyko chorób układu krążenia i śmierci z powodu nowotworów [Rohrmann i wsp. 2009]. Z drugiej strony, liczne badania wskazują, że spożywanie warzyw i owoców zmniejsza ryzyko nowotworów oraz przedwczesnego zgonu [Vanamala 2015, Afrin i wsp. 2016, Aqil i wsp. 2016, de Carvalho i wsp. 2016]. Spożycie owoców i warzyw może hamować rozwój nowotworów poprzez zmniejszenie ilości uszkodzeń wprowadzanych do DNA w wyniku stresu oksydacyjnego, wsparcie procesów naprawy DNA [López-Romero i wsp. 2018], hamowanie enzymów prooksydacyjnych [Wu i Tian 2017], hamowanie angiogenezy poprzez wyciszanie szlaków sygnałowych czynników wzrostowych [Baba i wsp. 2016], a także na drodze indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych [Deng i wsp. 2017]. Udowodniono, że grejpfruty, żurawina, granat, guawa, ananas i mango [Izquierdo-Vega i wsp. 2017], zielona herbata, czerwone wino, borówki, jeżyny, czerwone winogrona, kiwi, arbuz, pietruszka i szpinak [López-Romero i wsp. 2018] zapobiegają kancerogenezie. Wykazano, że sok z jabłek, rozmaryn i ekstrakt

z pestek winogron przeciwdziałają tworzeniu się HCA [Cheng i wsp. 2007], natomiast czereśnie, borówki i czarna porzeczka zapobiegają uszkodzeniom DNA indukowanym przez HCA poprzez modulację aktywności enzymów detoksyfikacyjnych I fazy [Platt i wsp. 2010]. Genotoksyczność HCA zmniejszają również składniki herbaty, soi i kurkumy [Zhao i wsp. 2017, Cierniak i wsp. 2017, 2018], jednakże stosunkowo słabo są przebadane właściwości chemoprotekcyjne dzikich owoców z półkuli północnej. Ponadto warzywa są źródłem kwasu foliowego niezbędnego do syntezy nukleotydów, stanowiących nieodzowny substrat do procesu naprawy DNA [Kalemba-Drożdż 2010].

W strefie klimatu umiarkowanego średnich szerokości geograficznych i strefach podbiegunowych, gdzie świeże owoce i zioła nie są dostępne przez cały rok, sezonowe produkty roślinne są przetwarzane na przetwory, takie jak dżemy, syropy, kompoty, marynaty i nalewki. Tradycyjne metody ekstrakcji składników aktywnych z owoców i ziół opierają się głównie na ich macerowaniu w etanolu (nalewki/intrakty) lub konserwowaniu cukrem bądź octem. Alternatywnym sposobem przetwarzania owoców i ziół do celów kulinarnych i prozdrowotnych, zdobywającym obecnie coraz większą popularność, jest pseudofermentacja octowa.

Dzikie owoce były elementem tradycyjnej diety w poprzednich pokoleniach, ale obecnie są składnikami raczej mało popularnymi, wykorzystywanymi głównie przez konsumentów preferujących ekologiczny styl życia. Podobnie sytuacja wygląda z dzikimi roślinami powszechnie uważanymi za chwasty, jak: mniszek lekarski (*Taraxacum officinale*), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*), szczaw zwyczajny (*Rumex acetosa*), które kiedyś były wykorzystywane jako pożywienie [Łuczaj 2011, Łuczaj i Szymański 2007, Molina i wsp. 2014, Pasta i wsp. 2020, Vorstenbosch i wsp. 2017, Biscotti i Pieroni 2015, Cucinotta i Pieroni 2018], jednak obecnie ich zastosowanie jest bardzo ograniczone, głównie do ziołowych naparów pijanych w celach prozdrowotnych [Chevalier i wsp. 2014].

Jadalne kwiaty, choć wydają się modną nowinką kulinarną, są obecne od wieków w kuchni europejskiej [W.M 1655, Matyjaszczyk i Śmiechowaska 2019, Kalemba-Drożdż 2019b]. Jedzenie kwiatów ma wielowiekową tradycję również w kulturze kulinarnej Azji i Bliskiego Wschodu, a także w zwyczajach rdzennych Amerykanów. We współczesnej kuchni

kwiaty ponownie wydają się zyskiwać na popularności służąc jako dekoracja potraw, przyprawa lub składnik dań, tym samym poprawiając ich walory estetyczne, zapachowe i smakowe [Kalemba-Drożdż 2021a]. Jadalne kwiaty mogą przynieść liczne korzyści zdrowotne wynikające z wysokiej zawartości polifenoli, szczególnie antocyjanów i innych flawonoidów, a także z witamin, karotenoidów, związków terpenowych i związków mineralnych [Ayoobi i wsp. 2017, Fairlie-Jones i wsp. 2017, Kalemba-Drożdż i Cierniak 2019, Loizzo i wsp. 2016, Navarro-González i wsp. 2014, Park i wsp. 2017, Pinela i wsp. 2017, Pires i wsp. 2018, Rachkeeree i wsp. 2018, Valsalam i wsp. 2019, Wang i wsp. 2017].

Celem przeprowadzonych analiz było określenie potencjalnie genoprotekcyjnego działania różnych form ekstraktów z roślin jadalnych.

Pierwszym etapem było zbadanie, czy soki wyciskane z dzikich owoców mogą chronić DNA limfocytów zdrowych osób przed genotoksycznym działaniem heterocyklicznej aminy PhIP. Oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych, flawonoidów, antocyjanów i witaminy C, siłę redukcyjną i aktywność antyoksydacyjną w sokach z owoców: aronii czarnej (*Aronia melanocarpa*), bzu czarnego (*Sambucus nigra*), borówki czarnej (*Vaccinium myrtillus*), jeżyny fałdowanej (*Rubus plicatus*), maliny właściwej (*Rubus idaeus*), róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*) (rycina 1, s. 9), rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides*) i żurawiny błotnej (*Vaccinium oxycoccos*).

Kolejnym krokiem było porównanie różnych form ekstraktów odzwierciedlających tradycyjne kulinarne sposoby przetwarzania owoców i ziół przygotowanych z tych samych partii materiału roślinnego. Analizowano fermentowane octy, maceraty octowe, odvary i nalewki pod kątem ich składu fitochemicznego, właściwości przeciwutleniających i zdolności do zapobiegania uszkodzeniom DNA. Do porównania właściwości różnych typów ekstraktów wykorzystano maliny właściwe (*Rubus idaeus*), owoce dzikiej róży (*Rosa canina*), jabłka (*Malus domestica*), lawendę wąskolistną (*Lavandula angustifolia*), mięte pieprzową (*Mentha piperita*) oraz płatki róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*).

Do analizy właściwości jadalnych dzikich roślin kwiatów wybrano 1-procentowe ekstrakty etanoloowo-wodne z następujących kwiatów: malwa różowa (*Alcea rosea*), stokrotka pospolita (*Bellis perennis*), nagietek lekarski (*Calendula officinalis*), wrzos zwyczajny (*Calluna vulgaris*), chaber bławatek (*Centaurea cyanus*), słonecznik zwyczajny (*Helianthus*

annuus), liliowiec ogrodowy (*Hemerocallis xhybrida*), lawenda wąskolistna (*Lavandula angustifolia*), rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*), pysznogłówka szkarłatna (*Monarda didyma*), pierwiosnek bezłodygowy (*Primula vulgaris*), róża damasceńska (*Rosa damascena*), róża pomarszczona (*Rosa rugosa*), bez czarny (*Sambucus nigra*), aksamitka rozpięrzchła (*Tagetes patula*), mniszek lekarski (*Taraxacum officinalis*), koniczyna czerwona (*Trifolium pratense*), nasturcja większa (*Tropaeolum majus*) i fiołek rogaty (*Viola cornuta*). Wybrane kwiaty jadalne przedstawiono na rycinie 17 (s. 49). Zbadano siłę antyoksydacyjną ekstraktów, zawartość polifenoli oraz działanie cytotoksyczne na limfocyty od zdrowego dawcy. Uszkodzenia oksydacyjne DNA limfocytów indukowano nadtlaniem wodoru i badano, czy ekstrakty kwiatowe wykazują działanie genoprotekcyjne.

Podobnie zbadano właściwości przeciwutleniające, cytotoksyczne i genotoksyczne/genoprotekcyjne 2-procentowych alkoholowo-wodnych ekstraktów ze świeżych liści wybranych dzikich roślin jadalnych rosnących pospolicie w Europie w klimacie umiarkowanym, którymi są: babka lancetowata (*Plantago lanceolata*), bluszczyk kurdybanek (*Glechoma hederacea*), mniszek lekarski (*Taraxacum officinalis*), podagrycznik pospolity (*Aegopodium podagraria*), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*), szczaw zwyczajny (*Rumex acetosa*).

Materiały i metody

Komórki

Krew dostarczono z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Transfuzji Krwi w Krakowie. Została ona oddana przez zdrowych dawców płci męskiej w wieku: 26, 34 i 36 lat, oraz kobiety w wieku 39 lat. Ludzkie limfocyty krwi obwodowej wyizolowano z krwi heparynizowanej przy pomocy metody wirowania gradientowego z użyciem Histopaque 1077 (Merck) zgodnie z protokołem producenta. Do czasu eksperymentu komórki zamrożono w temperaturze -80°C w 40% RPMI-1640, 50% FBS (wołowej surowicy płodowej, ang. *fetal bovine serum*) i 10% DMSO (dimetylosulfotlenek).

Odczynniki

Histopaque 1077, trypsyna, bromek etydyny, Fast Blue BB (FBBB), (+)-katechina, 3-glukozyd cyjanidyny, kwercetyna, nadtlenuk wodoru, DMSO, Triton X-100, Trizma Base i FDA zostały dostarczone z Merck (*Sigma-Aldrich*).

RPMI dostarczył Cytogen GmbH; FBS – Lonza; penicylinę i streptomycynę – Biomed; agarozę o normalnej temperaturze topnienia (NMPA, ang. *normal melting point agarose*) i o niskiej temperaturze topnienia (LMPA, ang. *low melting point agarose*) – Gibco BRL; EDTA oraz jodek propidyny – MP Biomedicals; 2,4,6-Tris(2-pirydylo)-s-triazynę (TPTZ) – Fluka Analytical; PBS bez wapnia i magnezu, AlCl₃, KCl, NaCl, NaNO₂, HCl, NaOH, metanol, octan sodu trójwodny i siarczan żelaza siedmiowodny – Avantor Performance Materials Poland S.A; chlorek żelaza (III) sześciowodny (PARK Scientific) i PhIP (CAS-No. 105650-23-5, 98% purity) – Toronto Research Chemicals Inc. Roztwór roboczy PhIP przygotowano w 1% DMSO i przechowywano zamrożony (-20°C).

Standardy flawonoidów i kwasów fenolowych do HPLC zostały dostarczone przez: ChromaDex, Irvine, CA, USA; Merck, Darmstadt, Germany; ChemFaces Biochemical Co., Wuhan, PRCh; oraz Zakład Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Ekstrakty w formie tradycyjnych przetworów

Maliny, mięta, jabłka i lawenda zostały kupione w lokalnych sklepach spożywczych (Kraków) w sezonie letnim. Owoce dzikiej róży (*Rosa canina*) zbierano jesienią, natomiast płatki róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*) zebrano w lecie w dzikich rejonach Małopolski. Owoce róży przechowywano w -80°C do czasu przygotowywania ekstraktów; pozostałe surowce wykorzystano niezwłocznie po zakupie lub zbiorze.

Analizie poddano cztery rodzaje ekstraktów: octy fermentowane, maceraty octowe, odwary i nalewki, przygotowywane z: malin (*Rubus idaeus*), skórek obranych z jabłek (*Malus domestica*), miąższu owoców dzikiej róży (*Rosa canina*), kwiatów lawendy (*Lavandula angustifolia*), liści mięty pieprzowej (*Mentha piperita*) i płatków róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*), w 70-procentowym etanolu. Ekstrakty owocowe sporządzono z 30-procentowym wkładem materiału roślinnego, a ekstrakty

ziołowe z 2-procentowym wsadem. Ilość materiału roślinnego dobrano zgodnie z obserwacjami zielarzy doświadczonych w fermentacji octowej, dostosowując intuicyjną metodę wolumetryczną do wzorców wagowych. Ekstrakty przygotowywano trzykrotnie, za każdym razem stosując jedną partię materiału roślinnego dla wszystkich rodzajów ekstraktów. Ekstrakcja była prowadzona w temperaturze pokojowej, a materiał był chroniony przed światłem. Przygotowane ekstrakty wirowano przez 10 min (5000 obr./min), zlano nad osadu i przechowywano w -80°C do czasu eksperymentu.

Fermentowane octy

Uzyskanie octu z surowych soków owocowych lub z materiału roślinnego w wodzie z cukrem przebiega dwuetapowo [Budak i wsp. 2014, Štornik i wsp. 2016]. W pierwszym etapie drożdże *Saccharomyces* przetwarzają cukry (glukozę, fruktozę i sacharozę – dodane lub występujące naturalnie) w etanol podczas fermentacji alkoholowej. Za drugi etap odpowiadają bakterie kwasu octowego *Acetobacter*, które utleniają etanol do dwutlenku węgla i wytwarzają kwas octowy podczas tzw. fermentacji tlenowej, zwanej również pseudofermentacją, ponieważ z zasady fermentacja jest procesem beztlenowym. Fermentowane octy przygotowano z 30 g owoców lub 2 g świeżych ziół i 8 g sacharozy w zawieszynie o łącznej masie 100 g, co ilościowo odpowiada zwyczajowej objętościowej metodzie produkcji domowych octów. Za fermentację odpowiadały dzikie szczepy mikroorganizmów żyjące na materiale roślinnym. Zawiesiny materiału roślinnego trzymano w zakrytych, ale niezamkniętych szklanych butelkach i mieszano dwa razy dziennie przez 4 tygodnie. Po zakończeniu fermentacji octowej ocet został zwirowany i zdekantowany nad osadu. Ocet przygotowano trzykrotnie dla każdego z owoców i ziół.

Maceraty octowe

30 g owoców lub 2 g świeżych ziół zalano 8-procentowym kwasem octowym (ocet spożywczy) do łącznej masy 100 g i trzymano w zamkniętych butelkach, w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 4 tygodnie. Następnie macerat zwirowano nad osadu roślinnego. Maceraty przygotowywano trzykrotnie dla każdego z owoców i ziół.

Odvary

Wodą zalano 30 g owoców lub 2 g świeżych ziół do łącznej masy 100 g i inkubowano w zamkniętych butelkach w łaźni wodnej o temperaturze 100°C przez 25 min. Odvary przygotowywano trzykrotnie dla każdego z owoców i ziół. Ekstrakty przechowywano w temperaturze pokojowej przez 4 tygodnie.

Nalewki

30 g owoców lub 2 g ziół zalano 70-procentowym etanolem do łącznej masy 100 g i trzymano w zamkniętych butelkach w temperaturze pokojowej przez 4 tygodnie. Ekstrakty etanolowe przygotowano trzykrotnie dla każdego z owoców i ziół.

Po przygotowaniu ekstraktów próbki odwirowywano przez 10 min (5000 obr./min), a supernatant zebrano i przechowywano w -80°C. W eksperymentach fitochemicznych do różnych rodzajów ekstraktów stosowano różne rodzaje ślepych próbek; dla octów fermentowanych i odwarów była to woda, dla maceratów octowych ocet spożywczy, a dla nalewek 70-procentowy etanol.

Soki owocowe

Soki tłoczone z owoców pochodziły z uznanych na polskim rynku firm: Polska Róża (Raszyn) i Oleofarm (Wrocław). Owoce były myte, mielone, prasowane, a wyłoczony sok pasteryzowany. Wykorzystano dostępne komercyjnie soki z: aronii czarnej (*Aronia melanocarpa*), bzu czarnego (*Sambucus nigra*), borówki czarnej (*Vaccinium myrtillus*), jeżyny fałdowanej (*Rubus plicatus*), maliny właściwej (*Rubus idaeus*), róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*), rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides*), żurawiny błotnej (*Vaccinium oxycoccos*). Używano soków w rozcieńczeniu 0,1%. Stężenie robocze ekstraktów ustalono na podstawie wcześniejszych badań, które wykazały, że powyższe stężenie flawonoidów w hodowli *in vitro* osiąga porównywalne wartości do poziomu uzyskanego w surowicy po doustnym przyjęciu 60 ml soku owocowego [Nguyen i wsp. 2010, Hollman i wsp. 1997]. W badaniu uwzględniono również 1-procentowe rozcieńczenie, aby sprawdzić, czy soki nie działają cytotoksycznie w wyższych stężeniach.

