

*Tomasz Gębarowski, Helena Moreira, Anna Szyjka, Jan Oszmiański<sup>1)</sup>,  
Kazimierz Gąsiorowski*

## AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA SOKU I POLIFENOLI Z JAGÓD ARONII W HODOWLACH KOMÓREK LINII V79

Katedra i Zakład Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. *K. Gąsiorowski*

<sup>1)</sup> Katedra Technologii Warzyw i Owoców Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. *Jan Oszmiański*

*Inkubacja komórek linii V79 z preparatami z jagód aronii czarnoowocowej ujawniła silne działanie antyoksydacyjne badanych preparatów w hodowlach komórek eksponowanych następnie na stres oksydacyjny. Działanie antyoksydacyjne było najsilniejsze w przypadku soku z jagód aronii (AJ). Natomiast preparat AN (mieszanina czterech cyjanidyn – antocyjanów izolowanych z jagód aronii) ujawnił korzystny profil działania antygenotoksycznego – obniżenie liczebności pęknięć nici DNA przy niewielkim wpływie na częstość apoptozy w hodowlach.*

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, sok i ekstrakt polifenoli z jagód aronii, efekty antyoksydacyjne.

Key words: oxidative stress, juice and polyphenolic extract from aronia fruits, anti-oxidative effects.

Dieta bogata w przeciwutleniacze odgrywa ważną rolę w profilaktyce chorób związanych ze stresem oksydacyjnym. Jagody aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* Elliot) zawierają znaczną ilość związków polifenolowych i spośród owoców/jagód okazują szczególnie wysoką aktywność antyoksydacyjną (1-3). Wcześniejsze badania własne pokazały, że mieszanina czterech antocyjanów izolowanych z jagód aronii wywierała działanie antymutagenne i antygenotoksyczne (4, 5). Celem niniejszej pracy było porównanie aktywności antyoksydacyjnej soku z jagód aronii (AJ), ekstraktu polifenoli (PF) i mieszaniny czterech cyjanidyn – antocyjanów (AN) izolowanych z owoców aronii czarnoowocowej. Kontrolę pozytywną stanowiły wzorcowe związki antyoksydacyjne: troloks i kwas askorbinowy, zastosowane w takich samych stężeniach jak badane preparaty z jagód aronii. Aktywność antyoksydacyjną badanych preparatów oceniano w hodowlach komórek linii V79 (fibroblasty płucne chomika chińskiego). Komórki V79 w odróżnieniu od ludzkich limfocytów, nie okazywały wzrostu aktywności oksydazy hemowej w kolejnych ekspozycjach hodowli na tlen hiperbaryczny (stres oksydacyjny) lub powtarzane inkubacje z nadtlakiem wodoru (HP) natomiast ujawniały znacząco więcej niż ludzkie limfocyty oksydacyjnych uszkodzeń DNA w teście kometkowym (6).

