

MAŁGORZATA ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA, ANNA OLEJNIK,  
WŁODZIMIERZ GRAJEK

## WPLYW SOKU Z BURAKA ĆWIKŁOWEGO I ARONII *IN VITRO* NA METABOLIZM TIENOWY I APOPTOZĘ LUDZKICH GRANULOCYTÓW OBOJĘTNOCHŁONNYCH

### Streszczenie

Jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu (RFT) w organizmie człowieka są pobudzone granulocyty obojętnochłonne (PMN). Zachwianie równowagi pomiędzy produkcją RFT a ich detoksykacją przez ustrojowe systemy przeciwutleniające prowadzi do stanów zapalnych związanych z infiltracją granulocytów oraz rozprzestrzenienia się reakcji utleniania komórkowych makrocząsteczek, co m.in. może prowadzić do inicjacji karcinogenezy. Apoptoza PMN jest fizjologiczną programowaną śmiercią komórki, która może ograniczyć proces zapalny. Enzymami, którym przypisuje się kluczowe znaczenie w przebiegu efektorowej, nieodwracalnej fazy apoptozy są kaspazy.

Celem pracy była ocena wpływu soku z buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris var. rubra*) i aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa Elliot*) na metabolizm tlenowy i apoptozę ludzkich granulocytów obojętnochłonych. Oceniano intensywność chemiluminescencji zależnej od luminolu PMN aktywowanych estrami forbolu, stężenie nadtlenu wodoru metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem diocytanu 2',7'-dichlorofluorescyny oraz aktywność kaspazy 3 metodą FIENA. Stwierdzono, że:

- sok z buraka ćwikłowego lub aronii skutecznie hamował produkcję reaktywnych form tlenu przez aktywne granulocyty w testach *in vitro*,
- badane preparaty indukowały aktywność kaspazy 3 stymulowanych PMN po 24 h inkubacji. Wyniki wskazują, że badane składniki żywności mogą być obiecującym elementem chemioprefilaktyki nowotworowej.

**Słowa kluczowe:** burak ćwikłowy, aronia, przeciwutleniacze, wybuch oddechowy, apoptoza, granulocyty obojętnochłonne

### Wprowadzenie

Reaktywne formy tlenu (RFT) odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu schorzeń, zwłaszcza chorób zapalnych, nowotworowych i chorób układu krążenia [7]. Po-

---

*Dr M. Zielińska-Przyjemka, Zakład Biochemii, Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, dr inż. A. Olejnik, prof. dr hab. W. Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań*

budzone granulocyty obojętnochłonne (PMN) są jednym z głównych źródeł RFT w organizmie człowieka. Komórki te fagocytują i niszczą w fagolizosomach atakujące organizm drobnoustroje. Zachwianie równowagi pomiędzy produkcją RFT a ich detoksykacją przez ustrojowe systemy przeciwutleniające prowadzi do stanów zapalnych związanych z infiltracją granulocytów oraz rozprzestrzenienia się reakcji utleniania komórkowych makrocząsteczek, co m.in. może prowadzić do inicjacji karcinogenezy [7]. Apoptoza PMN jest fizjologiczną, programowaną śmiercią komórki, która może ograniczyć proces zapalny [8, 19]. Utrzymanie niskich stężeń RFT w organizmie i ograniczenie produktów ich działania jest możliwe dzięki występowaniu w komórkach przeciwutleniających mechanizmów obronnych, w tym występowanie egzogennych przeciwutleniaczy [7, 4]. Działania prewencyjne upatruje się między innymi w optymalnym wykorzystaniu potencjału przeciwutleniającego niektórych składników żywności. Naturalne przeciwutleniacze dostarczone z pożywieniem, po wchłonięciu do krwioobiegu oddziałują na układ przeciwutleniający osocza poprzez neutralizowanie wolnych rodników, przerywanie łańcuchowej reakcji wolnorodnikowej, chelatowanie jonów metali katalizujących utlenianie, hamowanie szybkości enzymatycznego utleniania [4].

Celem badań była ocena *in vitro* wpływu soku z buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris* var. *rubra*) i aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* Elliot) na metabolizm tlenowy i apoptozę ludzkich granulocytów obojętnochłonnych. Produkty te w pierwszej kolejności zostały zbadane w Zakładzie Technologii Owoców i Warzyw Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Akademii Rolniczej w Poznaniu, gdzie nastąpiła ocena surowca pod względem zawartości polifenoli i opracowano warunki ich wyodrębniania w postaci koncentratów o możliwie dokładnie zdefiniowanym składzie oraz przygotowano jednolite próbki do badań *in vitro*. Następnie do kultury komórkowej wprowadzano produkty w postaci koncentratów, jak i poddane uprzednio trawieniu w tzw. sztucznym przewodzie pokarmowym, aby możliwie wiernie odtworzyć warunki panujące w jelicie cienkim.