Wyciągi z kwiatów

Jednoprocentowe wyciągi alkoholowe (tynktury/nalewki) przygotowano poprzez macerację 1 g suszonych, rozdrobnionych płatków kwiatów w 100 g 40-procentowego etanolu przez 14 dni. Suszone płatki róży damasceńskiej (*Rosa damascena*) dostarczono z Bułgarii, hibiskus szczawiowy (ketmia szczawiowa, *Hibiscus sabdariffa*) pochodził z Tajlandii, a płatki jaśminu lekarskiego (*Jasminum grandiflorum*) z Maroka.

Płatki kwiatów: aksamitka rozpierzchła (*Tagetes patula*), bez czarny (dziki bez, *Sambucus nigra*), chaber bławatek (*Centaurea cyanus*), fiołek rogaty – kwiaty granatowe (*Viola cornuta*), koniczyzna czerwona (koniczyzna łąkowa, *Trifolium pratense*), liliowiec ogrodowy (*Heimerocallis xhybrida*), lawenda wąskolistna (*Lavandula angustifolia*), malwa różowa – kwiaty czarne (malwa ogrodowa, *Alcea rosea*), mniszek lekarski (*Taraxacum officinale*), nagietek lekarski (*Callendula officinalis*), nasturcja większa (*Tropaeolum majus*), pierwiosnek bezłodygowy (*Primula vulgaris*), pysznogłówka szkarłatna (*Monarda didyma*), rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*), róża damasceńska (*Rosa damascena*), róża pomarszczona (*Rosa rugosa*), słonecznik zwyczajny (*Heliantus annuus*), stokrotka pospolita (*Bellis perenis*), wrzos zwyczajny (*Calluna vulgaris*), zebrano w podmiejskich rejonach województwa małopolskiego i wysuszono.

Ekstrakty z liści dzikich roślin

Przygotowano alkoholowo-wodne ekstrakty z liści dzikich roślin jadalnych rosnących pospolicie w rejonie Małopolski. Były to: babka lancetowata (*Plantago lanceolata*), bluszczyk kurdybanek (*Glechoma hederacea*), mniszek lekarski (*Taraxacum officinalis*), podagrycznik pospolity (*Aegopodium podagraria*) – liście młode i liście dorosłe, pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*), szczaw zwyczajny (*Rumex acetosa*).

2 g świeżych, rozdrobnionych liści zalano do masy 100 g 40-procentowym etanolem i macerowano przez 14 dni.

Hodowla komórkowa

Przed każdym eksperymentem limfocyty rozmrożono w medium RPMI z dodatkiem 50% FBS i wirowano przy $135 \times g$ (1200 rpm) w 4°C przez 5 min. Następnie komórki wysiano na 96-studzienkową płytkę w gęstości

1×10^4 komórek na studzienkę w pożywce RPMI z 10% FBS i inkubowano w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ przez 30 min.

W kolejnym etapie komórki inkubowano z ekstraktami roślinnymi w stężeniu 1% w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ przez 1 godzinę. W przypadku badania genotoksycznego wpływu amin heterocyklicznych zastosowano inkubację z PhIP o stężeniu: 25, 50, 75, 100 µM lub z sokiem owocowym o stężeniu 0,1% przez 1 godzinę. W celu zbadania właściwości genoprotekcyjnych limfocyty inkubowano przez 1 godzinę jednocześnie w 100 µM PhIP oraz w sokach o stężeniu 0,1%. Jako kontrolę negatywną zastosowano komórki nietraktowane dodatkowymi czynnikami a jedynie inkubowane w pożywce. W przypadku kontroli pozytywnej zastosowano komórki inkubowane w pożywce z 100 µM PhIP. Stężenie aminy heterocyklicznej dobrano na podstawie uzyskanych wyników, które jednoznacznie wskazywały, że w tym stężeniu PhIP na pewno będzie indukować uszkodzenia DNA i powstawanie RFT.

W przypadku badania ochronnego ekstraktów roślinnych przeciwko czynnikom utleniającym zastosowano analogiczny układ eksperymentu, stosując inkubację limfocytów przez 5 min w 25 µM H₂O₂ w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Kontrolę negatywną stanowiły komórki nie traktowane niczym, a kontrolę pozytywną komórki poddane działaniu 25 µM nadtlenu wodoru.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono trzykrotnie niezależnie dla limfocytów od różnych dawców, a wszystkie próbki wykonano w dwóch powtórzeniach.

Całkowita zawartość polifenoli – Fast Blue BB assay

Całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach roślinnych oznaczono przy pomocy testu Fast Blue BB (FBBB). Jest to metoda ilościowego oznaczania związków fenolowych, alternatywna dla testu Folina-Ciocalteu, która umożliwia wyeliminowanie wpływu kwasu askorbinowego na wynik doświadczenia poprzez bezpośrednie oddziaływanie polifenoli z odczynnikiem FBBB w środowisku alkalicznym. 0,2 ml odczynnika FBBB o stężeniu 0,1% dodano do próbek o objętości 2 ml, mieszano przez 1 min, a następnie dodano 0,2 ml NaOH o stężeniu 5%. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 90 min. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru LEDetect (Labexim, Austria) przy fali o długości 420 nm. Wyniki wyrażono jako równoważniki kwercetyny [mg/ml].

Zawartość witaminy C mierzona przy pomocy metody Tillmansa

Metoda Tillmansa opiera się na redukcji 2,6-dichlorofenolindofenolu (DCPIP, odczynnik Tillmansa) przez kwas askorbinowy. Ze względu na silne zabarwienie soków owocowych metodę zmodyfikowano poprzez użycie rozpuszczalnika organicznego (chloroformu). 10 ml odwirowanego soku rozcieńczono chloroformem do 50 ml. 10 ml roztworu miareczkowano 1 mM DCPIP, aż do uzyskania widocznego, lekko różowego zabarwienia utrzymującego się przez co najmniej 10 sekund. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Jako wzorzec zastosowano roztwór kwasu askorbinowego o stężeniu 1 mg/ml.

Siła redukcyjna (FRAP)

Do oceny siły redukcyjnej ekstraktów roślinnych zastosowano zmodyfikowaną metodę FRAP (ang. *ferric reducing antioxidant power*). Krzywą kalibracyjną przygotowano przy użyciu standardowych próbek roztworu FeSO_4 o gradience stężeń 0–1 mM. 17 μl próbki FeSO_4 zmieszano z 200 μl roztworu FRAP1 (300 mM bufor octanowy, pH = 3,6; 10 mM TPTZ) i inkubowano w ciemności przez 20 min w temperaturze pokojowej. 200 μl roztworu FRAP2 (300 mM bufor octanowy, pH = 3,6; 10 mM TPTZ, 20 mM FeCl_3) dodano do 17 μl soków o stężeniu 0,1% rozcieńczonych w 40-procentowym etanolu. Każdą próbkę zanalizowano w trzech powtórzeniach. Jako kontrolę pozytywną użyto roztworu witaminy C w stężeniu 0,1%. Próbkę odniesienia stanowił 40-procentowy etanol. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 20 min w ciemności, w temperaturze pokojowej, a następnie zmierzono absorbancję przy fali długości 593 nm za pomocą czytnika Tecan Spectra Fluor Plus (Tecan, Szwajcaria). Wyniki FRAP wyrażono jako ekwiwalent stężenia jonów Fe^{2+} oraz jako ekwiwalent kwasu askorbinowego

Całkowita zawartość flawonoidów

W celu zbadania całkowitej zawartości flawonoidów do 1 ml soku z owoców dodano 0,3 ml NaNO_2 o stężeniu 5% i po 5 min inkubacji dodano 0,3 ml AlCl_3 o stężeniu 10%. Następnie do próbek dodano 2 ml 1 M NaOH. Probki rozcieńczono 4 ml wody destylowanej. Absorbancję mierzono przy 510 nm używając spektrofotometru LEDetect. Całkowitą zawartość flawonoidów określono za pomocą krzywej standardowej

wyznaczonej przy użyciu (+)-katechiny i wyrażono jako ekwiwalenty katechiny (CE) [mg/ml].

Zawartość antocyjanów

Całkowitą zawartość antocyjanów oznaczono spektrofotometrycznie metodą różnicowego pH. Po 0,2 ml soku owocowego rozcieńczono 0,8 ml 25 mM KCl (pH = 1,0) lub 0,8 ml 0,4 M $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH = 4,5). Rozcieńczone próbki wytrząsano i inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 15 min. Absorbancję każdej rozcieńczonej próbki mierzono przy dwóch długościach fali: 520 nm i 700 nm, przy pomocy spektrofotometru LEDetect, stosując wodę jako próbkę odniesienia. Stężenie antocyjanów obliczono według wzoru:

$$\text{stężenie antocyjanów} = A \times MM \times WR \times 10^3 / \varepsilon \times l$$

gdzie:

- $A - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH} = 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH} = 4,5}$;
- MM – masa molowa 3-glukozydu cyjanidyny = 449,2 g/mol;
- WR – współczynnik rozcieńczenia = 5;
- 10^3 – współczynnik przeliczenia gramów na miligramy;
- ε – molowy współczynnik ekstynkcji 3-glukozydu cyjanidyny = 26 900 dm³/mol x cm;
- l – długość ścieżki optycznej [cm].

Zawartość antocyjanów w sokach wyrażono jako ekwiwalent 3-glukozydu cyjanidyny [mg/ml].

Identyfikacja polifenoli w ekstraktach za pomocą HPLC

Ekstrakty analizowano przy użyciu systemu HPLC z detektorem diodowym (DAD) (Elite LaChrom, seria L-2000, Hitachi, Tokio, Japonia) wyposażonego w kolumnę analityczną Purospher RP-18e (4 × 250 mm, 5 μm, Merck, Darmstadt, Niemcy) w 25°C, przy użyciu opisanej uprzednio metody [Sułkowska-Ziaja i wsp. 2017]. Faza ruchoma składała się z metanolu (A) i kwasu octowego (B) o stężeniu 0,5% (obj./obj.). Szybkość przepływu ustawiono na 1,0 ml/min przy objętości wtrysku 10 μl. Zastosowany schemat elucji gradientowej był następujący:

(stosunek A/B) 20:80%, t = 0–20 min; 30:70%, t = 35 min; 60:40%, t = 60 min; 100:0%, t = 70–75 min; 20:80%, t = 80–90 min.

Polifenole wykrywano przy fali długości 254 nm (zakres rejestracji 200–400 nm). Analizy ilościowe oparto na porównaniu ze standardowymi związkami:

- kwasami fenolowymi: kwas benzoesowy; kwas chlorogenowy; kwas izochlorogenowy; kwas cynamonowy; kwas dihydrokawowy; kwas elagowy; kwas fenylooctowy; kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy; kwas 3-hydroksyfenylooctowy; kwas 4-O-feruloilochinowy; kwas ferulowy; kwas izoferulowy; kwas galusowy; kwas gentyzynowy; kwas kaftarowy; kwas kawowy; kwas kryptochlorogenowy; kwas neochlorogenowy; kwas *p*-hydroksybenzoesowy; kwas *m*-kumarowy; kwas *o*-kumarowy; kwas *p*-kumarowy; ester metylowy kwasu *p*-kumarowego; kwas protokatechowy; kwas rozmarynowy; kwas salicylowy; kwas synapinowy; kwas syryngowy; kwas wanilinowy;
- katechinami: epigallokatechina; galusan epigallokatechiny; (+)-katechina; epikatechina; galusan epikatechiny;
- glikozydami fenylopropanoidowymi: izowerbaskozyd; werbaskozyd;
- flawonoidami: kemferol; astragalina (3-O-glukozyd kemferolu); 3-O-glukoramnozyd kemferolu; 3-O-ramnozyd kemferolu; 4'-glukozyd kemferolu; 7-ramnozyd kemferolu; awikularyna (3-O-arabinofuranozyd kwercetyny); populina (7-O-glukozyd kemferolu); robinina (3-O-robinnozyd-7-O-ramnozyd kemferolu); trifolina (3-O-galaktozyd kemferolu); kwercetyna; kwercytryna (3-ramnozyd kwercetyny); 3-glukuronid kwercetyny; 7-O-glukozyd kwercetyny; hyperozyd (3-O-galaktozyd kwercetyny); izokwercetyna (3-d-glukozyd kwercetyny); rutozyd (3-rutynnozyd kwercetyny); 7-O-neohesperozyd naryngeniny; 7-O-rutynnozyd naryngeniny; apigenina; apigetryna (7-O-glukozyd apigeniny); 5-glukozyd apigeniny; 7-glukuronid apigeniny; 7-ramnozyd apigeniny; witeksyna (8-c-glukozyd apigeniny); bajkaleina; bajkalina; chryzyna; cynarozyd (7-O-glukozyd luteoliny); diosmetyna; izoramnetyna; luteolina; mirycetyna; oroksylina A; ramnetyna; 3-ramnozyd izoramnetyny; skulkapflawon II; skutelareina; skutelaryna; wogonina; wogonozyd.

Każdy ekstrakt analizowano w trzech powtórzeniach.

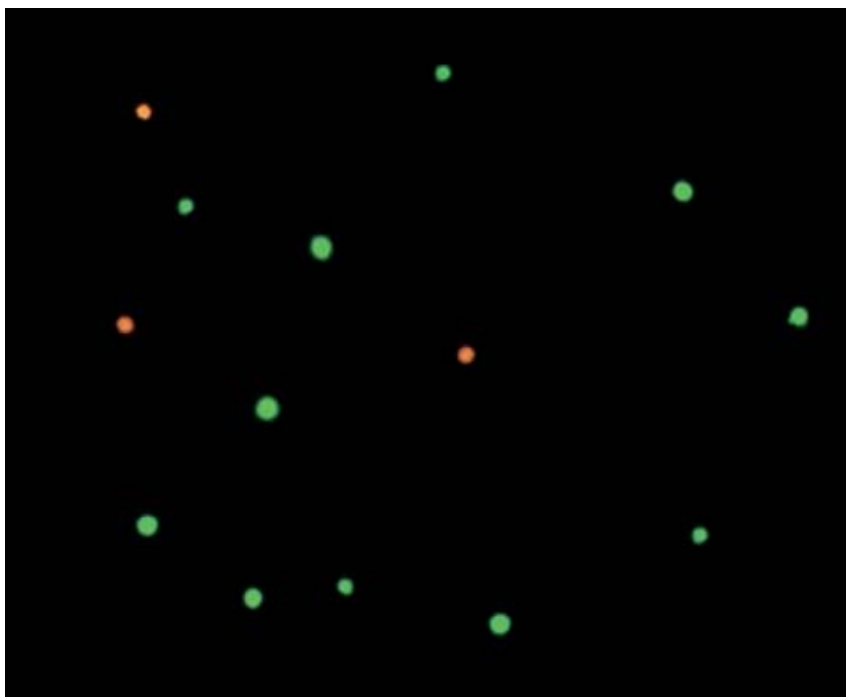
Zawartość karotenoidów

Stężenie karotenoidów oznaczono metodą spektrofotometryczną dla pięciu dominujących typów karotenoidów: beta-karotenu, zeaksantyny,

likopenu, luteiny i beta-kryptoksantyny. 1 ml próbki odparowano przy użyciu koncentratora próżniowego CentriVap (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) przy 1725 obr./min i 4°C, a substancje stałe rozcieńczono w 100 μ l acetonu. Absorbancję mierzono spektrofotometrem LEDetect przy fali długości 450 nm. Próbkę analizowano w trzech powtórzeniach.

Żywotność komórek

Do pomiarów żywotności komórek w obecności ekstraktów roślinnych wykorzystano metodę różnicowego barwienia fluorescencyjnego. Komórki wysiano w gęstości 2×10^4 komórek/studzienkę w 96-dółkowych płytach; do studzienek dodano ekstraktu o stężeniu 0,1% lub 1%, 100 μ M PhIP lub 25 μ M H_2O_2 , a następnie inkubowano przez 1 i 24 godziny. Barwniki fluorescencyjne zostały przygotowane poprzez zmieszanie 30 μ l dwuoctanu fluoresceiny w acetonie (FDA, 5 mg/ml), 200 μ l bromku etyldyny (EtBr, 200 μ g/ml) w PBS oraz 4,8 ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} .