## MATERIAŁ I METODY

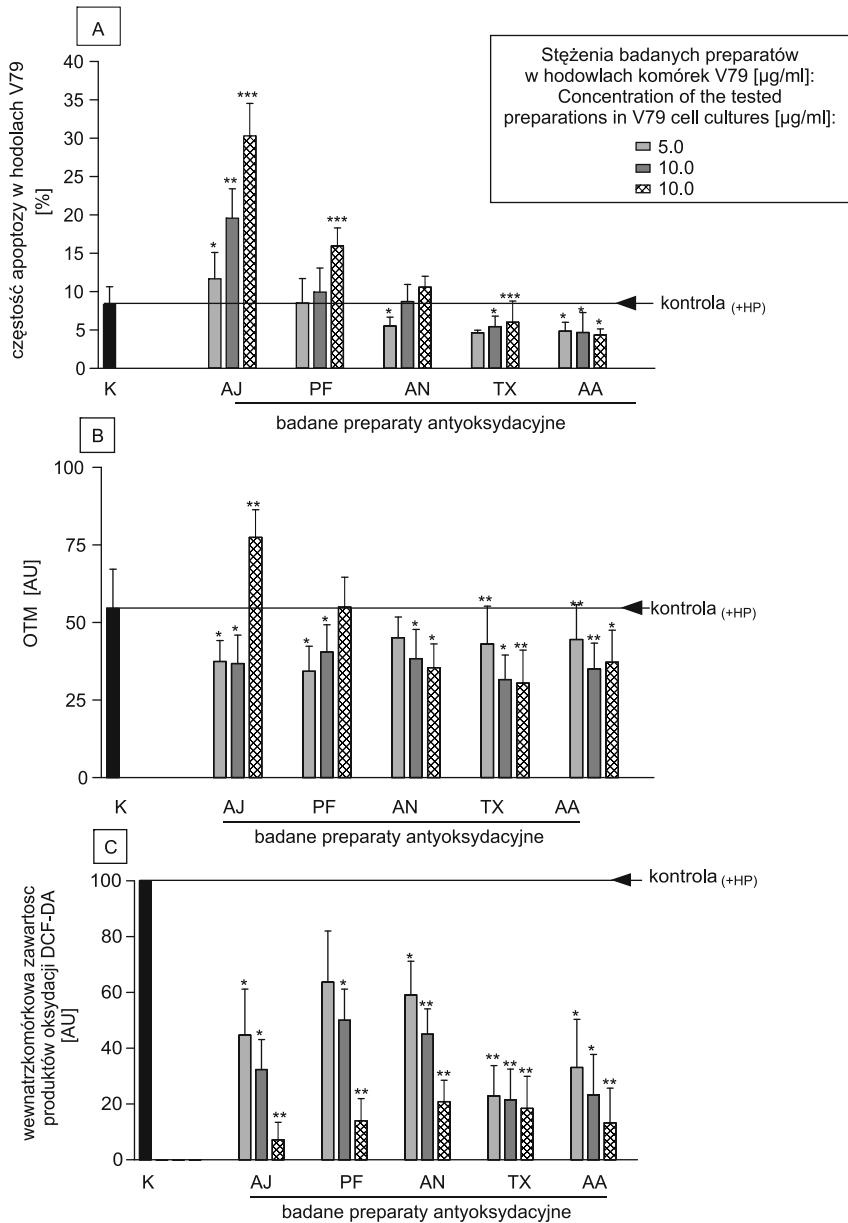
Badane preparaty z jagód aronii: sok (AJ), suchy ekstrakt polifenoli (PF) i oczyszczoną mieszaninę czterech cyjanidyn – antocyjanów (AN) otrzymano z Katedry Technologii Warzyw i Owoców Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Komórki V79 były hodowane w CO<sub>2</sub> –inkubatorze w temp. 37°C (pożywka hodowlana: MEM Eagle'a z 25mM HEPES, z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, 2mM L-glutaminy oraz antybiotyków). Komórki były inkubowane przez 60 min z badanymi preparatami aronii (zakres stężeń: 2.5-50.0µg/ml w przeliczeniu na suchą masę polifenoli). Następnie hodowle płukano, zawieszano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) i poddawano działaniu stresu oksydacyjnego z użyciem nadtlenu wodoru (HP 200µM, 20 min w 4°C). Wewnątrzkomórkową zawartość wolnych rodników oceniano w miokrospektrofluorymtrze ( $\lambda_{ex} = 480\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 535\text{nm}$ ) w teście utleniania diocjanu dichlorofluoresceiny (7). Częstość apoptozy w hodowlach oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym po barwieniu zawiesiny komórek mieszaniną fluorochromów: aneksyna V-FITC/jodek propidyny (Apoptosis detection Kit; Sigma, USA). Zliczano odsetek komórek emitujących zieloną fluorescencję (wczesna apoptoza) oraz komórek przepuszczalnych dla jodku propidyny – czerwona fluorescencja jądra, wraz z zieloną fluorescencją powierzchni komórki (późna apoptoza).

Ocena pęknięć jednoniciowych DNA w komórkach V79 przeprowadzona była w teście elektroforezy pojedynczych komórek w warunkach alkalicznych (test kometkowy), zgodnie z metodyką podaną w piśmiennictwie (8, 9) z własnymi modyfikacjami (10). Analizę preparatów z pięciu niezależnych eksperymentów przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon, Eclipse E-600, blok filtrowy UV1), kamery cyfrowej oraz programu komputerowego do akwizycji i analizy obrazu CometPlus (wersja 2.5). Oceniana była proporcja długości ogona i zawartości DNA w ogonie komet, tzw. moment ogonowy (OTM), w 100 losowo napotkanych kometkach w każdym preparacie mikroskopowym.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wpływ inkubacji hodowli V79 z badanymi preparatami z jagód aronii na poziom stresu oksydacyjnego komórek następowo eksponowanych na nadtlenek wodoru (HP 200 µM, 20 min, 4°C) analizowany był w pięciu testach; wyniki (średnia ± SD, n=5) przedstawione zostały w histogramach na rycinie 1.