### **Materiał i metody badań**

Krew żylną pobierano od zdrowych ochotników Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa do próbek S-Monovette z heparyną (10UI/ml). Granulocyty pozyskiwano metodą wirowania w gradiencie Gradisolu G (prod. "Aqua Medica" s.c., o składzie 28% uropoliny i 5% dekstranu 200 000, o ciężarze właściwym 1,115 g/ml) [9]. We wszystkich doświadczeniach uwzględniono odpowiednie układy kontrolne zapewniające właściwą czystość zawiesin komórkowych (>95%), żywotność (>95%) oceniana testem z błękitem trypanu) oraz ewentualny wpływ cytotoksyczny badanych preparatów (test MTT). W celu oceny wpływu badanych substancji na stymulowaną produkcję RFT, komórki pobudzano estrami forbolu (PMA- aktywator ki-

nazy białkowej C), który indukuje wybuch oddechowy PMN poprzez aktywację oksydazy NADPH granulocytów i zwiększa produkcję ROS przez te komórki, podobnie jak bakterie i inni niepożądani intruzi [7].

Badane preparaty: sok z buraka przygotowano w Zakładzie Technologii Owoców i Warzyw Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Akademii Rolniczej w Poznaniu. Zawartość barwników czerwonych (betacyjaniny) i żółtych (vulgaksantyny) oznaczano spektrofotometrycznie metodą różnicową wg Nilsona [22]. Średnia zawartość betacyjanin wynosiła 159,58 mg/100 ml, natomiast vulgaksantyn 79,31 mg/100 ml. Aktywność przeciwutleniającą badanego soku oznaczano wg Re i wsp. [25]. Wynosiła ona 23 515 mmol Troloxu/l soku.

Sok z aronii wyprodukowała firma PTHU ECOAR (Lewin Kłodzki). Zawartość związków fenolowych wynosiła [mg/100 ml]: kwas neochlorogenowy 49,21; kwas chlorogenowy 45,50; (-)epikatechina 1,48; pochodne kw. p-kumarynowego 0,4; polimerowe procyjanidyny 293,38; 3-rutynozyd kwercetyny 1,68; 3-galaktozyd kwercetyny 2,83; 3-glukozyd kwercetyny 2,25; 3-wicjanozyd kwercetyny 1,15; 3-robinobiozyd kwercetyny 1,17; 3,7-diglukuronid eriodykcjolu 7,86; 3-galaktozyd cyjanidyny 12,49; 3-arabinozyd cyjanidyny 0,71; 3-glukozyd cyjanidyny 5,12; 3-ksylozyd cyjanidyny 0,59; cyjanidyna 0,22.

Produkty będące przedmiotem badań poddawano procesowi trawienia *in vitro* w modelowym przewodzie pokarmowym. Trawienie przeprowadzono dwuetapowo: 1) odtwarzając warunki panujące w żołądku (obniżenie pH do 2,0, dodanie pepsyny 30 000 U/100 ml, inkubacja przez 2 h); 2) imitując środowisko jelita cienkiego (podwyższenie pH do 6,0, dodanie ekstraktu trzustkowo-jelitowego oraz soli żółciowych, regulacja pH do 7,4 i wprowadzenie mikroflory jelitowej wyizolowanej z kału ludzkiego w ilości  $10^6$  jkt/ml treści pokarmowej, inkubacja przez 2 h). Następnie strawiony *in vitro* produkt sterylizowano przez filtrację i wprowadzano do 21-dniowej hodowli komórek Caco-2 imitującej strukturalnie i funkcjonalnie ludzki nabłonek jelitowy. Kultura Caco-2 była hodowana na półprzepuszczalnych membranach poliwęglanowych o porowatości  $0,4 \mu\text{m}$  i powierzchni  $4,2 \text{ cm}^2$  (Millipore). Transport soku z aronii i buraka ćwikłowego przez kulturę nabłonka jelitowego prowadzono w kierunku od kompartmentu apikalnego (donnorowego) do bazolateralnego (akceptorowego). Płyn apikalny stanowił strawiony produkt, natomiast akceptorowy kompletna pożywka do hodowli granulocytów obojętnochłonnych, w objętości 2 ml każdy. Transport prowadzono w temp.  $37^\circ\text{C}$  przez 3 h, zachowując ciągłe mieszanie. Płyn akceptorowy zbierano i wykorzystywano do badań cytotoksycznej i przeciwutleniającej aktywności związków zawartych w soku z aronii i buraka przenikających przez ludzki nabłonek jelitowy *in vitro*.

Pomiary chemiluminescencji wykonywano przy użyciu chemiluminometru LKB 1250, mierząc wzmocnioną luminolem intensywność świecenia stymulowanych estra-

mi forbolu (PMA) granulocytów [1]. Każde badanie poprzedzone było 30-minutową inkubacją PMN z odpowiednim stężeniem badanego preparatu. Próba kontrolna zawierała PBS. Próby w końcowym stężeniu 1 ml zawierały: luminol (10  $\mu\text{M}$ ), zawiesinę granulocytów ( $1 \times 10^6$ ) i PMA (1  $\mu\text{M}$ ). Wartości impulsów odczytywano w odstępach jednonminutowych w ciągu 20 min. Wyniki wyrażano w impulsach maksymalnej chemiluminescencji [mV].