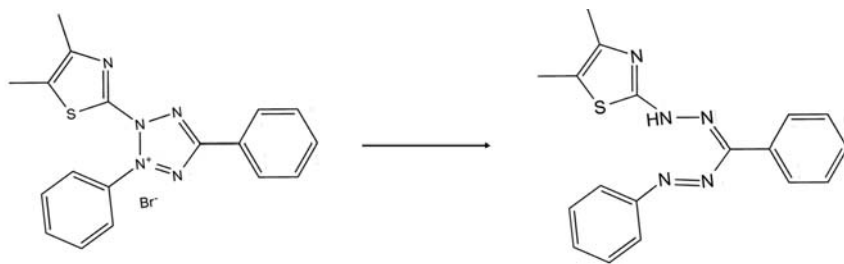
Rycina 18. Obraz mikroskopowy badania żywotności limfocytów w metodzie fluorescencyjnego barwienia różnicowego. Komórki aktywne metabolicznie wykazują zieloną fluorescencję, komórki martwe – czerwoną

Próbki zmieszano z FDA/EtBr w proporcji 1:1 i umieszczono na szkiełkach mikroskopowych. Komórki aktywne metabolicznie są zdolne do hydrolizy dwuoctanu fluoresceiny do fluoresceiny przez co wykazują zieloną fluorescencję, podczas gdy utrata integralności błony umożliwia wnikanie bromku etydyyny do komórki i barwienie kwasów nukleinowych na czerwono, jak pokazano na rycinie 18.

Komórki wizualizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX 50 (Olympus, Tokio, Japonia) w świetle wzbudzającym o fali długości 450 nm (niebieski filtr). Z każdej próbki zliczano po 100 kolejnych komórek. Badanie wykonano dla każdego ekstraktu w trzech niezależnych eksperymentach.

Ocena żywotności komórek za pomocą testu MTT

Alternatywnie do pomiaru żywotności komórek w obecności ekstraktów roślinnych zastosowano metodę barwienia MTT. Żółty barwnik tetrazolowy MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu) jest redukowany do jego nierozpuszczalnej w wodzie purpurowej pochodnej – formazanu ((E,Z)-5-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-1,3-difenyloformazan) przez zależne od NADH i NADPH oksydoreduktazy (rycina 19). Intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do aktywności enzymów i odzwierciedla liczbę żywych komórek. Komórki wysiano w ilości 2×10^4 komórek na studzienkę w 96-dółkowych płytkach przez 1 godzinę z dodatkiem ekstraktu o stężeniu 0,1% lub 1% do odpowiednich studzienek. Do komórek dodano MTT w stężeniu 0,5 mg/ml i inkubowano w 37°C przez 2,5 godziny. Następnie dodano 150 μ l izopropanolu i wytrząsano je na wytrząsarce przez 15 min, po czym zmierzono absorbancję spektrofotometrem LEDetect przy 590 nm.

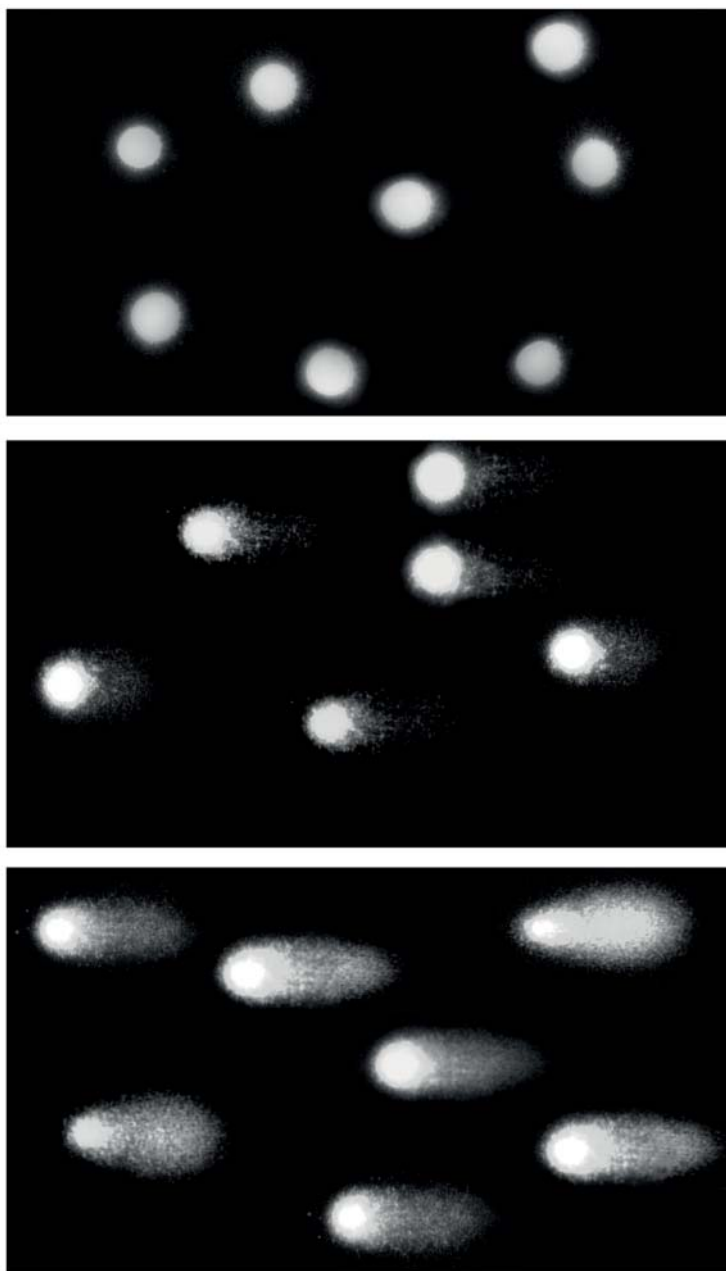


Rycina 19. Redukcja MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu) do formazanu ((E,Z)-5-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-1,3-difenyloformazan)

Uszkodzenia DNA limfocytów

Do zmierzenia ilości endogennych i indukowanych uszkodzeń DNA w limfocytach została użyta metoda elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym (SCGE, ang. *single cell gel electrophoresis*), czyli test kometowy, zgodnie z opublikowanym protokołem [Kalemba-Drożdż i Cierniak 2019]. DNA migrujące w żelu elektroforetycznym wizualizowane w mikroskopie fluorescencyjnym przypomina kształtem kometę: głowę tworzy nukleoid z nieuszkodzonego DNA a ogon migrujące w polu elektrycznym uszkodzone fragmenty DNA (rycina 20). Intensywność fluorescencji ogona komety zależy od ilości uszkodzeń DNA.

Limfocyty umieszczono na płytce 96-dołkowej w gęstości 2×10^4 komórek na studzienkę i inkubowano z 1-procentowym rozcieńczeniem ekstraktów przez 1 godzinę. Uszkodzenia oksydacyjne zostały indukowane przez inkubację komórek z 25 μM nadtlaniem wodoru przez 5 min. Następnie komórki zwirowano ($135 \times g$, 5 min, 4°C) i zawieszono w PBS. Próbkę umieszczono w łaźni wodnej (37°C) i zmieszano z roztworem i LMPA o stężeniu 0,5%. Zawiesinę każdej próbki umieszczano na szkiełkach mikroskopowych pokrytych NMPA i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym, po czym natychmiast lokowano je na lodzie. Po usunięciu szkiełek nakrywkowych preparaty umieszczano w buforze lizującym (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris [tris(hydroksymetylo)amino-metan], 10% DMSO i 1% Triton X100, pH = 10) w 4°C na 1 godzinę. Następnie preparaty płukano trzykrotnie w 0,4 M Tris (pH = 7,4) i układano w aparacie do elektroforezy wypełnionym świeżym, zimnym buforem elektroforetycznym (300 mM NaOH, 1 mM EDTA). Preparaty przebywały w tym alkalicznym buforze (pH > 13) przez 40 min, żeby umożliwić rozluźnienie łańcuchów DNA w nukleoidzie. Następnie przez 30 min prowadzono elektroforezę (przy napięciu 0,74 V/cm odległości między elektrodami, 300 mA). Na koniec szkiełka były dwukrotnie płukane 0,4 M Tris (pH = 7,4).



Rycina 20. Wizualizacja uszkodzeń DNA w metodzie kometowej. Od góry: nukleoidy z małą ilością uszkodzeń, średnią ilością i nukleoidy silnie uszkodzone

Wyniki z trzech niezależnych eksperymentów wyrażono jako zawartość DNA w ogonie komety TDC (ang. *tail DNA content*), czyli jako procentowy udział fluorescencji ogona do poziomu całkowitej fluorescencji komety. Preparaty wybarwiano 50 μ l jodku propidyny (5 μ g/ml) i wizualizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX 50 wyposażonym w filtr wzbudzający 515–560 nm, filtr analizujący 590 nm i kamerę CCD w powiększeniu 200x. Obrazy analizowano przy pomocy oprogramowania COMET ASSAY 2.6. TDC był obliczany automatycznie dla 100 losowo wybranych komet z każdej próbki.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania Statistica 10 (StatSoft, USA). Wyniki uzyskane z limfocytów od poszczególnych dawców nie różniły się istotnie i zostały wyrażone jako średnia z trzech eksperymentów. Istotność statystyczną różnic pomiędzy warunkami doświadczalnymi oceniano jednokierunkowym testem ANOVA pod warunkiem dodatniej jednorodności wariancji w teście Levene'a. Wykonano test a posteriori Tukeya. Jako granicę istotności przyjęto wartość $p < 0,05$. Analizę korelacji przeprowadzono za pomocą regresji liniowej, a siłę korelacji ustalono za pomocą współczynników korelacji Pearsona.

Wyniki

Zawartość polifenoli, flawonoidów, antocyjanów i witaminy C oraz siła redukcyjna

Soki z dzikich owoców

Wyniki pomiarów stężenia związków fenolowych, flawonoidów, antocyjanów i witaminy C oraz siły redukcyjnej soków owocowych zebrano w tabeli 1.

Największą zawartość związków fenolowych odnotowano w sokach z owoców róży, aronii, borówki czarnej oraz bzu czarnego i w nich również stwierdzono najwyższą siłę redukcyjną. Co ważne, owoce róży pomarszczonej charakteryzowały się najwyższą całkowitą zawartością polifenoli, najwyższym stężeniem flawonoidów, antocyjanów i kwasu askorbinowego oraz największą siłą redukcyjną. Najwyższy stosunek antocyjanów do całości związków fenolowych stwierdzono w soku z aronii (ponad 61%), a najniższy w rokitniku (2,8%). Z kolei najwyższy stosunek

flawonoidów do całości polifenoli stwierdzono w rokitniku, najniższy zaś w borówce czarnej (46% i 17%).

Tabela 1. Siła przeciwutleniająca oraz zawartość polifenoli, antocyjanów, flawonoidów i witaminy C w sokach owocowych. Wyniki uszeregowano zgodnie z rosnącymi właściwościami przeciwutleniającymi

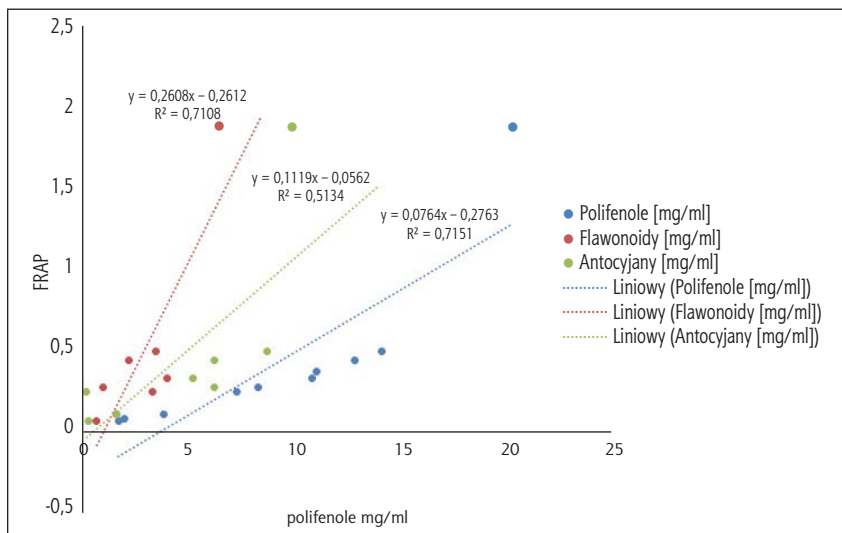
Sok z owoców	Polifenole ± odch. st. [mg/ml]	Flawonoidy ± odch. st. [mg/ml]	Antocyjany ± odch. st. [mg/ml]	Witamina C ± odch. st. [mg/100ml]	FRAP ± odch. st. [mM Fe ²⁺]
żurawina błotna <i>Vaccinium oxycoccos</i>	1,71 ± 0,06	0,69 ± 0,21	0,29 ± 0,02	9,2 ± 0,4	7,1 ± 0,1
malina właściwa <i>Rubus idaeus</i>	3,85 ± 1,22	1,60 ± 0,32	1,63 ± 0,07	28,9 ± 0,6	11,0 ± 0,1
rokitnik zwyczajny <i>Hippophae rhamnoides</i>	7,28 ± 0,29	3,35 ± 1,08	0,21 ± 0,01	48,1 ± 7,2	25,3 ± 1,3
jeżyna fałdowana <i>Rubus plicatus</i>	8,33 ± 1,3	3,01 ± 1,3	4,03 ± 1,3	18,3 ± 1,3	28,4 ± 0,3
bez czarny <i>Sambucus nigra</i>	11,07 ± 1,3	4,0 ± 1,3	5,24 ± 1,3	12,9 ± 1,3	37,6 ± 1,3
borówka czarna <i>Vaccinium myrtillus</i>	12,90 ± 2,01	2,22 ± 0,23	6,23 ± 0,03	3,8 ± 1,2	44,4 ± 0,5
aronia czarna <i>Aronia melanocarpa</i>	14,18 ± 1,05	3,5 ± 0,32	8,75 ± 0,54	10,6 ± 2,2	50,0 ± 0,4
róża pomarszczona <i>Rosa rugosa</i>	20,36 ± 1,38	6,44 ± 0,97	9,93 ± 0,95	268,3 ± 15,7	188,5 ± 0,4

odch. st. – odchylenie standardowe

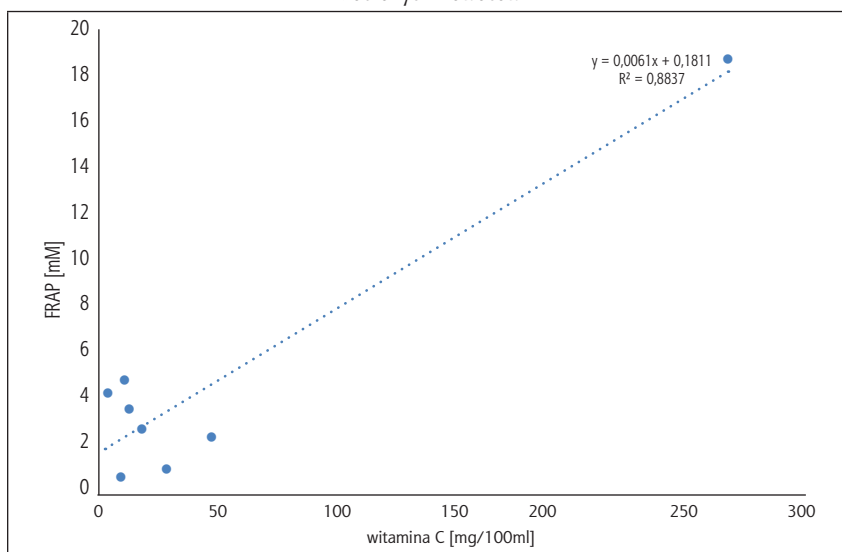
Stwierdzono występowanie dodatniej korelacji między aktywnością przeciwutleniającą soków owocowych a całkowitą zawartością związków fenolowych ($y = 0,0764x - 0,2763$; $R^2 = 0,7151$; $p = 0,004$). Odstający punkt reprezentuje wynik uzyskany dla soku z owoców róży, który wykazał znacznie wyższe zdolności antyoksydacyjne niż wynikałoby to tylko z zawartości flawonoidów. Po wykluczeniu z analizy wyników uzyskanych dla soku z owoców róży korelacja była silniejsza ($R^2 = 0,9871$; $p = 0,0003$). Wystąpiła istotna korelacja między FRAP a stężeniem flawonoidów i antocyjanów (odpowiednio: $y = 0,2608x - 0,2612$, $R^2 = 0,7108$, $p = 0,0002$ i $y = 0,1119x - 0,0562$, $R^2 = 0,5134$, $p = 0,003$) (rycina 21).