Spośród badanych preparatów sok z jagód aronii znamienne statystycznie zwiększał częstość apoptozy w hodowlach uszkodzonych w stresie oksydacyjnym (1A); zależnie od stężenia w hodowli zmniejszał (w niskich stężeniach) lub zwiększał (w największym badanym stężeniu) liczebność pęknięć jednoniciowych DNA (1B) oraz wywierał silne działanie antyoksydacyjne – zmniejszał wewnątrzkomórkową zawartość produktów oksydacji DCF-DA o 55-95% w porównaniu do hodowli kontrolnych (1C). Wzrost liczby pęknięć jednoniciowych DNA w hodowlach komórek V79 w obecności najwyższego badanego stężenia AJ może być wynikiem znacznej aktywacji apoptozy komórek w tym stężeniu preparatu AJ. Preparat zawierający



Ryc. 1: Wpływ badanych preparatów na poziom stresu oksydacyjnego indukowanego nadtlenkiem wodoru [HP 200µM, 20 min, 40C] w hodowlach komórek V79 (średnia±SD; n=5). AJ – sok z jagód aronii, PF – ekstrakt polifenoli z soku, AN – oczyszczona mieszanina 4 antocyjanów z soku jagód aronii, TX – trolox, AA – kwas askorbinowy. Test t, sparowany (\*- p<0.05; \*\*- p<0.01; \*\*\*- p<0.001).

Fig. 1: Impact of the tested preparations on oxidative stress induced by hydrogen peroxide [HP 200µM, 20 min, 40C], in V79 cell cultures (mean±SD, n=5). AJ – juice from aronia fruits, PF – polyphenolic extract from the juice, AN – purified mixture of four anthocyanins from aronia juice, TX – trolox, AA – ascorbic acid. Paired t test (\*- p<0.05; \*\*- p<0.01; \*\*\*- p<0.001).

mieszaninę czterech cyjanidyn – antocyjanów izolowanych z soku z jagód aronii (AN) nie wpływał znamienne na wzrost częstości apoptozy w hodowlach uszkodzonych w stresie oksydacyjnym (1A); znacząco, zależnie od stężenia obniżał liczebność pęknięć jednoniciowych DNA (1B) i zmniejszał wewnątrzkomórkową zawartość produktów oksydacji DCF-DA o 40-70% w porównaniu do hodowli kontrolnych (1C). Preparat zawierający ekstrakt polifenoli z soku jagód aronii (PF) w trzech testach oceniających wpływ na poziom stresu oksydacyjnego okazywał siłę działania pośrednią pomiędzy działaniem AJ i AN.

Działanie antyoksydacyjne preparatów z jagód aronii i referencyjnych związków antyoksydacyjnych (troloks, kwas askorbinowy) było porównane do wyników uzyskanych w hodowlach kontrolnych (hodowle eksponowane na HP bez wcześniejszej inkubacji z badanymi preparatami) i wyrażone w postaci współczynnika aktywności antyoksydacyjnej w przeliczeniu na 1 µg badanych preparatów. Wyniki przedstawione zostały w tabeli I.

**Tabela I.** Wpływ badanych preparatów na zmniejszenie zawartości produktów oksydacji DCF-DA w komórkach V79 eksponowanych na stres oksydacyjny [HP 200 µM, 20 min, 4°C]. Wyniki zawarte w histogramach na Ryc. 1C porównane zostały do odpowiednich kontroli (hodowle V79 bez badanych preparatów eksponowane na HP) i wyrażone w proporcji na 1 µg badanych związków.

**Table I.** Influence of the tested preparations on lowering the contents of the DCF-DA oxidation products in V79 cells exposed to oxidative stress [HP 200 µM, 20 min, 4°C]. Results presented in histograms on Fig. 1C were compared to relative controls (V79 cells cultured without the tested preparations and exposed to HP) and then converted to concentration of 1 µg of the tested preparations.

AJ	PF	AN	TX	AA
0,42	0,24	0,19	0,32	0,33

Efekt antyoksydacyjny AJ był większy o 75% niż ekstraktu polifenoli (PF), ponad dwukrotnie większy niż preparatu AN, a także większy o ponad 30% od efektu referencyjnych antyoksydantów (troloks i AA).

Można przyjąć, że korzystny profil działania antyoksydacyjnego badanych preparatów powinien okazywać przewagę procesów naprawy uszkodzeń oksydacyjnych nad indukcją apoptozy. Do oceny takiego profilu antyoksydacyjnego preparatów z jagód aronii wyniki uzyskane w pięciu niezależnych eksperymentach zostały porównane do odpowiednich kontroli, a następnie wyrażone w postaci proporcji (obniżenie OTM, liczby uszkodzeń DNA / wzrost częstości apoptozy). Wyniki przedstawiono w tabeli II.

**Tabela II.** Ocena profilu aktywności antyoksydacyjnej badanych preparatów z jagód aronii – wpływ na zmniejszenie liczebności pęknięć jednoniciowych DNA (Ryc. 1B) w porównaniu do aktywacji apoptozy (Ryc. 1A).

**Table II.** Evaluation of antioxidative activity profile of the tested preparations from aronia fruits – impact on decrease of the DNA single strand breaks (Fig. 1B) compared to activation of apoptosis (Fig. 1A).