Cytometryczny pomiar stężenia nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Jako substratu fluorescencyjnego użyto diocjanu 2',7'-dichlorofluorescyny (DCFH-DA). Trwały niefluoryzujący związek, DCFH-DA przenikając do komórki stymulowanej PMA hydrolizuje do niefluoryzującej 2',7'-dichlorofluorescyny (DCFH). Wewnątrz komórki, w obecności nadtlenu wodoru, DCFH ulega przekształceniu do 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF), emitującej zieloną fluorescencję. Próbkę heparynizowanej krwi (50  $\mu\text{l}$ ), poddawano działaniu badanych preparatów przez 30 min w temp. 37°C. Następnie po dodaniu 15  $\mu\text{l}$  0,3 mmol DCFH-DA inkubowano 30 min i stymulowano PMA (1  $\mu\text{M}$ ) przez 10 min, temp. 37°C. Krwinki czerwone usuwano przez dodanie 1 ml płynu lizującego. Pomiaru fluorescencji DCF dokonano używając cytometru przepływowego Cyturon Absolute (Ortho, USA), w zakresie 515-548 nm widma światła, stosując linearne wzmocnienie sygnału. Jako miary intensywności fluorescencji wybranych populacji komórkowych używano wartości tzw. „średniego kanału”, wyliczonego przez program ImmunoCount 2 [3].

Hodowla komórek – wyizolowane komórki ( $2 \times 10^6$  PMN) zawieszano w medium hodowlanym RPMI 1640 o składzie: 10% surowicy cielęcej, 2 mM L-glutaminy, 100 j./ml penicyliny i 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycyny oraz 5 mM HEPES (bufor kwasu n-2-hydroksyetylopiperazyno-N'-2-etanosulfonowego) i umieszczano w płytkach do hodowli komórkowej o średnicy 40 mm. Po dodaniu badanych preparatów, komórki stymulowano estrami forbolu (200 nM PMA). Wszystkie próby inkubowano w temp. 37°C w atmosferze wilgotnego powietrza z dodatkiem 5%  $\text{CO}_2$ . Po 2 lub 24 h usuwano medium hodowlane i dodawano 1% roztwór trypsyny. Następnie po ok. 60 s usuwano trypsynę i zawieszano komórki w 2 ml PBS [8].

Aktywność kaspazy-3 oznaczano metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu Caspase-3 Assay Kit (prod. BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA). Kaspaza 3 działa na syntetyczny substrat N-acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metylokumaryna (Ac-DEVD-AMC), uwalniając fluoryzujący barwnik AMC (7-amino-4-metylokumaryna) [21]. Neutrofile ( $2 \times 10^6$ ), po upływie 2 i 24 h od momentu zapoczątkowania apoptozy, lizowano 30 min w lodzie, przez dodanie 500  $\mu\text{l}$  buforu lizującego (10 mM Tris-HCl; 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$  (pH 7,5); 130 mM NaCl; 1% Triton®-X-100; 10 mM NaPPi). Supernatant (zawierający około 100  $\mu\text{g}$  białka) dodawano do 1000  $\mu\text{l}$  HEPESu (20 mM HEPES pH 7,5; 10% glicerol; 2 mM DTT) i 20  $\mu\text{M}$  Ac-DEVD-AMC. Po 1 h inkubacji w temp. 37°C dokonywano pomiarów fluorescencji

AMC w spektrofotometrycznym Hitachi F-2500 (długość fali wzbudzenia 380 nm, długość fali emisji 430-460 nm) [21].

Do oceny cytotoksyczności badanych preparatów wykorzystano Cell Proliferation Kit I (MTT) (prod. Roche Diagnostics GmbH, Niemcy). Zasada metody polega na redukcji soli tetrazoliowych bromku-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT) pod wpływem dehydrogenaz mitochondrialnych obecnych w żywych, nieszkodzonych i z prawidłowym metabolizmem komórkach [5]. Do szeregu studzienek na płycie 96-dołkowej wprowadzono zawiesinę komórek ( $1 \times 10^6$  PMN), które poddano działaniu badanych preparatów przez 2 h w temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie komórki potraktowano roztworem MTT (stężenie końcowe 0,5 mg/ml), a po 4-godzinnej inkubacji solubilizowano przez noc. Wartość absorbancji prób odczytywano na czytniku mikroplitek przy dwóch długościach fali: 570 i 690 nm. Przeżywalność komórek wyrażano w stosunku do komórek niepoddanych działaniu badanych preparatów.

Różnice między wartościami średnimi uzyskanymi w grupie kontrolnej i grupach badanych po zastosowaniu badanego preparatu oceniono analizą wariancji (ANOVA) testem t-Studenta-Newman-Keuls. Za istotne przyjęto wartości przy prawdopodobieństwie  $p < 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Potencjalnie toksyczne działanie badanych preparatów na komórki oceniano *in vitro* poprzez pomiar aktywności mitochondrialnych dehydrogenaz z zastosowaniem testu MTT. Po 2-godzinnej ekspozycji nie stwierdzono toksycznego działania soku z buraka ćwikłowego i aronii w stężeniach 1-50% (v/v), jak i produktów poddanych uprzednio trawieniu w tzw. sztucznym przewodzie pokarmowym. Odsetek żywych komórek oszacowano na 85-87,5% (tab. 1).

Wybuch tlenowy neutrofilów można mierzyć poprzez pomiar chemiluminescencji. Wprowadzony do zawiesiny komórek *in vitro* luminol, ulegając utlenieniu przez reaktywne formy tlenu, produkty wybuchu tlenowego, emituje fotony, których ilość jest proporcjonalna do stężenia utleniaczy generowanych w badanym układzie [1]. Jak obserwowano, zarówno sok z buraka, jak i aronii, wykazywały silne właściwości hamowania intensywności chemiluminescencji (rys. 1). Stopień gaszenia chemiluminescencji zależał od stężenia badanego preparatu. Jednak silniejszym inhibitorem chemiluminescencji generowanej przez neutrofile był sok z aronii. IC<sub>50</sub> soku z aronii wyniosło:  $1,06 \pm 0,03\%$ ; a soku z buraka ćwikłowego  $1,88 \pm 0,27\%$ .

W kolejnym etapie oceniano produkcję nadtlenu wodoru przez stymulowane fagocyty (rys. 2). Nadtlenek wodoru generowany jest *in vivo* przez dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego, na drodze nienzymatycznej i w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest również bezpośrednio produkowany przez liczne

enzymy oksydacyjne, np. oksydazy monoaminowe i w procesie  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych w peroksysomach [12]. Generowany  $H_2O_2$  przez aktywowane fagocyty wpływa na proces zapalny, np. zwiększając ekspresję cząstek adhezyjnych, kontrolując proliferację komórek lub ich apoptozę i modulując agregację krwinek płytkowych. Chociaż uważa się, że  $H_2O_2$  w stężeniu od 20-50  $\mu M$  ma ograniczoną toksyczność wobec wielu rodzajów komórek, pojawia się wiele publikacji opisujących  $H_2O_2$  jako cząsteczkę przekazującą sygnały wewnątrz- i międzykomórkowo [12].

Tabela 1

Ocena cytotoxyczności soku z buraka ćwikłowego i aronii na granulocyty obojętnochłonne z zastosowaniem testu MTT.

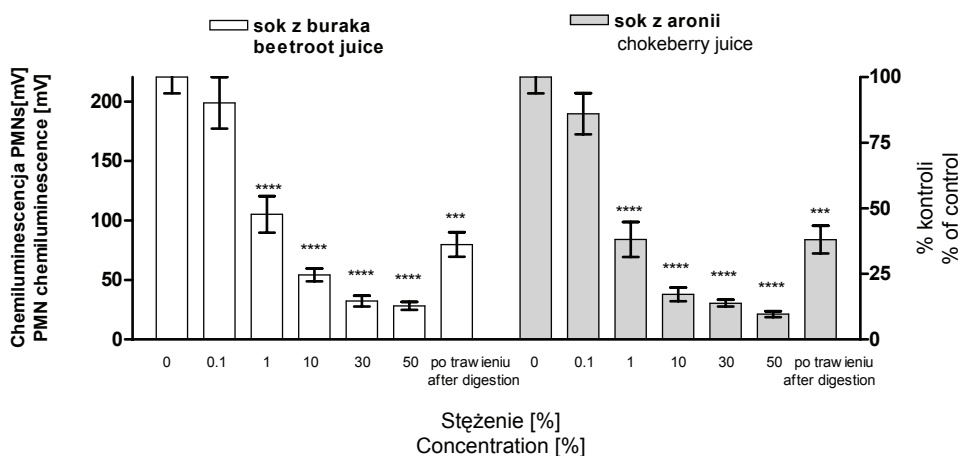
Cytotoxicity of beetroot and chokeberry juice measured by the MTT incorporation to polymorphonuclear neutrophils.

Stężenie Concentration [% (v/v)]	Przeżywalność komórek [% kontroli] Cells viability [% of control]	
	sok z buraka beetroot juice	sok z aronii aronia juice
10	106,3 ± 2,6	109,2 ± 7,6
30	93,1 ± 7,0	94,2 ± 4,6
50	84,7 ± 2,8	87,5 ± 4,4
100	60,3 ± 5,9	62,3 ± 4,3
po trawieniu w sztucznym przewodzie pokarmowym after digestion in artificial food canal	91,7 ± 4,9	91,9 ± 3,0

\*Wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne ± SE z 3 niezależnych eksperymentów. Każde badanie wykonano 2-krotnie. Wynik powyżej 90% komórek żywych uznano za nieefektywne działanie soku z buraka i aronii, 80-90% jako toksyczne w niewielkim stopniu i wynik poniżej 80% komórek żywych uznano jako efekt cytotoxyczny.

\*Results are expressed as mean values ± SD of three independent experiments. All experiment was performed in duplicate. More than 90% viable cells were considered to be unaffected by the beetroot or chokeberry juice, 80-90% as modestly affected, and values of less than 80% viable cells were ascribed to cytotoxic effect of the compounds.

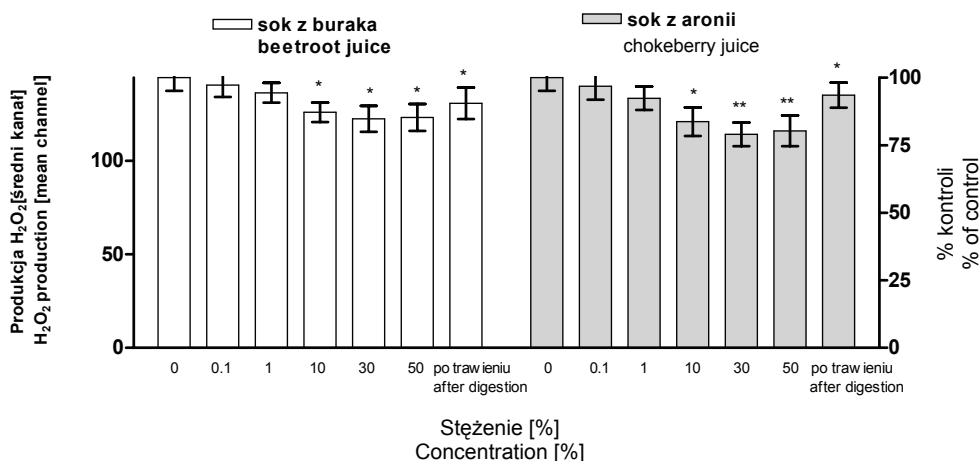
Z przedstawionych powyżej wyników należy sądzić, że badane preparaty w stężeniach 10-50% (v/v), jak i poddane trawieniu jelitowemu, skutecznie hamowały produkcję nadtlenu wodoru przez aktywne neutrofile w testach *in vitro* (rys. 2). Obniżenie stężenia ROS po zastosowaniu soku z buraka i aronii może być związane z hamującym działaniem związków polifenolowych i pigmentów roślinnych [17, 26].



Rys. 1. Wyniki pomiarów chemiluminescencji odzwierciedlającej wybuch oddechowy neutrofilów krwi żylnych stymulowanych PMA. PMN poddano działaniu soku z buraka ćwikłowego i aronii. Wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne z uwzględnieniem odchylenia standardowego średniej z 3-9 niezależnych eksperymentów. Istotność różnic statystycznych w odniesieniu do próby kontrolnej testowano na poziomie : \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Fig. 1. The results of chemiluminescence of the oxidative burst of peripheral blood neutrophils in response to PMA. PMN were treated with beetroot and chokeberry juice. Values are means of 3-9 experiments  $\pm$  SE. Differences statistically significant between control and treated cells: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Burak ćwikłowy (*Beta vulgaris var. rubra*) jest źródłem związków fenolowych i pigmentów np. betaniny, izobetaniny oraz vulgaksantyn I i II [17, 22] Betalainy (betacyjaniny i betaksantyny, czwartorzędowe amoniowe sole aminokwasów) [27], główne barwniki korzenia buraka ćwikłowego, wykazują silne działanie antyrodnikowe, co zostało zmierzone na podstawie redukcji trwałego kationorodnika kwasu 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS+). Antyrodnikowa aktywność betacyjanin była wyższa niż aktywność betaksantyn [6]. W podobnym modelu doświadczalnym stwierdzono wysoką aktywność przeciwutleniającą handlowego koncentratu z buraka ćwikłowego [2]. Wyniki badań sugerują, że betaina zawarta w wyciągu z buraka ćwikłowego może być cennym związkiem chemoprewencyjnym [14, 27]. W badaniach *in vitro* wykazano wyższą aktywność ekstraktu z korzenia buraka ćwikłowego w porównaniu z krótką i długą czerwoną papryką (karotenoidy), skórką czerwonej cebuli i żurawiną (antocyjany) oraz pieprzem tureckim (kapsantyna) [14].

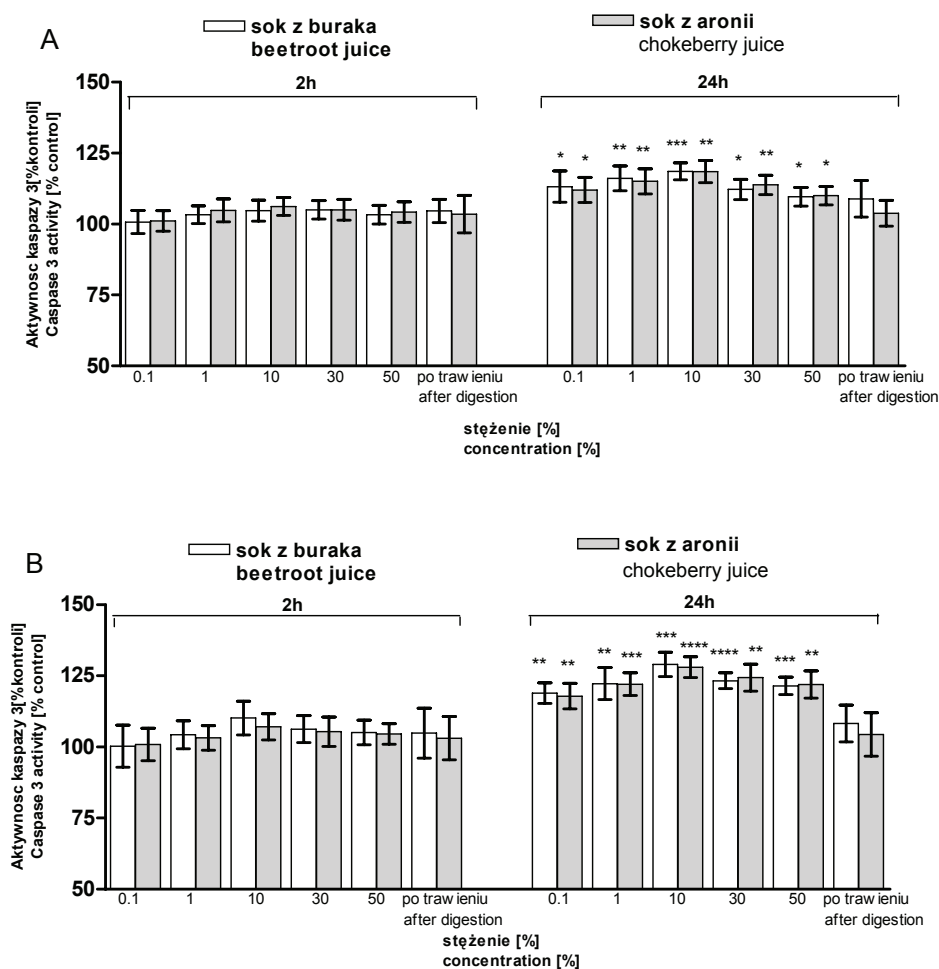


Rys. 2. Produkcja nadtlenu wodoru przez ludzkie PMN pod wpływem soku z buraka ćwikłowego i aronii. Wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne z uwzględnieniem odchylenia standardowego średniej z 3-9 niezależnych eksperymentów. Istotność różnic statystycznych w odniesieniu do próby kontrolnej testowano na poziomie: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Fig. 2. Hydrogen peroxide production in human PMN treated with beetroot and chokeberry juice. Mean values of 3-9 experiments  $\pm$  SE. Differences statistically significant between control and treated cells at level: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Owoce aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa*) są jednym z najbogatszych źródeł polifenoli tj ok. 10-20 g/kg [24, 28]. Z uwagi na zawartość antocyjanów i katechin, aronia łączy w sobie zalety czerwonego wina i zielonej herbaty [28]. Antocyjany, występujące w skórce owoców rozpuszczalne w wodzie pigmenty roślinne, stanowią 24% całkowitej masy polifenoli zawartych w aronii (300-630 mg/100 g) [28]. Ze względu na obecność grup OH w pierścieniu, antocyjany mają właściwości chelatujące jony metali i silną aktywność przeciwutleniającą [29]. Glikozydy cyjanidyny (antocyjany) wchłaniają się z przewodu pokarmowego do krwi w postaci niezmienionej tzn. w postaci glikozydów, a nie aglikonów. W proces ten są najprawdopodobniej zaangażowane transportery glukozy [28]. W surowicy krwi cyjanidyna (aglikon) rozpada się do kwasu protokatechowego charakteryzującego się właściwościami antykancerogennymi [10], natomiast cyjanidyno-3-glukozyd występuje w stanie wolnym, a nie w postaci glukuronianów czy siarczanów, co zwiększa jego właściwości przeciwutleniające [10]. Owoce aronii stanowią również bogate źródło niehydrolizujących pochodnych epikatechiny zwanych procyanidynami. To właśnie ich obecność nadaje aronii cierpki smak. Liczne grupy OH obecne w cząsteczce procyanidyny wykazują wielokrotnie większą aktywność przeciwutleniającą niż witamina E i C. Ponadto przypisuje się im działanie przeciwzapalne, antyhepatotoksyczne, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe i antybakteryjne [28]. Działanie przeciwzapalne ekstraktu z aronii dowiedziono





Rys. 3. Oddziaływanie soku z buraka i aronii na aktywność kaspazy 3 niestymulowanych (A) i stymulowanych PMN (B).

Wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SE (n=3-7). Istotność różnic statystycznych w odniesieniu do próby kontrolnej testowano na poziomie: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Fig. 3. Effect of beetroot and chokeberry juice on caspase 3 activity in nonstimulated (A) and stimulated PMN (B). Mean values  $\pm$  SE (n=3-7). Significantly different from the untreated control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

w badaniach *in vitro* z użyciem mysich makrofagów RAW 264.7 oraz *in vivo* w modelu indukowanego endotoksyną zapalenia błony naczyniowej oka u szczura. Mechanizm tego działania polegał na blokowaniu ekspresji indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) i cyklooksygenazy 2 (COX2), co hamowało produkcję NO, PGE<sub>2</sub> i TNF $\alpha$ .

Okazało się również, że kompleksy związków polifenolowych zawarte w ekstrakcie z aronii wywierają wielokrotnie silniejszy efekt przeciwzapalny niż czyste związki, takie jak antocyjaniny czy kwercetyna [23]. Badania innych autorów potwierdziły antyoksydacyjne i antymutagenne działanie preparatów z aronii [11, 15, 16].

Apoptoza, obok nekrozy, jest jednym z możliwych sposobów śmierci komórki. Apoptoza odgrywa istotną rolę w zachowaniu wewnętrznej równowagi organizmu, m.in. dzięki usunięciu z organizmu komórek potencjalnie niebezpiecznych (np. limfocytów autoreaktywnych bądź komórek nowotworowych) To apoptoza umożliwia zakończenie odpowiedzi immunologicznej po eliminacji egzogenego czynnika patologicznego [19]. Zatem perspektywa panowania nad tym mechanizmem jest głównym powodem ogromnego zainteresowania badaczy tą formą śmierci komórki w wielu dziedzinach biologii.

Do oceny apoptozy neutrofilii zastosowano metodę polegającą na bezpośrednim oznaczeniu aktywności kaspazy 3, enzymu hydrolizującego wiązania peptydowe tworzone przez grupę karboksylową reszty asparaginowej. Enzymom tym przypisuje się kluczowe znaczenie dla przebiegu efektorowej, nieodwracalnej fazy apoptozy [19]. Z badań własnych wynika, że preparaty z buraka i aronii w stężeniu 0,1-50% v/v po 24-godzinnej hodowli indukują spontaniczną apoptozę neutrofilii i stymulowaną estrem forbolu ( $p < 0,05$ ) (rys. 3). Natomiast aktywność kaspazy 3 w 2-godzinnej hodowli PMN w obecności soku z buraka i aronii nie różniła się znamienne od wartości notowanych w próbie kontrolnej ( $p > 0,05$ ), podobnie w kulturach komórkowych do których wprowadzono produkty poddane uprzednio trawieniu w tzw. sztucznym przewodzie pokarmowym.

Ostatnie dane sugerują, że niektóre związki polifenolowe mogą obniżać aktywność czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i AP-1 [13, 20]. Pod kontrolą tych kompleksów białkowych znajduje się wiele genów uczestniczących w regulacji proliferacji i apoptozy, a zaburzenia w ich szlakach mogą prowadzić do nowotworzenia [20]. Wydaje się, że hamujący wpływ polifenoli na ww. czynniki transkrypcyjne może być skutkiem ich właściwości przeciwutleniających, gdyż reaktywne formy tlenu mogą aktywować zarówno NF- $\kappa$ B, jak i AP-1. Nie jest to jednak jedyny mechanizm [18, 20]. Antyproliferacyjne i proapoptotyczne działanie polifenoli tłumaczy się hamowaniem przez nie kinaz odgrywających rolę w przekazywaniu sygnału od błony komórkowej do cytoplazmy i do jądra oraz w regulacji cyklu komórkowego. Godny podkreślenia jest fakt, że niejednokrotnie obserwowano silniejsze działanie flawonoidów na komórki nowotworowe niż na odpowiadające im komórki nienowotworowe [20].

Granulocyty obojętnochłonne, które nie uległy apoptozie obumierają poprzez rozpad, co skutkuje uszkodzeniem tkanek gospodarza i nasileniem procesu zapalnego. Poznanie mechanizmów kontrolujących apoptozę PMN może prowadzić do rozwoju nowych sposobów leczenia tych stanów patologicznych. Najprawdopodobniej chemio-

profilaktyczne, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwnowotworowe i inne efekty działania polifenoli mogą oddziaływać na proces eliminacji komórek.

### Wnioski

1. Sok z buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris var. rubra*) i aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa Elliot*) wykazują silne właściwości przeciwutleniające. Dane takie mogą stanowić jedno z kryteriów kwalifikujących te składniki żywności jako zalecane w chemoprolaktyce chorób nowotworowych.
2. Badane związki, poprzez modulację aktywności kaspazy 3 aktywnych neutrofilów, mogą współdziałać z fizjologicznym mechanizmem regulującym proces apoptozy.

### Literatura

- [1] Allen R.C.: Phagocytic leucocyte oxygenation activities and chemiluminescence kinetic approach to analysis, *Methods Enzymol.*, 1983, **133**, 449-93.
- [2] Bartoszek A., Forc A., Grzkowiak J.: Antioxidative properties of some vegetable products traditional for diets in central Europe – short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2002, **11/52**, 67-70.
- [3] Bass, A.D., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szeja, P., Seeds, M.C., Thomas, M.: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.*, 1983, **130**, 1910-1917.
- [4] Cotelle N.: Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2001, **1**, 569-590.
- [5] Denizot F., Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*, 1986, **89**, 271-277.
- [6] Ecribano J., Pederño M.A., Garcia-Carmona F., Muñoz R.: Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochem. Anal.*, 1998, **9**, 124-127.
- [7] Edwards S.W.: The respiratory burst: The generation of reactive oxygen metabolites and their role in bacterial killing. In: *Biochemistry and physiology of neutrophil*. Edwards S.W. [Ed.], Cambridge University Press, 1994, **5**, 149-158.
- [8] Fadeel B., Ahlin A., Henter J.I., Orrenius S., Hampton M.B.: Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood*, 1998, **92**, 4808-4818.
- [9] Ferrante H., Thong Y.H.: A rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood using a modification of the Hypaque-Ficoll technique. *J. Immunol. Methods*, 1978, **24**, 389-393.
- [10] Galvano F., La Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Battisini N., Tavazzi B., Galvano G.: Cyanidins: metabolism and biological properties. *J. Natl. Biochem.*, 2004, **15**, 2-11.
- [11] Gąsiorowski K., Tabaka H., Oszmiański J.: Different actions of anthocyanins on free radical pathways in human granulocytes and lymphocytes *in vitro*. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, 2004.
- [12] Halliwell B., Clement MV., Long LH.: Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.*, 2000, **486**, 10-13.
- [13] Jeong W.S., Kim I.W., Hu R.: Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappa B signaling pathway. *Pharm. Res.*, 2004, **21**, 661-670.
- [14] Kapadia G.J., Tokuda H., Konoshima T., Nishino H.: Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Lett.*, 1996, **100**, 211-214.

- [15] Kobylińska J., Wasek M., Wawer I.: Badania preparatów antocyjanowych z owoców aronii (*Aronia melanocarpa* Elliot). *Far. Pol.*, 2001, **57**, 752-753.
- [16] Kowalczyk E., Krzesiński P., Kura M., Szmigielski J., Błaszczak J.: Anthocyanins in medicine. *Pol. J. Pharmacol.*, 2003, **55**, 699-702.
- [17] Kujal T.S., Vienola M.S., Klika K.D., Loponen J.M., Pihlaja K.: Betalain and phenolics compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **215**, 505-510.
- [18] Leone M., Zhai D., Sareth S., Kitada S., Reed J.C., Pellicchia M.: Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res.*, 2003, **63**, 8118.
- [19] Maianski N.A., Maianski A.N., Kuijpers T.W., Roos D.: Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol.*, 2004, **111**, 56-66.
- [20] Malińska D., Kiersztan A.: Flawonoidy - charakterystyka i znaczenie w terapii. *Post. Biochem.*, 2004, **50**, 182-196.
- [21] Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995, **376**, 37-43.
- [22] Nilson N.: Studies into pigments in beetroot. *Lantbrukshogskolans Annaler*, 1970, **36**, 179-219.
- [23] Ohgami K., Ilieva I., Shiratori K., Koyama Y., Jin X-H., Yoshida K., Kase S., Kitaichi N., Suzuki Y., Tanaka T., Ohno S.: Anti-inflammatory effects of Aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Invest. Oph. Vis. Sci.*, 2005, **46**, 275-281.
- [24] Oszmiański J., Wojdyło A.: Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.*, 2005, **1**, 1-5.
- [25] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231-1237.
- [26] Slimestad R., Torskangerpoll K., Nateland H., Johannessen T., Giske N.H.: Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J. Food Compos. Anal.*, 2005, **18**, 61-68.
- [27] Strack D., Vogt T., Schlieman W.: Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 2003, **62**, 247-269.
- [28] Wawer I.(red.): Aronia polski paradoks. Wyd. Agropharm, Tuszyn 2005.
- [29] Wawer I.: Antocyjanidyny – struktura i działanie antyoksydacyjne. *Farm. Pol.*, 2001, **57**, 728-731.

#### THE INFLUENCE OF BEETROOT AND CHOKEBERRY JUICE ON OXYGEN METABOLISM AND APOPTOSIS OF POLYMORPHONUCLEAR GRANULOCYTES *IN VITRO*

##### S u m m a r y

Activated polymorphonuclear neutrophils (PMN) generate extremely high amounts of reactive oxygen species (ROS), but these are normally targeted at pathogens inside intracellular phagosomes. These same beneficial antimicrobial functions can cause significant local tissue injury and lead to the development of pathologic systemic inflammatory conditions. PMN apoptosis is a major mechanism associated with the resolution of inflammatory reactions. Caspase 3 activation is the first step in the execution phase of apoptosis.

The goals of the present study was to investigate the in vitro effect of beetroot (*Beta vulgaris* var. *rubra*) and chokeberry (*Aronia melanocarpa* Elliot) juice on oxidative metabolism and apoptosis in human polymorphonuclear granulocytes. PMN oxidant production, in response to phorbol myristate acetate, was characterized by a dichlorofluorescein oxidation assay and luminol-dependent chemiluminescence. Caspase 3 activation was assayed by the method of DEVD-AMC cleavage in PMN cultured up to 24 hours.

The results of our study showed: 1/ beetroot and chokeberry juice affected the concentration-dependent inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and chemiluminescence response by PMN, 2/ we also observed their pro-apoptotic effects.

These natural products could be an important adjunct in cancer chemoprevention.

**Key words:** beetroot, chokeberry, antioxidants, respiratory burst, apoptosis, polymorphonuclear neutrophils ☒