Po wykluczeniu punktu odstającego soku z owoców róży, który również charakteryzował się bardzo wysokim stężeniem kwasu askorbinowego, nie stwierdzono występowania istotnej korelacji między zawartością

kwasu askorbinowego a mocą antyoksydacyjną soków ($y = -17\,572x + 19,655$; $R^2 = 0,0335$; $p = 0,7669$). Gdy w analizie uwzględniono wyniki dla soku z owoców róży, występowała korelacja między FRAP a stężeniem kwasu askorbinowego ($y = 0,0061x + 0,1811$; $R^2 = 0,8837$; $p = 0,009$), co pokazano na rycinie 22.



Rycina 21. Zależność między siłą redukcyjną (FRAP) a całkowitym stężeniem polifenoli w sokach tłoczonych z owoców



Rycina 22. Zależność między siłą redukcyjną (FRAP) a stężeniem witaminy C w sokach wyciskanych z owoców

Ekstrakty tradycyjne z ziół i owoców

Różne rodzaje tradycyjnych ekstraktów z ziół i owoców diametralnie różniły się składem. We wszystkich ekstraktach z owoców dzikiej róży stwierdzono obecność stosunkowo dużych ilości witaminy C. W ekstraktach z malin kwas askorbinowy wykryto w bardzo małych ilościach, z wyjątkiem odwaru, w którym nie stwierdzono obecności kwasu askorbinowego. Żaden z ekstraktów ze skórek jabłek, liści mięty, kwiatów lawendy i płatków róży karbowanej nie zawierał wykrywalnych ilości witaminy C (tabela 2).

Tabela 2. Zawartość polifenoli, antocyjanów, witaminy C i karotenoidów oraz FRAP w tradycyjnych ekstraktach z ziół i owoców według [Kalemba-Drożdż, Kwiecień i wsp. 2020]

Material roślinny	Ekstrakt	Polifenole [mg/100g] ± odch. st.	Antocyjany [mg/100g] ± odch. st.	Witamina C [mg/100g] ± odch. st.	Karotenoidy [μg/100g] ± odch. st.	FRAP Fe2+ [mM] ± odch. st.	pH ± odch. st.
	ocet spożywczy	0,56 ± 0,34	NW	NW	0,01 ± 0,01	1,28 ± 0,10	2,51 ± 0,13
skórki jabłek <i>Malus domestica</i>	ocet	22,07 ± 1,84	NW	NW	0,13 ± 0,08	2,32 ± 0,18	2,93 ± 0,17
	macerat	38,87 ± 0,98	1,57 ± 0,00	NW	0,06 ± 0,03	2,59 ± 0,26	2,51 ± 0,08
	nalewka	59,74 ± 2,67	2,03 ± 0,01	NW	0,19 ± 0,06	2,74 ± 0,30	4,72 ± 0,14
	odwar	47,24 ± 1,54	1,90 ± 0,00	NW	0,12 ± 0,08	0,90 ± 0,09	4,11 ± 0,17
owoc maliny <i>Rubus idaeus</i>	ocet	46,44 ± 2,54	3,15 ± 0,04	1,67 ± 1,16	0,23 ± 0,07	2,61 ± 0,25	2,82 ± 0,19
	macerat	56,98 ± 3,00	4,32 ± 0,02	5,00 ± 1,67	0,54 ± 0,02	3,86 ± 0,29	2,7 ± 0,13
	nalewka	97,57 ± 2,06	12,49 ± 0,03	1,67 ± 1,00	0,35 ± 0,04	0,67 ± 0,07	3,85 ± 0,01
	odwar	57,48 ± 1,87	5,66 ± 0,05	NW	0,57 ± 0,67	7,71 ± 1,56	3,98 ± 0,14
owoce róży <i>Rosa canina</i>	ocet	231,32 ± 8,09	NW	88,33 ± 2,33	0,27 ± 0,02	8,00 ± 0,89	2,85 ± 0,13
	macerat	303,38 ± 6,67	NW	118,33 ± 1,00	0,27 ± 0,03	11,84 ± 0,90	2,67 ± 0,10
	nalewka	227,42 ± 6,11	NW	141,67 ± 3,67	0,29 ± 0,11	9,04 ± 0,79	4,23 ± 0,09
	odwar	449,68 ± 9,33	NW	256,67 ± 5,43	1,17 ± 0,12	0,57 ± 0,05	4,91 ± 1,00

Materiał roślinny	Ekstrakt	Polifenole [mg/100g] ± odch. st.	Antocyjany [mg/100g] ± odch. st.	Witamina C [mg/100g] ± odch. st.	Karotenoidy [μg/100g] ± odch. st.	FRAP Fe ²⁺ [mM] ± odch. st.	pH ± odch. st.
liście mięty <i>Mentha piperita</i>	ocet	8,94 ± 1,00	NW	NW	0,04 ± 0,01	0,53 ± 0,09	2,79 ± 0,13
	macerat	10,68 ± 0,67	NW	NW	0,18 ± 0,00	5,12 ± 0,49	2,59 ± 0,05
	nalewka	8,90 ± 1,22	NW	NW	0,03 ± 0,00	0,30 ± 0,07	6,96 ± 0,11
	odwar	4,76 ± 0,89	NW	NW	0,31 ± 0,02	1,45 ± 0,03	6,98 ± 1,06
kwiat lawendy <i>Lavandula angustifolia</i>	ocet	20,84 ± 1,50	NW	NW	0,13 ± 0,04	1,41 ± 0,11	2,86 ± 0,30
	macerat	20,29 ± 1,12	NW	NW	0,06 ± 0,05	3,44 ± 0,28	2,61 ± 0,18
	nalewka	46,63 ± 1,89	NW	NW	NW	2,06 ± 0,32	6,99 ± 0,02
	odwar	30,10 ± 1,51	NW	NW	0,17 ± 0,01	2,73 ± 0,26	6,59 ± 0,16
płatki róży <i>Rosa rugosa</i>	ocet	97,17 ± 1,45	NW	NW	0,09 ± 0,01	2,81 ± 0,28	2,93 ± 0,07
	macerat	138,51 ± 3,99	NW	NW	0,09 ± 0,00	3,80 ± 0,43	2,78 ± 0,13
	nalewka	199,81 ± 3,33	NW	NW	0,29 ± 0,01	2,92 ± 0,42	6,87 ± 0,20
	odwar	109,82 ± 4,67	NW	NW	0,11 ± 0,01	1,28 ± 0,10	6,77 ± 0,09

NW – nie wykryto; odch. st. – odchylenie standardowe

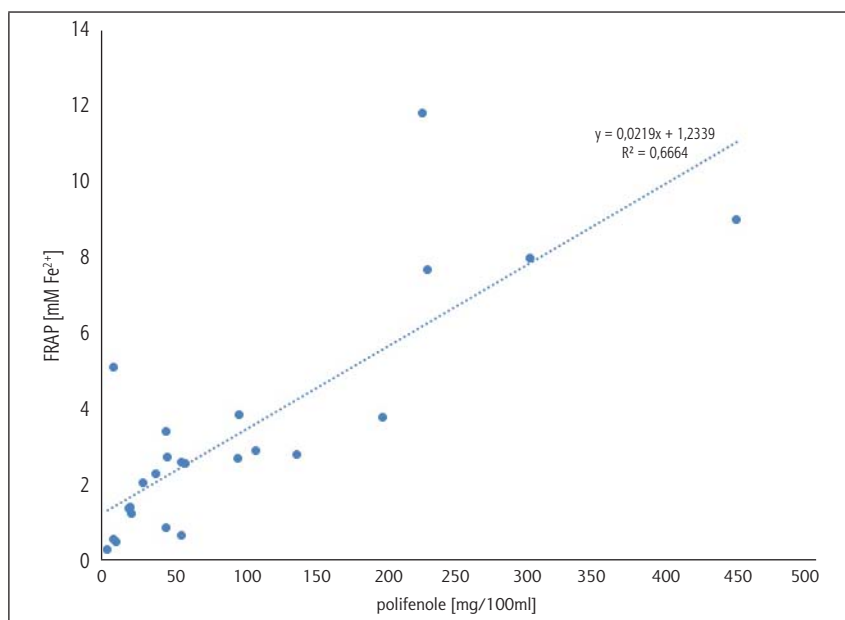
W badanych ekstraktach obecne były jedynie śladowe ilości karotenoidów. Fermentowane octy miały nieco wyższe pH niż maceraty octowe, ale różnica nie była znacząca (tabela 2). Zaobserwowano, że wszystkie ekstrakty z owoców dzikiej róży miały najwyższe stężenie polifenoli. Ekstrakty z płatków róży i nalewka z malin charakteryzowały się dość wysoką zawartością polifenoli, a ich najniższe stężenie stwierdzono we wszystkich ekstraktach z liści mięty. Najwyższą zawartością fenoli charakteryzowały się nalewki, a najniższą octy fermentowane ($\chi^2 = 9,333$; $df = 3$; $p = 0,025$; test rangowy $\chi^2 = 6,171$; $df = 3$, $p = 0,104$).

Stwierdzono, że stężenia polifenoli mierzone metodą spektrofotometryczną i HPLC były skorelowane ($y = 0,1276x + 21,418$; $R^2 = 0,3297$; $p = 0,05$). Antocyjany stwierdzono jedynie w skórkach jabłek i ekstraktach

z malin, a nalewki okazały się formą ekstraktów, która charakteryzowała się największą zawartością antocyjanów.

Najsilniejsze właściwości przeciwutleniające charakteryzowały wszystkie ekstrakty z owoców róży (w kolejności od najwyższych do najniższych: nalewka, odwar, macerat i ocet fermentowany). Nalewki z pozostałych roślin wykazywały wysoką moc antyoksydacyjną (kolejno: mięta, malina, płatki róż, lawenda). Fermentowane octy z lawendy, skórek jabłek, malin i mięty charakteryzowały się bardzo niskimi właściwościami antyoksydacyjnymi. Najmniejszą siłę redukcyjną stwierdzono w ekstraktach z mięty (w kolejności od najniższej do najwyższej: odwar, macerat i ocet fermentowany).

Tak jak w przypadku soków z drobnych owoców roślin dziko rosnących na półkuli północnej, wartości FRAP dla tradycyjnych ekstraktów korelowały z całkowitym stężeniem polifenoli ($y = 0,0219x + 1,2339$; $R^2 = 0,6664$, $p = 0,039$), co przedstawiono na rycinie 23.



Rycina 23. Zależność między stężeniem polifenoli w ekstraktach ze świeżych ziół i owoców mierzonym przy pomocy metody Fast Blue BB a siłą redukcyjną mierzoną przy pomocy FRAP [Kalemba-Drożdż, Kwiecień i wsp. 2020]

Ekstrakty z kwiatów jadalnych

W przypadku ekstraktów kwiatowych wyniki uzyskane za pomocą metody FRAP ujawniły, że wyciągi z malwy czarnej, hibiskusa i rumianku miały raczej słabe zdolności przeciwutleniające, podczas gdy ekstrakty z chabru bławatka, liliowców, lawendy, niebieskich fiołków rogatych, mniszka, wrzosu, nasturcji, dzikiego bzu, aksamitki, pysznogłówek, koniczyzny i nagietka ujawniły silne właściwości przeciwutleniające. Największy potencjał antyoksydacyjny charakteryzował ekstrakty z róży pomarszczonej i róży damasceńskiej (tabela 3) przy jednocześnie najwyższym stężeniu polifenoli. W żadnym z ekstraktów nie wykryto obecności witaminy C.

Tabela 3. Stężenie polifenoli mierzone metodą Fast Blue BB, stężenie karotenoidów mierzone metodą spektrofotometryczną i siła przeciwutleniająca ekstraktów z suszonych kwiatów jadalnych mierzona metodą FRAP

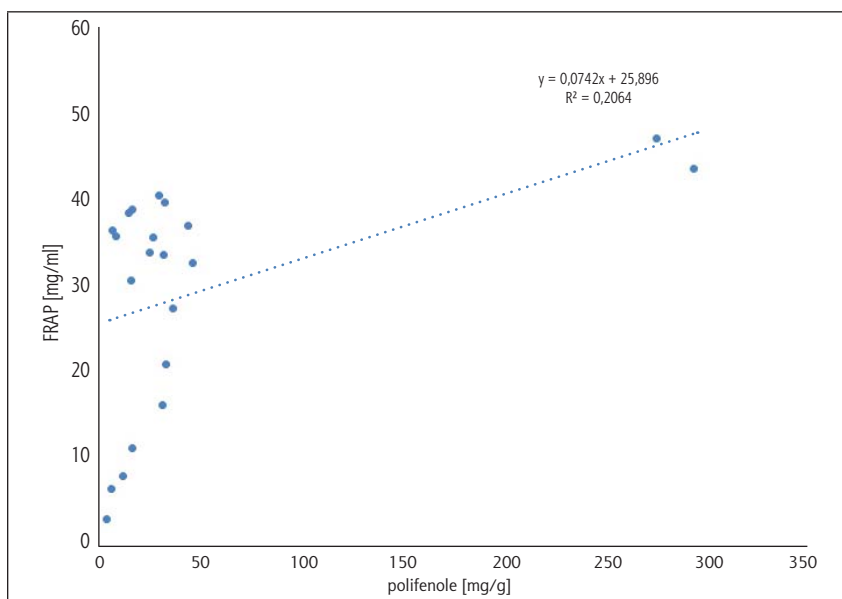
1-procentowe ekstrakty wodno-alkoholowe z suszonych kwiatów	Polifenole [mg/g]	Karotenoidy [µg/ml]	FRAP eq wit. C [mg/ml]
malwa różowa <i>Alcea rosea</i>	5,0 ± 1,7	54,3 ± 8,0	3,3 ± 0,16
ketmia szczawiowa <i>Hibiscus sabdariffa</i>	7,0 ± 1,2	9,4 ± 1,4	6,8 ± 0,40
rumianek pospolity <i>Matricaria chamomilla</i>	12,5 ± 1,6	130,1 ± 19,2	8,2 ± 1,00
słonecznik zwyczajny <i>Helianthus annuus</i>	17,4 ± 1,3	146,8 ± 21,6	11,4 ± 1,53
pierwiosnek bezłodygowy <i>Primula vulgaris</i>	32,2 ± 0,7	40,6 ± 6,0	16,4 ± 1,17
stokrotka pospolita <i>Bellis perenis</i>	33,7 ± 0,1	36,4 ± 5,4	21,1 ± 1,12
chaber bławatek <i>Centaurea cyanus</i>	37,4 ± 0,3	3,6 ± 0,6	27,5 ± 2,88
liliowiec ogrodowy <i>Hemerocallis xhybrida</i>	16,9 ± 0,9	380,3 ± 55,9	30,8 ± 0,54
lawenda wąskolistna <i>Lavandula angustifolia</i>	47 ± 0,2	100,2 ± 14,7	32,8 ± 0,28
fiołek rogaty <i>Viola cornuta</i>	32,7 ± 0,3	78,8 ± 11,6	33,7 ± 1,91
mniszek lekarski <i>Taraxacum officinale</i>	25,9 ± 0,8	238,4 ± 35,1	34,0 ± 2,88
wrzos zwyczajny <i>Calluna vulgaris</i>	27,8 ± 0,8	64,6 ± 9,6	35,8 ± 4,46

1-procentowe ekstrakty wodno-alkoholowe z suszonych kwiatów	Polifenole [mg/g]	Karotenoidy [ug/ml]	FRAP eq wit. C [mg/ml]
nasturcja większa <i>Tropaeolum majus</i>	9,2 ± 2,4	456,6 ± 67,3	35,9 ± 7,64
bez czarny <i>Sambucus nigra</i>	44,9 ± 0,2	23,8 ± 3,5	37,1 ± 1,65
aksamitka rozpierzchła <i>Tagetes patula</i>	15,6 ± 1,3	2837,5 ± 417,2	38,6 ± 2,89
pysznogłówka szkarłatna <i>Monarda didyma</i>	17,6 ± 1,8	896,3 ± 131,8	38,9 ± 2,64
koniczyna czerwona <i>Trifolium pratense</i>	33,6 ± 0,7	310,9 ± 45,7	39,8 ± 0,84
nagietek lekarski <i>Calendula officinalis</i>	30,8 ± 1,1	1498,0 ± 220,3	40,6 ± 3,13
róża pomarszczona <i>Rosa rugosa</i>	294,2 ± 25,4	22,3 ± 3,5	43,6 ± 9,68
róża damasceńska <i>Rosa damascena</i>	275,6 ± 13,6	34,4 ± 5,3	47,1 ± 10,46

Stwierdzono występowanie korelacji pomiędzy siłą przeciwutleniającą mierzoną metodą FRAP a zawartością polifenoli zmierzona przy użyciu metody Fast Blue BB w ekstraktach kwiatowych: $y = 0,0742x + 25,896$; $R^2 = 0,2064$ (rycina 24).

Ekstrakty z płatków róż charakteryzowały się nie tylko najsilniejszymi zdolnościami przeciwutleniającymi, ale również najwyższym stężeniem polifenoli. Po odrzuceniu silnie odstających wyników dla ekstraktów z róż, zaobserwowano, że korelacja była słabsza ($y = 0,384x + 18,658$; $R^2 = 0,1575$).

W przypadku analizowanych ekstraktów kwiatowych stwierdzono, że zmienną wpływającą na korelację siły przeciwutleniającej ze stężeniem polifenoli było stężenie karotenoidów. O ile zależność siły przeciwutleniającej od stężenia karotenoidów nie była istotna statystycznie ($p = 0,06$; $y = 18,832x - 131,39$; $R^2 = 0,1161$), o tyle wspólne ich oddziaływanie podnosiło siłę przeciwutleniającą ekstraktów z jadalnych kwiatów ($p = 0,03$; $y = 4,6629x - 46,394$; $R^2 = 0,4118$).



Rycina 24. Zależność pomiędzy siłą redukcyjną mierzoną metodą FRAP a stężeniem polifenoli oznaczonych Fast Blue BB w ekstraktach z jadalnych kwiatów

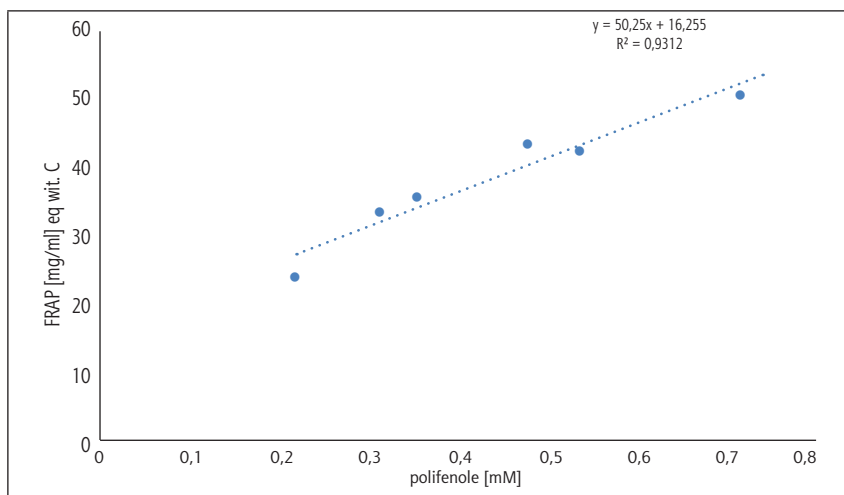
Ekstrakty z liści dzikich roślin jadalnych

W przypadku ekstraktów z liści dzikich roślin jadalnych stwierdzono, że najwyższy potencjał przeciwutleniający charakteryzował wyciągi z młodych liści podagrycznika pospolitego, babki lancetowatej i mniszka lekarskiego (tabela 4).

Tabela 4. Zawartość polifenoli mierzona metodą Fast Blue BB oraz siła redukcyjna mierzona metodą FRAP w wyciągach wodno-alkoholowych ze świeżych liści dzikich roślin jadalnych

2-procentowe ekstrakty ze świeżych liści	Polifenole [mM] ± odch. st.	FRAP V.C eq. [mM] ± odch. st.
babka lancetowata (<i>Plantago lanceolata</i>)	8,6 ± 0,0	29,0 ± 0,9
bluszcz kurdybanek (<i>Glechoma hederacea</i>)	4,0 ± 0,1	16,0 ± 0,4
mniszek lekarski (<i>Taraxacum officinalis</i>)	9,7 ± 0,4	28,3 ± 2,2
pokrzywa zwyczajna (<i>Urtica dioica</i>)	5,7 ± 0,3	22,3 ± 1,6
podagrycznik pospolity (<i>Aegopodium podagraria</i>) – młody liść	12,9 ± 0,6	33,7 ± 3,2
podagrycznik pospolity (<i>Aegopodium podagraria</i>) – dorosły liść	7,0 ± 1,0	18,1 ± 0,5
szczaw zwyczajny (<i>Rumex acetosa</i>)	6,4 ± 0,0	23,8 ± 1,7

Potwierdzono występowanie dodatniej korelacji między siłą przeciwutleniającą a stężeniem polifenoli w ekstrakcie ($y = 50,25x + 16,255$; $R^2 = 0,9312$) (rycina 25).



Rycina 25. Zależność pomiędzy siłą redukcyjną (FRAP) a stężeniem polifenoli (Fast Blue BB) w ekstraktach z liści jadalnych dzikich roślin

Ekstrakty tradycyjne z owoców i ziół

W przypadku ekstraktów przygotowanych metodami tradycyjnymi najwyższe stężenie flawonoidów stwierdzono w nalewkach, a najniższe w octach fermentowanych. Wysokosprawna chromatografia cieczowa ujawniła, że w przypadku ekstraktów ze skórek jabłek najwięcej związków fenolowych było w nalewce, a najmniej w occie fermentowanym. Spośród flawonoidów w największym stężeniu występowały 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-ramnozyd kwercetyny oraz katechina. Podobnie sytuacja wyglądała w przypadku ekstraktów z malin: octy fermentowane charakteryzowały się najniższym stężeniem i najmniejszą różnorodnością flawonoidów. W ekstraktach z malin dominującym polifenolem był kwas elagowy; w ekstraktach z dzikiej róży była nim katechina, chociaż odwar z jej owoców był znacznie bogatszy w kwas elagowy niż inne rodzaje ekstraktów z róży. Spośród ekstraktów z mięty największą różnorodność kwasów fenolowych stwierdzono w maceratach octowych i nalewkach. Ponadto macerat miętowy charakteryzował się największym

zróżnicowaniem związków fenolowych. Najwięcej kwasów fenolowych stwierdzono w nalewce z lawendy, która również charakteryzowała się największą różnorodnością związków fenolowych spośród wszystkich ekstraktów z lawendy, natomiast ocet fermentowany miał ich najmniejsze stężenie. W przypadku ekstraktów z płatków róży nalewki i maceraty zawierały najwięcej flawonoidów z przewagą 3-O-galaktozydu kempferolu, 3-O-glukozydu kempferolu i kwercetyny, a ocet był najuboższy w związki fenolowe (tabele 5a i 5b).

Żywotność komórek

W celu oceny żywotności limfocytów traktowanych sokami w stężeniu 1% oraz 0,1% przez 1 i 24 godziny przeprowadzono podwójne różnicowe barwienie fluorescencyjne. Wyniki uzyskane w eksperymentach prowadzonych na limfocytach od różnych dawców nie różniły się istotnie. Uzyskane dane sugerują, że soki o stężeniu 1% i 0,1% nie są toksyczne dla limfocytów po 1 i 24 godzinach ekspozycji. W porównaniu z kontrolą od 91 do 98% komórek przeżywało krótkotrwałą ekspozycję na soki o stężeniu 0,1% (tabela 6).

Po 24 godzinach zaobserwowano spadek żywotności limfocytów zarówno dla wszystkich badanych soków, jak i dla kontroli. Żywotność komórek wystawionych na działanie soku o stężeniu 1% była znacznie niższa niż tych inkubowanych w obecności 0,1% ($p < 0,05$). Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano, że dalsze eksperymenty przeprowadzono z użyciem soków owocowych o stężeniu 0,1%.

Komórki poddano również działaniu 100 μM PhIP i stwierdzono, że ich żywotność nie spadła poniżej 98%, a analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między komórkami traktowanymi PhIP a próbką kontrolną po 1 godzinie inkubacji (test t Studenta, $\alpha = 5\%$). Jednak żywotność limfocytów po 24 godzinach ekspozycji na 100 μM PhIP znacznie się zmniejszyła, dlatego eksperymenty z PhIP przeprowadzono z zastosowaniem 1-godzinnej inkubacji.

Nie stwierdzono działania cytotoksycznego tradycyjnych ekstraktów z ziół i owoców podczas 1-godzinnej inkubacji limfocytów pochodzących od zdrowych dawców (tabela 7).

Tabela 5a. Identyfikacja kwasów fenolowych w ekstraktach z ziół i owoców przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej [Kalemba-Drożdż, Kwiecień i wsp. 2020]

Kwasy fenolowe [mg/100ml]														
roślina	ekstrakt	kwas chloroge- nowy	kwas cynamo- nowy	kwas kawowy	kwas elagowy	kwas fenolowy	kwas izofenolowy	kwas gallusowy	kwas p-hydrokso- benzoesowy	kwas p-kumary- nowy	kwas protokate- chinowy	kwas rozmary- nowy	kwas wanilinowy	suma kwasów fenolowych
skórki jabłka <i>Malus domestica</i>	ocet	0,63 ± 0,00						0,24 ± 0,02			0,34 ± 0,01			1,21 ± 0,11
	macerat	0,77 ± 0,29						0,26 ± 0,03			0,37 ± 0,00			1,40 ± 0,03
	nalewka	2,08 ± 0,13						0,10 ± 0,01			0,13 ± 0,00			2,32 ± 0,11
	odwar	0,82 ± 0,01						0,34 ± 0,03			0,39 ± 0,01			1,55 ± 0,03
owoce maliny <i>Rubus idaeus</i>	ocet				2,11 ± 0,07						0,48 ± 0,07			2,59 ± 0,08
	macerat				3,76 ± 0,51						0,95 ± 0,03			4,71 ± 0,11
	nalewka				12,45 ± 1,05						0,91 ± 0,04			13,36 ± 1,01
	odwar				4,31 ± 0,15						1,04 ± 0,03			5,35 ± 0,16
owoce róży <i>Rosa canina</i>	ocet	0,38 ± 0,02						3,09 ± 0,02						3,47 ± 0,02
	macerat	0,43 ± 0,02			0,62 ± 0,07			1,30 ± 0,02						2,34 ± 0,08
	nalewka	2,32 ± 0,19			2,21 ± 0,32			3,71 ± 0,41						8,24 ± 0,53
	odwar	1,65 ± 0,10			1,28 ± 0,05			10,60 ± 0,32						13,53 ± 0,33
liście mięty <i>Mentha piperita</i>	ocet	0,13 ± 0,04		0,07 ± 0,04				0,12 ± 0,04	1,08 ± 0,01				0,07 ± 0,04	1,46 ± 0,40
	macerat	0,17 ± 0,02		0,38 ± 0,02				0,20 ± 0,01	1,09 ± 0,01			0,38 ± 0,01	0,08 ± 0,00	2,30 ± 0,07
	nalewka			0,18 ± 0,00				0,04 ± 0,01				0,70 ± 0,01		0,93 ± 0,01
	odwar	0,04 ± 0,00		0,06 ± 0,00				0,13 ± 0,01				0,23 ± 0,01		0,46 ± 0,01
kwiaty lawendy <i>Lavenda angustifolia</i>	ocet			5,08 ± 0,22		2,63 ± 0,12	1,85 ± 0,01						3,66 ± 0,12	13,22 ± 0,23
	macerat		0,39 ± 0,02	2,98 ± 0,06		3,13 ± 0,43	2,03 ± 0,14					1,73 ± 0,04	2,70 ± 0,06	12,95 ± 0,46
	nalewka		0,59 ± 0,02	4,47 ± 0,14		3,26 ± 0,12	2,99 ± 0,22					4,61 ± 0,33	4,53 ± 0,05	20,44 ± 0,26
	odwar		0,92 ± 0,01	3,71 ± 0,07		3,48 ± 0,07	2,73 ± 0,05					1,33 ± 0,14	3,63 ± 0,11	15,79 ± 0,21
płatki róży <i>Rosa rugosa</i>	ocet									1,27 ± 0,02				1,27 ± 0,02
	macerat							0,41 ± 0,02		0,59 ± 0,02			0,22 ± 0,01	1,21 ± 0,02
	nalewka	7,23 ± 0,59						1,26 ± 1,16		3,04 ± 0,29			0,89 ± 0,03	12,41 ± 0,58
	odwar	3,86 ± 0,16						4,53 ± 0,10		1,31 ± 0,10				9,70 ± 0,15

Tabela 5b. Identyfikacja flawonoidów w ekstraktach z ziół i owoców przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej [Kalemba-Drożdż, Kwiecień i wsp. 2020a]

Flawonoidy [mg/100ml]																		
roślina	ekstrakt	apigenina	katechina	epikatechina	kempferol	3-o-galaktozyd kempferolu	3-o-glukozyd kempferolu	7-ramnozyd kempferolu	luteolina	izokwercetyna	kwercetyna	3-o-arabinoofuran- zyd kwercetyny	3-o-glukuronid kwercetyny	3-ramnozyd kwercetyny	7-o-glukozyd kwercetyny	kwercetyna	rutyzoid	suma flawonoidów
skórki	ocet			780±0,55						1,51±0,12	1,74±0,09	2,21±0,22	7,63±0,14	10,94±0,69			1,82±0,17	33,65±0,95
jabłka	macerat			899±0,28						0,54±0,01	1,95±0,11	3,69±0,31	8,51±0,15	12,86±0,55			2,91±0,14	39,46±0,73
Malus	nalewka			13,28±0,45						1,69±0,04	1,66±0,02	7,57±0,02	19,85±0,65	21,28±2,48			5,70±0,28	71,02±2,62
domestica	odwar			949±0,52						0,71±0,02	1,83±0,09	4,06±0,10	10,92±0,32	11,02±0,13			2,87±0,04	40,91±0,65
owoce	ocet					0,25±0,01									1,15±0,02			1,40±0,02
	macerat				5,70±0,05	1,57±0,04	1,52±0,08	1,33±0,02			1,57±0,04				1,14±0,02			12,83±0,54
	nalewka				6,64±0,05	6,37±0,21	2,33±0,17	1,29±0,05			2,54±0,08				1,17±0,04			20,34±1,10
	odwar				5,54±0,08	0,89±0,06	1,39±0,08	1,20±0,02			1,79±0,00				1,13±0,00			11,92±0,21
owoce	ocet		8,32±0,13													2,03±0,02		10,35±0,21
	macerat		12,04±1,04								1,29±0,01					4,37±0,02	0,77±0,04	18,47±1,04
	nalewka		58,90±0,69								1,46±0,05					3,52±0,06	5,83±0,08	69,71±0,90
	odwar		47,20±0,21								1,36±0,01					2,97±0,02	3,40±0,02	54,93±0,46
liście	ocet		2,28±0,40															2,28±0,40
mięty	macerat	2,03±0,01	3,46±0,07														0,27±0,02	5,75±0,07
Mentha	nalewka	5,17±0,18	0,60±0,03														0,23±0,01	5,99±0,20
ppierita	odwar	2,45±0,12	1,98±0,20															4,43±0,20
kwiaty	ocet									0,29±0,08								0,29±0,08
	macerat									0,57±0,02								0,57±0,02
	nalewka	3,92±0,22							0,63±0,02	1,79±0,04	5,69±0,04					1,73±0,04	5,92±0,25	19,68±0,26
	odwar									0,92±0,01							1,56±0,03	2,49±0,03
angustifolia	ocet			7,03±0,05	3,06±0,02			2,99±0,09							5,14±0,33			18,22±0,36
płatki	macerat		8,36±0,52	1,12±0,04	6,39±0,06	20,11±1,69	8,46±1,02	4,60±0,22			7,72±0,08						2,28±0,11	59,05±2,06
Rosa	nalewka				6,23±0,14	11,63±0,86	12,87±0,86	9,49±1,16			16,41±0,36						4,55±0,36	61,18±1,89
rugosa	odwar		2,76±0,05			4,79±0,03	5,88±0,83	3,84±0,15			6,28±0,19						3,15±0,04	26,69±0,90

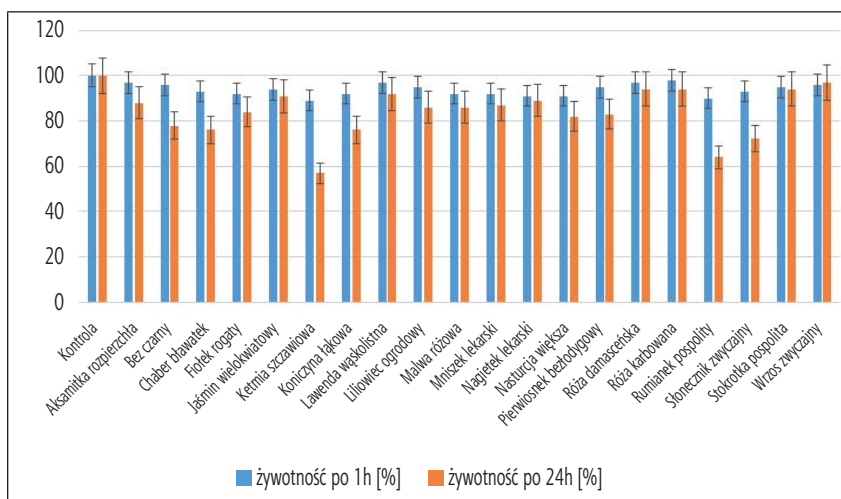
Tabela 6. Żywotność limfocytów od zdrowych dawców po inkubacji z sokami owocowymi przez 1 i 24 godziny

	Żywotność komórek inkubowanych z sokami owocowymi			
	1% 1h ± odch. st.	1% 24h ± odch. st.	0,1% 1h ± odch. st.	0,1% 24h ± odch. st.
kontrola	94,7 ± 4,1	84 ± 6,5	98 ± 1,7	90 ± 2,1
aronia czarna <i>Aronia melanocarpa</i>	88 ± 9,1	83 ± 7,5	94 ± 3,9	83 ± 2,7
bez czarny <i>Sambucus nigra</i>	81,1 ± 5,3	69,8 ± 1,2	82,2 ± 2,1	70,7 ± 3,2
borówka czarna <i>Vaccinium myrtillus</i>	87,7 ± 6,3	52 ± 7,5	95 ± 2,7	83 ± 2,1
jeżyna fałdowana <i>Rubus plicatus</i>	91,1 ± 5,8	87,4 ± 2,8	95,3 ± 3,2	83,4 ± 3,5
malina właściwa <i>Rubus idaeus</i>	87,7 ± 4,9	81 ± 16	97 ± 2,1	80 ± 3,2
rokitnik zwyczajny <i>Hippophae rhamnoides</i>	83,7 ± 8,2	78 ± 7,5	91 ± 3,5	85 ± 1,4
róża pomarszczona <i>Rosa rugosa</i>	86,3 ± 7,6	67 ± 10	95 ± 3,2	83 ± 2,4
żurawina błotna <i>Vaccinium oxycoccos</i>	91,3 ± 3,3	89 ± 0,5	96 ± 1,4	83 ± 2,2

Tabela 7. Żywotność limfocytów od zdrowych dawców po inkubacji z ekstraktami z ziół i owoców przez 1 godzinę w 37°C i w atmosferze zawierającej 5% CO₂

ekstrakt	Żywotność [% kontroli] ± odch. st.			
	ocet fermentowany	macerat octowy	nalewka	odwar
skórki jabłka <i>Malus domestica</i>	82 ± 3	88 ± 2	103 ± 0	99 ± 2
owoc maliny <i>Rubus idaeus</i>	91 ± 8	90 ± 4	105 ± 2	93 ± 1
owoce róży <i>Rosa canina</i>	86 ± 3	106 ± 9	107 ± 0	98 ± 0
liście mięty <i>Mentha piperita</i>	79 ± 0	85 ± 1	89 ± 0	89 ± 0
kwiat lawendy <i>Lavandula angustifolia</i>	80 ± 0	79 ± 4	91 ± 3	93 ± 0
płatki róży <i>Rosa rugosa</i>	73 ± 1	93 ± 2	103 ± 0	100 ± 6

Badanie żywotności komórek po inkubacji przez 1 lub przez 24 godziny z 1-procentowymi ekstraktami kwiatowymi rozcieńczonymi 100-krotnie w medium hodowlanym wykazało, że nie wpływają one znacząco na żywotność limfocytów. Ich średnia żywotność po jednogodzinnej inkubacji z kwiatowymi wyciągami alkoholowymi wynosiła 94,3% ± 2,7%, natomiast po 24 godzinach 86,5% ± 8,5% (wyniki odnoszono do żywotności komórek z próby kontrolnej inkubowanych w pożywce RPMI z 10% FBS) (rycina 26).



Rycina 26. Wyniki badania żywotności limfocytów metodą fluorescencyjnego barwienia różnicowego po inkubacji przez 1 godzinę (niebieskie słupki) i 24 godziny (pomarańczowe słupki) z 1-procentowymi ekstraktami kwiatowymi

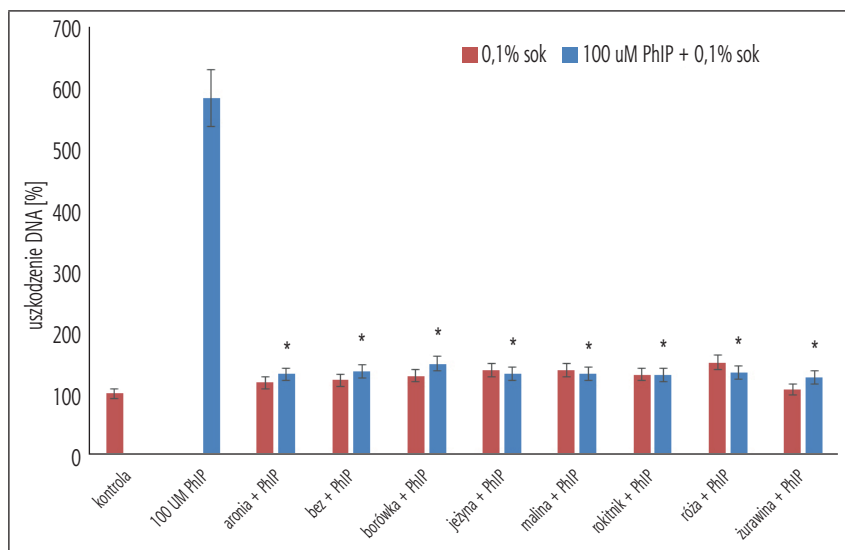
Poddanie limfocytów od zdrowego dawcy działaniu 1-procentowych ekstraktów z liści dzikich roślin jadalnych wykazało, że ekstrakty te nie działały cytotoksycznie po 1 i 24 godzinach inkubacji (tabela 8).

Tabela 8. Żywotność limfocytów inkubowanych z 1-procentowym wyciągiem z liści dzikich roślin jadalnych przez 1 i 24 godziny

Żywotność	1h ± odch. st.	24h ± odch. st.
kontrola	97,7 ± 1,1	89,0 ± 1,0
babka lancetowata (<i>Plantago lanceolata</i>)	89,8 ± 2,4	78,8 ± 6,4
bluszczyk kurdybanek (<i>Glechoma hederacea</i>)	93,4 ± 1,5	87,1 ± 6,0
mniszek lekarski (<i>Taraxacum officinalis</i>)	91,4 ± 2,4	84,0 ± 4,9
pokrzywa zwyczajna (<i>Urtica dioica</i>)	92,8 ± 4,1	84,3 ± 13,9
podagrycznik pospolity (<i>Aegopodium podagraria</i>) – młody liść	91,5 ± 1,4	74,0 ± 5,6
podagrycznik pospolity (<i>Aegopodium podagraria</i>) – dorosły liść	92,1 ± 0,9	67,9 ± 4,0
szczaw zwyczajny (<i>Rumex acetosa</i>)	92,4 ± 1,5	75,4 ± 4,4

Uszkodzenia DNA

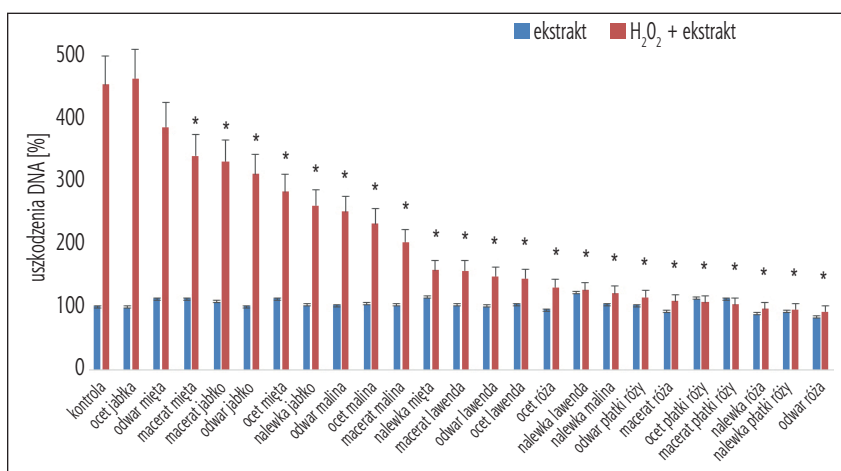
Stwierdzono, że PhIP indukuje uszkodzenie DNA w sposób zależny od dawki ($y = 37,134x + 29,62$; $R^2 = 0,99$). Przy wyższych stężeniach 75 i 100 μM zaobserwowano najsilniejszy potencjał PhIP do indukowania pęknięć nici DNA. W oparciu o te wyniki przeprowadzono dalsze eksperymenty przy użyciu PhIP w stężeniu 100 μM w celu dokładniejszej oceny możliwego ochronnego działania soków jagodowych. Ponieważ DMSO nie miał znaczącego wpływu na uszkodzenie DNA indukowane PhIP ($p > 0,05$), próbki traktowane DMSO uznano za próbkę kontrolną. Aby ocenić wpływ badanych soków z owoców jagodowych na uszkodzenia DNA indukowane przez PhIP, limfocyty poddano równoczesnemu działaniu soków z owoców w stężeniu 0,1% i 100 μM PhIP przez 1 godzinę. Poziom uszkodzenia DNA w limfocytach był znacznie obniżony w porównaniu z komórkami ekspozycjonowanymi tylko na PhIP (rycina 27) (ANOVA $p < 0,001$ we wszystkich przypadkach).



Rycina 27. Uszkodzenia DNA w limfocytach poddanych działaniu soków owocowych (słupki pomarańczowe) i PhIP oraz soków owocowych (słupki niebieskie). Wyniki uzyskane metodą kometową przedstawiono jako % kontroli negatywnej (komórki inkubowane w samym medium). * – różnice istotne statystycznie pomiędzy poziomem uszkodzeń indukowanych PhIP a uszkodzeniami po inkubacji z PhIP razem z sokami owocowymi

W porównaniu do komórek inkubowanych z samymi sokami owocowymi a komórkami inkubowanymi z sokami i 100 μM PhIP nie wykazano znaczącej różnicy w poziomie uszkodzeń DNA, dzięki czemu udowodniono, że owoce dzikorosnących gatunków skutecznie chronią DNA przed uszkodzeniami indukowanymi przez PhIP (ANOVA $p > 0,05$ we wszystkich przypadkach).

Za pomocą testu kometowego wykazano również, że żaden z ekstraktów nie spowodował uszkodzeń DNA limfocytów (rycina 28), a analiza wariancji potwierdziła brak statystycznych różnic między próbkami eksponowanymi na ekstrakty roślinne a próbką kontrolną (ANOVA $p > 0,05$ we wszystkich przypadkach).

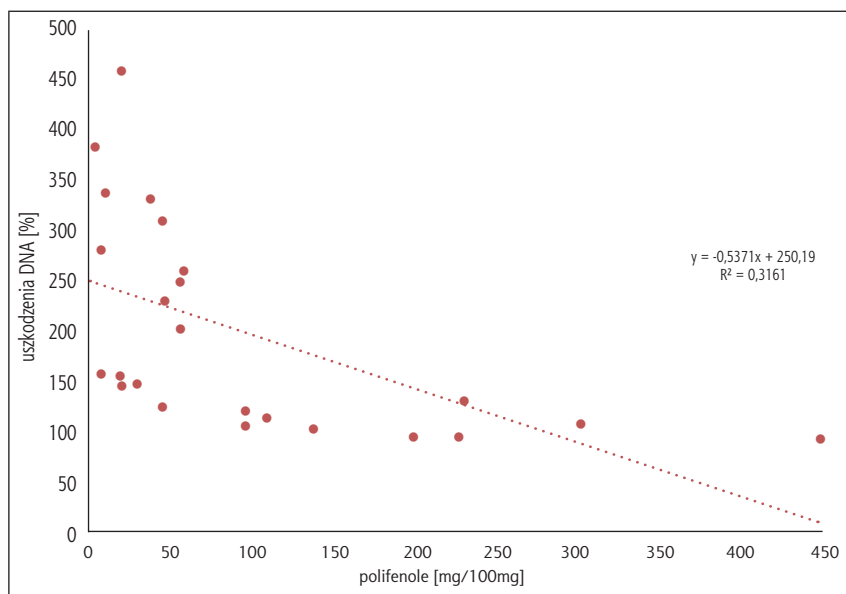


Rycina 28. Uszkodzenia DNA w limfocytach mierzone testem kometowym po ekspozycji na analizowane ekstrakty przez 1 godzinę (słupki niebieskie). Uszkodzenia oksydacyjne DNA indukowano przez inkubację komórek w 25 μM H₂O₂ (słupki pomarańczowe). Wyniki testu kometowego wyrażono jako TDC i przedstawiono jako % uszkodzeń w próbce kontrolnej (komórki hodowane w samym medium) uszeregowane wg malejącej ilości uszkodzeń DNA. * – istotna różnica między wynikami uzyskanymi dla komórek traktowanych ekstraktami roślinnymi i H₂O₂ w porównaniu do komórek kontrolnych traktowanych tylko H₂O₂ według [Kalemba-Drożdż, Kwiecień i wsp. 2020]

Genoprotekcyjne działanie octów, maceratów, nalewek i odwarów z owoców i ziół przeciwko uszkodzeniom DNA analizowano na limfocytach poddanych działaniu nadtlenu wodoru. Poziom fragmentacji DNA w limfocytach był istotnie obniżony w porównaniu z komórkami eksponowanymi tylko na nadtlenek wodoru (ANOVA $p < 0,05$) we wszystkich

próbkach z wyjątkiem fermentowanego octu jabłkowego i odwaru miętownego, w których różnice nie były istotne statystycznie, co pokazano na rycinie 28.

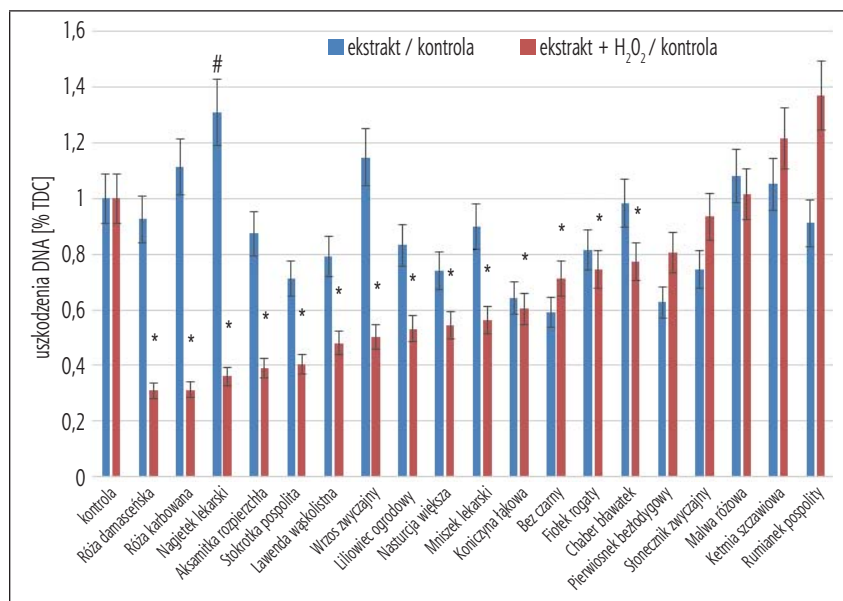
Ochronne działanie ekstraktów owocowych i ziołowych było skorelowane z mocą antyoksydacyjną ($y = -20,513x + 266,93$; $R^2 = 0,3314$; $p = 0,02$) oraz ze stężeniem polifenoli (rycina 29) ($y = -0,5371x + 250,19$; $R^2 = 0,3161$; $p = 0,034$). Najwyższe właściwości ochronne wykazywały nalewki, a najmniejsze octy fermentowane.



Rycina 29. Zależność między zdolnościami genoprotekcyjnymi ekstraktów ziołowych i owocowych a stężeniem związków polifenolowych. Limfocyty ekspozowano na analizowane ekstrakty przez 1 godzinę. Uszkodzenie oksydacyjne DNA indukowano przez inkubację komórek w 25 μM H_2O_2 przez 5 min. Wyniki testu kometowego wyrażono jako TDC i przedstawiono jako % uszkodzeń w komórkach kontrolnych

Za pomocą testu kometowego wykazano, że ekstrakty kwiatowe zasadniczo nie indukowały uszkodzeń w DNA limfocytów (1-procentowe kwiatowe nalewki rozcieńczone 100-krotnie medium hodowlanym). Wyniki przedstawiono na rycinie 30 i wyrażono je jako TDC w komórkach traktowanych ekstraktami w odniesieniu do TDC komórek kontrolnych. Wyjątkiem były ekstrakty z nagietka i koniczyny, które podnosiły poziom uszkodzeń DNA limfocytów nietraktowanych nadtlenkiem wodoru

($p = 0,003$ i $p = 0,018$), jednakże skutecznie chroniły one DNA limfocytów przed uszkodzeniami indukowanymi $25 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ($p = 0,0001$ i $p = 0,0004$).

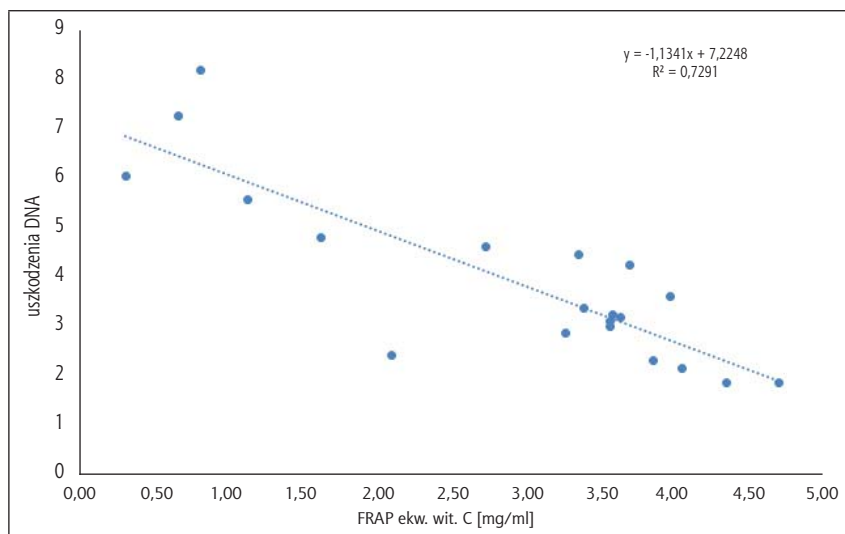


Rycina 30. Poziom uszkodzeń DNA w limfocytach mierzony metodą kometową. Komórki inkubowano w 1-procentowych ekstraktach wodno-alkoholowych z jadalnych kwiatów rozcieńczonych 100-krotnie w medium hodowlanym. Oksydacyjne uszkodzenia DNA indukowano przez inkubację komórek z $25 \mu\text{M}$ nadtlaniem wodoru przez 5 min. Wyniki przedstawiono jako % zawartości TDC w odniesieniu do komórek kontrolnych. Wyniki zostały uszeregowane pod względem malejących właściwości ochronnych przeciwko indukowanemu uszkodzeniom oksydacyjnym DNA. * wyniki ilości uszkodzeń indukowanych nadtlaniem wodoru dla próbek inkubowanych z ekstraktami kwiatowymi istotnie różniące się od kontroli; # – próbka inkubowana z samym ekstraktem, w której ilość uszkodzeń DNA istotnie różniła się od poziomu próbki kontrolnej

Pośród kwiatowych ekstraktów największe właściwości ochronne przeciwko endogennym (nieindukowanym) uszkodzeniom DNA zaobserwowano dla: fiołka rogatego ($p = 0,0011$), pierwiosnki ($p = 0,008$), dzikiego bzu ($p = 0,002$), lawendy ($p = 0,0018$), aksamitki ($p = 0,027$) i wrzосу ($p = 0,034$). Ponadto ekstrakty z róży damasceńskiej ($p = 0,0001$), róży pomarszczonej ($p = 0,0001$), nagietka ($p = 0,0001$), aksamitki ($p = 0,0031$), lawendy ($p = 0,0049$), wrzосу ($p = 0,0073$), czerwonej koniczyzny ($p = 0,018$), czarnego bzu ($p = 0,004$), granatowego fiołka rogatego

($p = 0,016$), chabry ($p = 0,032$) i stokrotki ($p = 0,042$) istotnie chroniły DNA limfocytów przed uszkodzeniami indukowanymi przez nadtlenek wodoru. Jednakże ekstrakty z hibiskusa ($p = 0,034$) i czarnej malwy ($p = 0,012$) zwiększały prooksydacyjny efekt nadtlenku wodoru i indukowały większą ilość oksydacyjnych uszkodzeń DNA limfocytów.

Nie stwierdzono występowania korelacji pomiędzy ilością oksydacyjnych uszkodzeń DNA limfocytów traktowanych 1-procentowymi ekstraktami kwiatowymi rozcieńczonymi 100-krotnie a stężeniem związków polifenolowych w ekstrakcie ($p = 0,231$; $R^2 = 0,128$), ani występowania korelacji poziomu uszkodzeń z FRAP ekstraktów ($p = 0,740$; $R^2 = 0,008$). Jednakże występowała silna negatywna korelacja pomiędzy ilością uszkodzeń DNA indukowanych $25 \mu\text{M}$ nadtlenkiem wodoru ($p = 0,0004$; $R^2 = 0,697$; $y = -0,0096x + 1,2957$) a stężeniem polifenoli (po wykluczeniu z analizy odstających wyników ekstraktów różanych), podobnie jak uszkodzeń z FRAP ($p = 0,00000$; $R^2 = 0,729$; $y = -1,1341x + 7,2248$; bez wykluczeń), co przedstawiono na rycinie 31.



Rycina 31. Zależność między siłą przeciwutleniającą 1-procentowych wodno-alkoholowych ekstraktów kwiatowych mierzoną metodą FRAP wyrażonych jako ekwiwalenty kwasu askorbinowego mg/ml a poziomem indukowanych uszkodzeń oksydacyjnych DNA limfocytów inkubowanych w ekstraktach kwiatowych z $25 \mu\text{M}$ nadtlenkiem wodoru. Wyniki pomiaru ilości uszkodzeń DNA metodą kometową przedstawiono jako względny poziom uszkodzeń komórek ekspozowanych na nadtlenek wodoru i ekstrakty kwiatowe odniesione do komórek kontrolnych

Dyskusja

W pierwszej części eksperymentów zbadano, czy testowane soki zawierają duże ilości związków przeciwutleniających. Badane soki różniły się zawartością antocyjanów i flawonoidów. Skład fitochemiczny aronii, owoców dzikiej róży i borówki czarnej charakteryzował się przewagą antocyjanów, co jest zgodne z opublikowanymi danymi [Murathan i wsp. 2016, Bhawe i wsp. 2017, Tian i wsp. 2017, Bujor i wsp. 2016, Stanisavljević 2015]. Najniższy stosunek antocyjanów do całkowitej zawartości fenoli stwierdzono w rokitniku, który odznaczał się wysoką zawartością flawonoidów, porównywalną z innymi badaniami [Bhawe i wsp. 2017, Fatima i wsp. 2015].

Szczególnie wysokie stężenia polifenoli stwierdzono w soku z owoców róży, a zawartości flawonoidów i antocyjanów były w nim najwyższe spośród badanych soków [Elmastas i wsp. 2017, Murathan i wsp. 2016, Bhawe i wsp. 2017, Hidalgo i Almajano 2017]. Potwierdzono, że pasteryzowany sok tłoczony z owoców dzikiej róży również zawiera duże ilości witaminy C, ponad 260 mg/100 ml, podczas gdy jej zawartość w świeżych owocach waha się od 400 do 2500 mg/100 g [Gu i wsp. 2013, Cunha i wsp. 2016, Olech i wsp. 2017]. Ponadto w tym badaniu potwierdzono istotną aktywność przeciwrodnikową i właściwości genoprotekcyjne owoców dzikiej róży [Kalemba-Drożdż i Cierniak 2013].

Borówki czarne, które rosną w Ameryce Północnej, Europie, Azji i Afryce, są również znane jako czarne jagody, borówki leśne lub borówki europejskie, aby odróżnić je od borówki amerykańskiej, czyli borówki wysokiej (*Vaccinium cyanococcus*). Nasze wyniki pozostają zgodne z obserwacjami, że różne gatunki borówek (*Vaccinium*) wykazują działanie przeciwnowotworowe, szczególnie ze względu na ich właściwości antyoksydacyjne [Bujor i wsp. 2016, Hidalgo i Almajano 2017, Wang i wsp. 2017, Katsube i wsp. 2003].

Podobnie sok z aronii wykazuje działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne dzięki zmiataniu wolnych rodników [Tian i wsp. 2017, Stanisavljević i wsp. 2015, Jurikova i wsp. 2017]. Jednakże zaobserwowano, że sok z aronii wzmacnia działanie rakotwórcze N-nitrozodietyleaminy w wątrobie szczura [Kujawska i wsp. 2016], zaś w naszych badaniach stwierdzono, że sok z aronii zwiększa tworzenie reaktywnych form tlenu

(RFT) w ludzkich limfocytach inkubowanych z PhIP, co może wskazywać na możliwości wykorzystania aronii w terapii wspomagającej.

Potwierdzono, że sok z rokitnika zwyczajnego zawiera flawonoidy jako dominującą frakcję polifenoli, jednak proces tłoczenia i pasteryzacji soku powoduje utratę witaminy C do 48 mg/100 ml, podczas gdy w świeżych owocach odnotowuje się jej stężenie na poziomie od 114 do 1550 mg/100 g. Sok z rokitnika działa genoprotekcyjnie, potwierdzono również jego właściwości antyoksydacyjne [Tian i wsp. 2017, Fatima i wsp. 2015, Xu i wsp. 2011]. Z kolei sok z żurawiny zawierał przewagę flawonoidów, jednak stężenie polifenoli było znacznie niższe niż publikowane dane [Bujor i wsp. 2016, Juríková i wsp. 2021]. Niektóre badania sugerowały, że żurawina ma właściwości genoprotekcyjne [Izquierdo-Vega i wsp. 2017, Vu i wsp. 2012], a nasze wyniki potwierdziły ochronne działanie żurawiny przed uszkodzeniami DNA indukowanym przez PhIP. Maliny zawierają flawonoidy i antocyjany na porównywalnym poziomie do żurawiny [Ponder i Hallmann 2019, Tian i wsp. 2017, Szymanowska i wsp. 2018] i mają udowodnione działanie przeciwutleniające [Ponder i Hallmann 2019, Szymanowska i wsp. 2018].

Wyniki badania wskazują, że PhIP prowadzi do indukcji uszkodzeń DNA w zdrowych limfocytach w sposób zależny od dawki, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [Kurzawa-Zegota i wsp. 2012, Jain i wsp. 2015, Pezdirc i wsp. 2013]. Biorąc pod uwagę, że PhIP jest jedną z najobficiej występujących amin genotoksycznych w diecie człowieka [Richling i wsp. 1998], celem naszego badania było ustalenie, czy soki z dzikich owoców mogą modyfikować szkodliwy wpływ PhIP na zdrowe limfocyty.

Jako przedmiot badań wybrano soki owocowe, które można bezpośrednio spożywać w diecie człowieka, zamiast izolowanych fitochemikaliów, ponieważ przypuszczalnie wykazują one większe korzyści zdrowotne dzięki synergicznemu działaniu polifenoli, witamin i innych składników odżywczych [Lansky i wsp. 2005, Seeram i wsp. 2005]. Należy podkreślić, że warto badać potencjał prozdrowotny całych produktów dietetycznych, gdyż z dietą nie przyjmujemy tylko mieszanek karotenoidów, polifenoli, witamin, minerałów, amin i innych składników – te składniki aktywne funkcjonują w kompleksowych i zrównoważonych układach, które charakteryzują się szerokim spektrum synergicznego działania i to właśnie te układy, a nie wyizolowane związki, spożywamy w pokarmie roślinnym. Inkubacja komórek w soku o stężeniu 0,1% jest porównywalna ze

stężeniem polifenoli w surowicy uzyskiwanym po spożyciu 60 ml soku owocowego [Nguyen i wsp. 2010, Hollmann i wsp. 1997]. Ponieważ jednak owoce mogą różnić się zawartością fitochemikaliów między różnymi odmianami, a ponadto ze względu na pogodę, region występowania, wysokość nad poziomem morza, czas zbioru i stopień dojrzałości owocu [Elmastaş i wsp. 2017, Ponder i Hallmann 2019, Islam i wsp. 2017], badania z wykorzystaniem wyodrębnionych związków mogą być pomocne w zrozumieniu mechanizmu obserwowanych zjawisk. Należy jednak stwierdzić, że badanie jest zawsze uproszczonym modelem, podczas gdy soki tłoczone bezpośrednio z owoców o zróżnicowanym składzie fitochemicznym spotykają się z różnorodnością reakcji różnych tkanek oraz zmiennością międzyosobniczą ludzi wynikającą z polimorfizmu genetycznego, stanu hormonalnego i wyzwań metabolicznych przed jakimi stoi organizm, a co za tym idzie bardziej odpowiadają rzeczywistości spożywaniu pokarmów niż wyizolowane związki chemiczne. Dlatego badania *in vitro* są badaniami wstępnymi pomagającymi ocenić stosowność prowadzenia dalszych badań *in vivo*.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że dzikie owoce pochodzące z półkuli północnej działają jako przeciwutleniacze i substancje genoprotekcyjne, a wszystkie testowane wyciskane soki owocowe są w stanie zmniejszyć uszkodzenia DNA wywołane przez PhIP. Efekt ochronny można uzyskać poprzez bezpośrednie działanie antyoksydacyjne, ale możliwe są również inne mechanizmy, jak np. aktywacja enzymów detoksykacyjnych [Platt i wsp. 2010]. Działanie przeciwutleniające może również wynikać z zawartości witaminy C w sokach owocowych, jednak, jak zaobserwowano również w innych badaniach, polifenole mają istotny udział w działaniu przeciwutleniającym, podczas gdy kwas askorbinowy w niewielkim stopniu przyczynia się do całkowitej zdolności antyoksydacyjnej [Hidalgo i wsp. 2017]. Niemniej jednak soki zawierają mniej witaminy C niż świeże owoce, ponieważ częściowo ulega ona rozpadowi podczas przetwarzania. Mimo to soki wykazują silny potencjał przeciwutleniający, który jest skorelowany z całkowitym stężeniem polifenoli.

W przypadku porównania octów fermentowanych z owoców jadalnych i ziół aromatycznych z innymi rodzajami ekstraktów tradycyjnie przygotowywanych do celów kulinarnych i leczniczych, takimi jak: maceraty octowe, odwary i nalewki, wykazano, że ekstrakty te różniły się istotnie pod względem zawartości analizowanych składników aktywnych.

Można było zaobserwować istotne różnice między właściwościami oraz rodzajami ekstraktów uzyskanych z różnych roślin. Dlatego twierdzenie, że tylko jedna metoda ekstrakcji jest właściwa dla wszystkich ziół i owoców, nie jest uzasadnione.

Badanie to po raz kolejny udowadnia, że owoce dzikiej róży są materiałem roślinnym bardzo bogatym w polifenole [Bhave i wsp. 2017, Murathan i wsp. 2016, Cunha i wsp. 2016, Olech i wsp. 2017]. Należy jednak pamiętać, że skład fitochemiczny owoców może się różnić w zależności od wielu czynników, takich jak etap dojrzewania, pogoda, miejscowy klimat [Szymanowska i wsp. 2017, Ponder i Hallmann 2019, Senica i wsp. 2017]. Wyłącznie ekstrakty z owoców dzikiej róży można uznać za dobre źródło witaminy C, ponieważ 100 g każdego z analizowanych ekstraktów z tych owoców może pokryć zalecane dzienne spożycie tej witaminy [USDA], co jest zgodne z dostępnymi danymi na ten temat [Cunha i wsp. 2016, Olech i wsp. 2017]. Najwyższe stężenie kwasu askorbinowego stwierdzono w odwarze z owoców dzikiej róży, co sugeruje, że byłby to najlepszy sposób na przetwarzanie tych owoców. Co więcej, tylko odwar z dzikiej róży zawierał wykrywalne ilości karotenoidów w stężeniu powyżej 1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, choć nadal jest to wartość niska w porównaniu z zalecanym dziennym spożyciem, które wynosi 800 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ [USDA]. Niewielkie ilości karotenoidów obecne w ekstraktach są wynikiem zastosowania rozpuszczalników polarnych. Do skutecznej ekstrakcji karotenoidów należałoby zastosować rozpuszczalniki apolarne, jak eter i aceton, lub w przypadku naśladowania metod używanych w sztuce kulinarnej zastosować macerację olejową, a jak udowodniono, spożywanie owoców bogatych w karotenoidy w towarzystwie tłuszczów zwiększa absorpcję tych związków [White i wsp. 2017].

Analizowane ekstrakty silnie różniły się właściwościami antyoksydacyjnymi w zależności od rodzaju i rośliny, z której zostały sporządzone, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami [Kalemba-Drożdż i Cierniak 2019, Moon i wsp. 2006, Kalemba-Drożdż i Cierniak 2013]. Nie jest możliwe jednoznaczne wskazanie, który rodzaj ekstraktu jest najlepszy dla każdego materiału roślinnego, ponieważ jego skład zależy od materiału użytego do przygotowania i sposobu ekstrakcji; można jednak zaobserwować pewne prawidłowości. Przede wszystkim najwyższe stężenie flawonoidów stwierdzono głównie w nalewkach, co uzasadnia fitoterapeutyczne zastosowanie tego typu ekstraktów.

Nalewki są nie tylko bogatym źródłem flawonoidów i antocyjanów, ale dodatkowo większość nalewek charakteryzuje się najwyższymi zdolnościami antyoksydacyjnymi. Potwierdza to wyniki wcześniejszych badań, wskazujące, że ekstrakcja etanolem jest bardzo skuteczną metodą ujawniania właściwości przeciwutleniających ziół [Kalemba-Drożdż i Cierniak 2019]. Fermentowane octy i maceraty octowe przygotowane z tych samych roślin nie różniły się istotnie pod względem siły przeciwutleniającej, która w obydwu przypadkach była dość niska. Ponadto analiza HPLC wykazała, że octy fermentowane z analizowanych ekstraktów charakteryzowały się najmniej zróżnicowaną zawartością polifenoli.

Siła przeciwutleniająca tradycyjnych typów ekstraktów była skorelowana z zawartością polifenoli i wpływała na ich właściwości genoprotekcyjne [Demasi i wsp. 2021, Oalde i wsp. 2021, Rivas-García i wsp. 2021, Kalemba-Drożdż i Cierniak 2019, Budak i wsp. 2014, Suksathan i wsp. 2021], zaś kwasowość ekstraktu nie była w tym kontekście istotna [Zhang, Xia i wsp. 2019, Zhao i wsp. 2020]. Stwierdzono, że skórki jabłek, odvary z mięty i sfermentowane octy mają najniższe właściwości genoprotekcyjne, podczas gdy ekstrakty z owoców dzikiej róży i płatków róży są najbardziej aktywnymi czynnikami genoprotekcyjnymi. Niska ranga odwarów może zależeć od termolabilności niektórych przeciwutleniaczy, natomiast niska zdolność antyoksydacyjna octów fermentowanych może być spowodowana dostępnością tlenu przez cały okres ekstrakcji (cztery tygodnie), co może przyczyniać się do utleniania niektórych fitochemikaliów lub ich częściowego zużycia przez prowadzące proces fermentacji octowej mikroorganizmy.

Uzyskane wyniki dowodzą, że ekstrakty z jadalnych kwiatów posiadają właściwości przeciwutleniające, a potencjał antyoksydacyjny różni się pomiędzy gatunkami roślin.

Decyzja o wyborze 40-procentowych nalewek do eksperymentów na komórkach była uzasadniona wcześniejszymi wynikami, które wskazywały, że wyciągi etanolowo-wodne miały najbardziej złożony skład z analizowanych ekstraktów. Przy projektowaniu doświadczenia założono, że jadalne kwiaty są zazwyczaj spożywane jako część złożonego posiłku, a zatem są zjadane z dodatkiem tłuszczów i wody, zatem zarówno składniki polarne, jak i apolarne będą miały szansę zostać wchłonięte z układu pokarmowego.

Najbardziej interesujące wyniki uzyskano dla różnych ekstraktów przygotowanych z kwiatów z rodzaju *Rosa*. Potwierdzono, że kwiaty róży pomarszczonej oraz róży damasceńskiej posiadają silne właściwości przeciwutleniające [Wang, Miao i wsp. 2016, Pires i wsp. 2018, Kalim i wsp. 2010, Saxena i wsp. 2012, Hajhashemi i wsp. 2010, Mileva i wsp. 2021].

Jaśmin jest uważany za źródło składników przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowych i przeciwzapalnych, jak np. oleuropeina [Zhao i wsp. 2009], jednak nasze wyniki nie wykazały przeciwutleniających właściwości wyciągów z jaśminu w zastosowanych w badaniu stężeniach.

Uzyskane rezultaty potwierdziły, że chaber bławatek charakteryzuje się raczej słabym potencjałem przeciwutleniającym i zdolnościami ochronnymi, a także bardzo niskim stężeniem polifenoli w hydrolacie [Pires i wsp. 2018, Moein i wsp. 2012, Kucekova i wsp. 2013]. Podobne obserwacje poczyniono dla ekstraktów ze stokrotki i pierwiosnka, które posiadają umiarkowane zdolności przeciwutleniające i genoprotekcyjne. Jednakże inni badacze wskazują na możliwość cytotoksycznego działania stokrotek na komórki transformowane [Kucekova i wsp. 2013], co przy wykazaniu przez nas braku jej szkodliwości względem komórek zdrowych otwiera pole do dalszych badań nad możliwością zastosowania stokrotek w terapii wspomagającej.

Fiołki rogate o granatowych kwiatach okazały się mieć silne właściwości redukcyjne stanowiąc cenne źródło polifenoli [González-Barrio i wsp. 2018, Koike i wsp. 2015, Kucekova i wsp. 2013], tym samym potwierdzając silny potencjał przeciwutleniający kwiatów z rodzaju *Viola*.

Potwierdzono także, że wyciągi z aksamitki są bogate w przeciwutleniacze [Navarro-González i wsp. 2014] oraz że kwiaty czarnego bzu, jako surowiec bogaty w kwercetynę, kwas kawowy, waniliowy i galusowy, wykazują silne właściwości przeciwutleniające [Viapiana i Wesolowski 2017].

Jak uprzednio wykazano, nagietek działa cytotoksycznie na transformowane linie komórkowe [Mubashar i wsp. 2015]. Nasze wyniki wskazują na genotoksyczne działanie tynktury z nagietka na limfocyty, aczkolwiek inne doniesienia sugerują, że ekstrakty wodne z nagietka nie wykazywały efektu genotoksycznego na limfocytach od zdrowego dawcy. Nagietek posiada silne właściwości przeciwutleniające, co zostało wielokrotnie potwierdzone [Pires i wsp. 2017, Villanueva-Bermejo i wsp. 2019, Lovecka i wsp. 2017, Alexandre i wsp. 2018]. Ze względu na popularność tych

kwiatów w fitoterapii warto rozważyć podjęcie dalszych badań nad ich potencjalnym działaniem genotoksycznym oraz nad różnicami w składzie pomiędzy ekstraktem alkoholowym a wodnym. Podobnie prezentuje się kwestia koniczyny, która w naszych badaniach wykazywała genotoksyczność względem komórek zdrowych, natomiast inne doniesienia wskazują na możliwość skutecznego zmniejszenia żywotności komórek nowotworowych z użyciem ekstraktów koniczynowych [Kucekova i wsp. 2013].

Tymczasem płatki słonecznika, malwy czarnej, rumianku i hibiskusa nie wykazywały działania antyoksydacyjnego ani ochronnego przeciwko uszkodzeniom DNA, co nie potwierdza wyników uzyskanych w innych badaniach [Riaz i Chopra 2018, Abdel-Salam i wsp. 2018]. Co więcej hibiskus i czarna malwa nasilały działanie genotoksyczne nadtlenku wodoru. Może to wskazywać trop do podjęcia badań nad możliwością wykorzystania ekstraktów z tych kwiatów w terapii skojarzonej. Szczególnie że stwierdzono, iż izolowana z kwiatów hibiskusa gossypina stymuluje apoptozę komórek czerniaka [Bhaskaran i wsp. 2013].

Oczywiście należy pamiętać, że właściwości przeciwutleniające kwiatów nie zależą wyłącznie od polifenoli. Żółte i pomarańczowe kwiaty zawierają karotenoidy, które również mogą wpływać na korelację pomiędzy potencjałem przeciwutleniającym a stężeniem polifenoli. W naszym badaniu dobrym przykładem takiego przypadku może być aksamitka, dla której wyniki FRAP wyraźnie odstawały od trendu korelacji między siłą redukcijną a zawartością polifenoli, co sugeruje, że obecność karotenoidów, najprawdopodobniej luteiny, może być odpowiedzialna za ten wynik [Park i wsp. 2017].

Przypadek wrzосу, nagietka i lawendy sugeruje, że bezpośrednie działanie przeciwutleniające nie jest jedynym mechanizmem, w jaki wyciągi roślinne oddziałują na komórki, a pod uwagę mogą być brane także zmiana aktywności enzymów, modyfikacja przeżywalności wewnątrzkomórkowego lub zmiany ekspresji genów [Villanueva-Bermejo i wsp. 2019, Moein i wsp. 2012, Loizzo i wsp. 2016, Kwon i wsp. 2010].

Wstępne badania wskazują, że konsumenci są gotowi do zakupu posiłków z jadalnymi kwiatami, jeżeli przyniosą one korzyści zdrowotne [Rodrigues i wsp. 2017]. A zatem jest to cecha, która powinna być podkreślana podczas promocji kwiatów jako pożywienia. Co jest jeszcze warte podkreślenia, to fakt, że poza silnymi właściwościami

przeciwutleniającymi i chemoprewencyjnymi jadalne kwiaty mają ciekawy smak, zapach, teksturę i atrakcyjny wygląd [Kalemba-Drożdż 2021a]. Jednakże nadal istnieje paląca potrzeba powszechnej edukacji botanicznej na temat rozróżniania gatunków kwiatów, które można spożywać [Kalemba-Drożdż 2019a].

Podobnie wygląda kwestia dzikich roślin rosnących powszechnie, często uważanych za chwasty. Źródła etnobotaniczne potwierdzają, że rośliny takie jak pokrzywa, mniszek czy podagrycznik były tradycyjnym pokarmem od wieków, jednak obecnie ich użycie spożywcze w Europie jest mało popularne i charakterystyczne dla endemicznych społeczności [Pinela i wsp. 2017, Bacchetta i wsp. 2016, Łuczaj 2011, Dogan i wsp. 2015, Molina i wsp. 2014, Pasta i wsp. 2020, Vorstenbosch i wsp. 2017, Pieroni i Sõukand 2018, Biscotti i Pieroni 2015, Cucinotta i Pieroni 2018, Chevalier i wsp. 2014].

Ogólnie ekstrakty z liści dzikich roślin charakteryzowały się nieco niższymi zdolnościami przeciwutleniającymi niż ekstrakty z jadalnych kwiatów, jednak nie można ich bezpośrednio porównywać ze względu na odmienne sposoby uzyskiwania wyciągów.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że liście podagrycznika pospolitego, pokrzywy zwyczajnej, babki lancetowatej, mniszka lekarskiego, szczawiu zwyczajnego, bluszczyku kurdybanka posiadają właściwości przeciwutleniające i nie działają cytotoksycznie, zatem włączenie ich do codziennej diety może być korzystne zarówno w kontekście działań chemoprewencyjnych, jak i również ze względu na ich właściwości odżywcze i walory smakowe [Mahlangeni i wsp. 2020, Jakubczyk i wsp. 2020, Kalemba-Drożdż 2021b, Rutto i wsp. 2015].

Prowadzone są dalsze badania nad właściwościami genoprotekcyjnymi wyciągów z liści pospolitych, dzikich roślin jadalnych.

Wnioski

Dla zachowania zdrowia rośliny powinny stanowić podstawę naszej diety [WHO 2003]. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazują, że soki wyciskane z dzikich owoców rosnących na półkuli północnej są bogate w polifenole i wykazują dużą zdolność do zmniejszania uszkodzeń DNA indukowanych przez kancerogeny. W związku z tym, że w naszej diecie

obecne są zarówno związki kancerogenne, jak i chemoprewencyjne, wyniki uzyskane w tym badaniu pozwalają na zrozumienie roli interakcji pomiędzy składnikami spożywanymi na co dzień.

Oprócz soków wyciskanych bezpośrednio z owoców, ekstraktem, który wydaje się zapewniać najwyższe stężenie fitochemikaliów i ich największą różnorodność, są ekstrakty wodno-alkoholowe, jak tynktury i intrakty. Tymczasem inny typ ekstraktów – octy fermentowane z owoców i ziół, również może znaleźć zastosowanie w chemoprewencji. Choć mają one stosunkowo niski potencjał przeciwutleniający, to ich zaletą jest, że mogą dostarczać substancje aktywne, a jednocześnie nie zawierają alkoholu, cukru i są niskokaloryczne [USDA]. Ponadto można je wytwarzać z resztek, takich jak skórki owoców, co jest zgodnie z wiodącym trendem *zero waste*. Jednak niskie pH octów sprawia, że mogą one nasilać negatywne objawy ze strony przewodu pokarmowego oraz zmiękczać szkliwo zębów [Budak i wsp. 2014, Akbulut i wsp. 2019]. Niemniej jednak w typowych zastosowaniach octów używa się ich jedynie w niewielkich ilościach jako dodatek do żywności lub napojów, stąd ich niskie pH ma niewielki wpływ na organizm, mimo że podaż związków roślinnych z octu jest raczej ograniczona. Niestety skład fitochemiczny octów fermentowanych jest gorszy w porównaniu z nalewkami i odwarami, które są powszechnie stosowane zarówno w medycynie tradycyjnej, jak i w kulinariach. Jednak w związku z ciągle rosnącym zapotrzebowaniem na fitochemikalia i antyoksydanty oraz w nawiązaniu do słów Hipokratesa: „Niech jedzenie będzie twoim lekarstwem, a lekarstwo twoim pożywieniem”, wskazane jest włączenie naturalnych polifenoli do codziennej diety w każdy możliwy sposób. Nawet niewielka ilość flawonoidów dostarczanych w postaci ekstraktów nadal stanowi dodatkowe źródło przeciwutleniaczy w diecie.

Składniki żywności mogą modulować ryzyko powstania nowotworów, stąd niesłabnąca potrzeba dostarczania do organizmu antyoksydantów. Zioła, kwiaty i owoce są ważnym źródłem składników chemoprewencyjnych, takich jak polifenole, zwłaszcza flawonoidy [Kalemba-Drożdż, Cierniak i wsp. 2020, Kalemba-Drożdż i Cierniak 2019]. Szereg badań sugeruje, że dieta roślinna jest uważana za najbardziej korzystną dla człowieka, a spożywanie żywności bogatej w polifenole zmniejsza ryzyko zachorowania na nowotwory [Vanamala 2015, Afrin i wsp. 2016, Aqil i wsp. 2016, López-Romero i wsp. 2018, Wang i wsp. 2017, Lachat 2018, Rodriguez-Casado 2016, Miller i wsp. 2017, GBD 2019].

Podsumowanie

Jak wykazano, jednym z najważniejszych czynników zapobiegania chorobom nowotworowym jest naturalna żywność zasobna w przeciwutleniacze, a nie suplementy diety [Cuzick 2017]. Jednym z powodów przewagi żywności nad tabletkami jest różnorodność składników chemoprewencyjnych, której nie oferuje żaden producent suplementów [Megathan i Fu 2016]. Wychodząc naprzeciw potrzebie poprawy jakości diety i zwiększenia siły przeciwutleniającej codziennych posiłków [Vanamala 2015] można stwierdzić, że obecność w diecie dzikich owoców, jadalnych kwiatów i liści dzikich roślin może wzmocnić zdolności chemoprewencyjne organizmu.

Niezwykle ważne jest podkreślenie znaczenia polifenoli w utrzymaniu zdrowia, ponieważ zazwyczaj ani dane żywieniowe, ani dokumenty dotyczące zalecanych diet żywieniowych nie zawierają informacji o konieczności spożywania związków fenolowych. Dietetyka klasyczna skupia się wyłącznie na zapewnieniu zaspokojenia zapotrzebowania żywieniowego na witaminy, mikroelementy i składniki energetyczne. Może to prowadzić do złudnego wrażenia, że suplementacja składników analitycznych jest w stanie zaspokoić wszystkie potrzeby żywieniowe, podczas gdy polifenole, zwłaszcza flawonoidy, wydają się mieć istotny wpływ na zdrowie człowieka, a ich jedynym źródłem w diecie są rośliny. Korzyści płynące ze spożywania owoców, kwiatów i ziół są nie do przecenienia [López-Romero i wsp. 2018, Rodriguez-Casado 2016, Miller i wsp. 2017] i im więcej rodzajów roślin zjemy, tym więcej korzyści dla naszego zdrowia [Lachat 2018]. Dlatego dzikie owoce, jadalne kwiaty i dzikorosnące rośliny jako naturalne źródło polifenoli, powinny być polecane w codziennej diecie.

Podziękowania

Badania były finansowane przez Fundusz Badań Naukowych Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego.

Badania octów fermentowanych zostały sfinansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki (NCN) Nr: 2018/02/X/NZ9/02185.

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego jest partnerem Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) wspieranego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.