AJ	PF	AN	TX	AA
1,17	1,78	2,46	3,427	3,88

Z badanych preparatów jagód aronii najbardziej korzystny profil działania w warunkach stresu oksydacyjnego komórek okazywał preparat AN; proporcja naprawy uszkodzeń DNA do częstości apoptozy w hodowlach była w przypadku AN ponad

2-krotnie większa od wyliczonej dla soku z jagód aronii (AJ). W tym porównaniu zdecydowanie najsilniejszy wpływ nasilający naprawę uszkodzeń DNA i obniżający częstość apoptozy wykazywały referencyjne związki antyoksydacyjne (troloks, kwas askorbinowy). Wyliczone dla tych związków proporcje aktywacji naprawy uszkodzeń DNA do częstości apoptozy były o ponad 50% większe niż w przypadku preparatu AN i ponad trzykrotnie większe niż w przypadku soku z jagód aronii (AJ).

## WNIOSKI

1. Sok z jagód aronii czarnoowocowej (AJ) wywierał silniejsze działanie antyoksydacyjne w porównaniu do ekstraktu polifenoli (PF) i mieszaniny czterech cyjanidyn – antocyjanów (AN) izolowanych z owoców aronii.
2. Najsilniejszy efekt pro-apoptotyczny w hodowlach komórek poddanych działaniu stresu oksydacyjnego (inkubacja hodowli z nadtlaniem wodoru) okazywał preparat AJ, a w mniejszym stopniu, także preparat PF (w najwyższym badanym stężeniu). Preparat AN nie wpływał znamienne statystycznie na częstości apoptozy w hodowlach komórek.
3. Preparat AN okazywał korzystny profil działania antyoksydacyjnego: obniżał zawartość wewnątrzkomórkowych produktów oksydacji i wzmacniał naprawę uszkodzeń DNA przy niewielkim wpływie na częstość apoptozy.
4. Preparat AN może być stosowany w leczeniu ludzi narażonych na stres oksydacyjny.

T. Gębarowski, H. Moreira, A. Szyjka, J. Oszmiański, K. Gąsiorowski

### ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF NATURAL JUICE AND POLYPHENOLS FROM CHOCKBERRY FRUITS IN V79 CELL CULTURES

#### Summary

The influence of three preparations from chokeberry (*Aronia melanocarpa* Elliot) fruits on oxidative stress provided to Chinese hamster pulmonary fibroblasts (V79 cells) with incubation of cell cultures with hydrogen peroxide (HP) showed that all the tested preparations markedly decreased the intracellular contents of reactive oxygen species. The strongest effect was observed with the natural juice (AJ) and, to a lesser degree, with the polyphenolic extract from the juice (PF). The juice from aronia fruits (AJ) markedly increased the apoptotic cell number in the cultures damaged with HP. However, the purified extract of four cyanidins – anthocyanins from aronia fruits (AN), displayed a more favourable profile of antioxidative action: it lowered the number of DNA strand breaks, whereas it did not enhance the frequency of apoptotic cells. The AN preparation could be used in the treatment of oxidative stress in people.

## PIŚMIENNICTWO

1. Denev P.N., Kratchanov C.G., Ciz M., Lojek A., Kratchanova M.G.: Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols. A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 2012; 11 (5): 471-489. – 2. Slimestad R., Torskangerpoll K., Nateland H.S., Johannessen T., Giske N.H.: Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J. Food Compos. Anal.*, 2005; (18): 61-68. – 3.

Valcheva-Kuzmanova S., Gadjeva V., Ivanova D., Belcheva A.: Antioxidant activity of *Aronia melanocarpa* juice *in vitro*. Acta Aliment. Hung., 2007; 36 (4): 425-428. – 4. Gąsiorowski K., Szyba K., Brokos B., Kolaczyńska B., Jankowiak-Włodarczyk M., Oszmiański J.: Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. Cancer Lett. 1997; 119 (1): 37-46. – 5. Gąsiorowski K., Brokos B., Kozubek A., Oszmiański J.: The antimutagenic activity of two plant-derived compounds. A comparative cytogenetic study. Cell. Mol. Biol. Lett. 2000; 5 (2): 171-190. – 6. Rothfuss A., Radermacher P., Speit G.: Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment. Carcinogenesis, 2001; 22 (12): 1979-1985. – 7. Eruslanov E., Kusmartsev S.: Identification of ROS using oxidized DCF-DA and flow-cytometry. Methods Mol. Biol., 2010; 594: 57-72. – 8. Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F.: Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen., 2000; 35 (3): 206-221. – 9. Collins A.R.: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol., 2004; 26 (3): 249-261. – 10. Gąsiorowski K., Brokos B.: DNA repair of hydrogen peroxide-induced damage in human lymphocytes in the presence of four antimutagens, a study with alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). Cell. Mol. Biol. Lett., 2001; 6 (4): 897-911.

Adres: ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław