



SUROWCE POLIFENOLOWE

ZASTOSOWANIA I PERSPEKTYWY

Małgorzata Kalemba-Drożdż
Agata Grzywacz-Kisielewska
Agnieszka Cierniak

SUROWCE POLIFENOLOWE

ZASTOSOWANIA I PERSPEKTYWY

redakcja

Małgorzata Kalemba-Drożdż

Agata Grzywacz-Kisielewska

Agnieszka Cierniak

Kraków 2022

Rada Wydawnicza Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego:
Klemens Budzowski, Maria Kapiszewska, Zbigniew Maciąg, Jacek M. Majchrowski

Recenzja:

dr hab. Maja Grabacka, prof. Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

Projekt okładki: Małgorzata Kalemba-Drożdż; realizacja: Oleg Aleksejczuk

Redakcja i korekta:

Carmen Stachowicz

ISBN 978-83-66007-91-8

e-ISBN 978-83-66007-99-4

Copyright© by Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
Kraków 2022

Żadna część tej publikacji nie może być powielana ani magazynowana
w sposób umożliwiający ponowne wykorzystanie,
ani też rozpowszechniana w jakiegokolwiek formie
za pomocą środków elektronicznych, mechanicznych, kopiujących,
nagrywających i innych, bez uprzedniej pisemnej zgody właściciela praw autorskich

Na zlecenie:



Krakowskiej Akademii
im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
www.ka.edu.pl

Wydawca: Oficyna Wydawnicza KAAFM, Kraków 2022

Skład: Oleg Aleksejczuk

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów.....	7
Przedmowa.....	11
Preface	13
Rozdział 1.	
Aktywność biologiczna <i>in vitro</i> nanocząstek złota (Au@RD NPs) otrzymanych przy użyciu wodnego ekstraktu z róży damasceńskiej (<i>Rosa damascena</i>)	17
<i>Agnieszka Cierniak, Sylwia Łukasiewicz, Agnieszka Kyzioł</i>	
Rozdział 2.	
Receptura ziołowa LCS101 i jej rola w terapii antynowotworowej.....	41
<i>Sylwia Łukasiewicz, Marta Dziedzicka-Wasylewska, Agnieszka Cierniak, Zoya Cohen, Yair Maimon</i>	
Rozdział 3.	
Owoce, jadalne kwiaty i liście dzikich roślin – surowce polifenolowe działają jako skuteczne czynniki przeciwutleniające i genoprotekcyjne	51
<i>Małgorzata Kalemba-Drożdż, Agnieszka Cierniak, Inga Kwiecień</i>	
Rozdział 4.	
Kwasy fenolowe i flawonoidy w kiszonkach warzywnych	101
<i>Patryk Zdziobek, Grzegorz Jodłowski</i>	

Rozdział 5.

Przegląd właściwości naturalnych związków polifenolowych
zapewniających podwyższenie ochrony skóry
przed promieniowaniem UV 117

Artur Budzowski, Regina Gil

Rozdział 6.

Biologia, ekologia i możliwości uprawy mniej znanych
roślin bogatych w polifenole 143

Adam Kapler

Piśmiennictwo 161

Spis rycin i tabel..... 195

WYKAZ SKRÓTÓW

- ABTS+ – rodnik kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)
- Au@RD NPs – nanocząstki złota z zastosowaniem ekstraktu wodnego z róży damasceńskiej
- DCPIP – 2,6-dichlorofenolindofenol, odczynnik Tillmansa
- DMEM – pożywka hodowlana Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DPPH – 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EPIC – (ang. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) Europejskie Prospektywne Badanie Nowotworów i Żywienia
- EtBr – bromek etydyny
- FBBB – Fast Blue BB; N-(4-Amino-2,5-dietoksyfenilo)benzamid
- FBS – (ang. *fetal bovine serum*) wołowa surowica płodowa
- FDA – dwuocian fluoresceiny
- FRAP – (ang. *ferric reducing antioxidant power*) siła redukcyjna
- HCA – (ang. *heterocyclic aromatic amines*) aromatyczne aminy heterocykliczne
- HPLC – (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa
- IARC – (ang. International Agency for Research of Cancer) Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
- INCI – (ang. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) Międzynarodowe Nazewnictwo Składników Kosmetyków
- LMPA – (ang. *low melting point agarose*) agarozą o obniżonej temperaturze topnienia)
- MED – (ang. *minimum erythematol dose*) minimalna dawka rumieniowa
- MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu, test badania żywotności komórek za pomocą odczynnika MTT

- NMPA – (ang. *normal melting point agarose*) agarozą o normalnej temperaturze topnienia
- NPs – (ang. *nanoparticles*) nanocząstki metali
- NW – nie wykryto
- odch. st. – odchylenie standardowe
- PABA– kwas p-aminobenzoowy
- PBML – (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, czyli limfocyty i monocyty
- PhIP – 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo(4,5-b)pirydyna
- RFT – (ang. *reactive oxygen species*) reaktywne formy tlenu
- rpm – (ang. *revolutions per minute*) liczba obrotów na minutę
- RPMI – pożywka hodowlana Roswell Park Memorial Institute
- SCGE – (ang. *single cell gel electrophoresis*) elektroforeza pojedynczych komórek w żelu agarozowym, test kometowy
- SPF – (ang. *sun protection factor*) współczynnik ochrony przeciw-słonecznej
- TCM – (ang. *traditional Chinese medicine*) tradycyjna medycyna chińska
- TDC – (ang. *Tail DNA Content*) zawartość DNA w ogonie komety
- TPTZ – 2,4,6-Tris(2-pirydylo)-s-triazyna
- Tris, Trizma Base – 2-Amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
- UV – ultrafiolet
- WHO – (ang. *World Health Organisation*) Światowa Organizacja Zdrowia



Rycina 1. Róża pomarszczona (*Rosa rugosa*).
Fot. Małgorzata Kalemba-Drożdż

PRZEDMOWA

Polifenole są metabolitami wtórnymi roślin i grzybów. Powszechnie występują w kwiatach, korze, korzeniach, łodygach, liściach i owocach roślin. Ich strukturę chemiczną charakteryzuje obecność dwóch lub więcej grup –OH przyłączonych do pierścieni aromatycznych. Do polifenoli zaliczamy lignany, kurkuminoidy, taniny, stilbenoidy, kwasy fenolowe oraz flawonoidy. Ta ostatnia klasa obejmuje: flawony (np. apigenina), flawanony (np. naringenina), flawonole (np. kwercetyna), flawanole (np. katechiny), izoflawony (np. genisteina), antocyjanidyny (np. malwidyna), chalkony (np. buteina), aurony (np. aureozydyna) i ksantony (np. α -mangostyna). Do tej pory opisano ponad dziesięć tysięcy związków polifenolowych i wciąż nie poznano ich wszystkich. Właściwości polifenoli to temat intensywnie badany na całym świecie ze względu na możliwe wykorzystanie związków polifenolowych w medycynie, farmakologii, kosmetologii, rolnictwie, dietetyce i przemyśle.

Polifenole produkowane przez rośliny pełnią funkcje antybiotyków, fungicydów, herbicydów, chronią przed promieniowaniem ultrafioletowym, modulują działanie hormonów roślinnych, biorą udział w przywabianiu owadów, nadają tkankom roślin intensywną barwę. Również w organizmie człowieka mogą wykazywać bardzo szerokie spektrum właściwości. Związki polifenolowe działają jako przeciwutleniacze, zmiatacze wolnych rodników, związki chelatujące metale ciężkie, a także zwiększają aktywność enzymów detoksyfikacyjnych, wykazują działanie przeciwwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne oraz przeciwnowotworowe. To właśnie polifenolom warzywa, owoce i zioła zawdzięczają swoje prozdrowotne właściwości, choć jest to grupa związków chemicznych wciąż ignorowana przez dietetyków. Tymczasem produkty spożywcze, które uznaje się za najzdrowsze, jak: warzywa, czekolada, herbata, czerwone winogrona, to surowce roślinne bogate w polifenole, co zainteresowało naukowców i rozpoczęło debatę na temat funkcji i roli tych związków chemicznych w zachowaniu zdrowia.

Niniejsza publikacja prezentuje wybrane wyniki aktualnych badań prowadzonych nad surowcami polifenolowymi, ich działaniem na organizm człowieka i możliwościami zastosowania polifenoli w ochronie zdrowia i medycynie.

W rozdziale pierwszym Agnieszka Cierniak, Sylwia Łukasiewicz i Agnieszka Kyzioł opisały syntezę nanocząstek złota sprzężonych z ekstraktami z róży damasceńskiej o wysokiej zawartości polifenoli i ich selektywne oddziaływanie na komórki zdrowe i nowotworowe.

Surowce polifenolowe mogą być wykorzystane jako substancje wspomagające w terapii antynowotworowej, co na przykładzie mieszanki ziołowej LCS101 przedstawili Sylwia Łukasiewicz, Marta Dziedzicka-Wasylewska, Agnieszka Cierniak, Zoya Cohen i Yair Maimon w rozdziale drugim.

Szczególną rolę w utrzymaniu zdrowia przypisuje się polifenolom, które mogą działać jako czynniki przeciwutleniające i chemoprewencyjne, co Małgorzata Kalemba-Drożdż, Agnieszka Cierniak i Inga Kwiecień zaprezentowały w rozdziale trzecim na przykładzie takich surowców polifenolowych jak: jadalne kwiaty, drobne owoce rosnące na półkuli północnej i liście dzikich roślin jadalnych.

Polifenole, które można znaleźć w kiszonkach warzywnych i ich właściwości zdrowotne opisali Patryk Zdziobek i Grzegorz Jodłowski w rozdziale czwartym.

Artur Budzowski i Regina Gil w rozdziale piątym przedstawili możliwości zastosowania surowców polifenolowych w podwyższaniu stopnia ochrony skóry przed promieniowaniem ultrafioletowym. Polifenole wykazują właściwości ochronne poprzez absorpcję UV, zmiatanie wolnych rodników, a także działają przeciwzapalnie oraz immunomodulacyjnie.

W rozdziale szóstym Adam Kapler podaje przykłady możliwości uprawy w Polsce mniej znanych roślin wrzosowatych o jadalnych owocach bogatych w polifenole, jako alternatywy do owoców sprowadzanych spoza Europy.

Mamy nadzieję, że niniejsza publikacja pomoże rozszerzyć i propagować wiedzę na temat związków polifenolowych i surowców roślinnych oraz ich ogromnego znaczenia dla zdrowia człowieka.

Małgorzata Kalemba-Drożdż

PREFACE

Polyphenols are secondary metabolites of plants and fungi. They are commonly found in the flowers, bark, roots, stems, leaves and fruits of plants. Their chemical structure is characterized by the presence of at least two or more –OH groups attached to aromatic rings. Polyphenols include lignans, curcuminoids, tannins, stilbedons, phenolic acids and flavonoids. The latter class includes: flavones (e.g., apigenin), flavanones (e.g., naringenin), flavonols (e.g., quercetin), flavanols (e.g., catechins), isoflavones (e.g., genistein), anthocyanidins (e.g., malvidin), chalcones (e.g., butein), aurones (e.g. aureuzidine) and xanthenes (e.g. α -mangostin). To date, more than ten thousand polyphenolic compounds have been described and still not all of them are known. Properties of polyphenols are a subject that is intensively researched all over the world due to the possible use of polyphenolic compounds in medicine, pharmacology, cosmetology, agriculture, dietetics and industry.

Polyphenols produced by plants act as antibiotics, fungicides, herbicides, protect against ultraviolet radiation, modulate the action of plant hormones, take part in attracting insects, and give plant tissues intense colors. They can also show a very wide range of properties in the human body. Polyphenolic compounds act as antioxidants, free radical scavengers, heavy metal chelating compounds, they increase the activity of detoxification enzymes, have anti-inflammatory, anti-allergic, antiviral, antibacterial and anti-cancer properties. Vegetables, fruits and herbs owe their health-promoting properties to polyphenols, although this is a group of chemical compounds still ignored by nutritionists. Meanwhile, food products that are considered the healthiest, such as vegetables, chocolate, tea, red grapes, are plant materials rich in polyphenols, which interested scientists in these chemicals and started a debate about their functions and role in maintaining health.

This publication presents selected results of current research on polyphenols, their effects on the human body and the possibilities of using polyphenol rich plant materials in health care and medicine.

In the first chapter, Agnieszka Cierniak, Sylwia Łukasiewicz and Agnieszka Kyzioł described the synthesis of gold nanoparticles conjugated with damask rose extracts which are characterised by high content of polyphenols and depicted the selective effect of those nanoparticles on healthy lymphocytes and cancer cells.

Polyphenol rich plant extracts can be used as adjuvants in anti-cancer therapy, which was presented on the example of the LCS101 herbal mixture by Sylwia Łukasiewicz, Marta Dziedzicka-Wasylewska, Agnieszka Cierniak, Zoya Cohen and Yair Maimon in the second chapter.

A special role in maintaining health is assigned to polyphenols, which can act as antioxidants and chemopreventive agents, which was presented by Małgorzata Kalemba-Drożdż, Inga Kwiecień and Agnieszka Cierniak in the third chapter on the example of such polyphenols rich materials as: edible flowers, berry fruits growing in the Northern Hemisphere and leaves of wild edible plants.

The polyphenols that can be found in vegetable lactofermented pickles and their health properties were described by Patryk Zdziobek and Grzegorz Jodłowski in chapter four.

In the fifth chapter, Artur Budzowski and Regina Gil presented the possibilities of using polyphenolic rich plant materials in increasing the level of skin protection against ultraviolet radiation. Polyphenols show protective properties through UV absorption, scavenging free radicals, moreover they have anti-inflammatory and immunomodulating properties.

In chapter six, Adam Kapler gives examples of the possibility of growing in Poland less known heather plants which have edible fruit rich in polyphenols as an alternative to fruit imported from outside Europe.

We hope that this publication will help broaden and disseminate knowledge about polyphenolic compounds and polyphenol rich plant materials and their enormous importance for human health.

Małgorzata Kalemba-Drożdż



Rycina 2. Róża damasceńska (*Rosa damascena*).
Fot. Małgorzata Kalemba-Drożdż

ROZDZIAŁ 1.

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA *IN VITRO* NANOCZĄSTEK ZŁOTA (Au@RD NPS) OTRZYMANÝCH PRZY UŻYCIU WODNEGO EKSTRAKTU Z RÓŻY DAMASCEŃSKIEJ (*ROSA DAMASCENA*)

Agnieszka Cierniak¹, Sylwia Łukasiewicz², Agnieszka Kyzioł³

¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0001-6537-2954

² Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biochemii Fizycznej, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0002-6574-1147

³ Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0003-0751-5819

DOI: 10.48269/978-83-66007-99-4-001

Streszczenie

Synteza nanocząstek metali (NPs) oparta na chemii zrównoważonego rozwoju staje się coraz popularniejszą ekologiczną metodą stosowaną zamiast syntezy chemicznej. W szczególności ekstrakty roślinne jako czynniki redukujące i stabilizujące są stopniowo wykorzystywane do syntezy metalicznych nanocząstek. Ekstrakty z róży damasceńskiej (*Rosa damascena*), wykazujące właściwości antyoksydacyjne, antybakteryjne, przeciwzapalne czy antynowotworowe, mogą być wykorzystane do syntezy nanocząstek złota.

Celem badań była ekologiczna i kontrolowana synteza nanocząstek złota z zastosowaniem ekstraktu wodnego z róży damasceńskiej (Au@RD NPs). Analizowano wpływ Au@RD NPs na przeżywalność, poziom uszkodzeń DNA i apoptozę w komórkach prawidłowych – ludzkich limfocytach, oraz nowotworowych: HL60 i A549.

W badaniach *in vitro* nie wykazano cyto- i genotoksyczności Au@RD NPs wobec komórek prawidłowych, natomiast dla komórek nowotworowych wykazano selektywną

cyto- i genotoksyczność oraz indukcję apoptozy. Uzyskane wyniki wskazują, że nanocząstki złota otrzymane zgodnie z zasadami chemii zrównoważonego rozwoju są atrakcyjnymi materiałami hybrydowymi dla badań biologicznych łączącymi dwa aktywne składniki – nanocząstki metali i polifenole roślinne.

Słowa kluczowe: nanocząstki złota; polifenole; apoptoza; uszkodzenia DNA

Abstract

In vitro biological activity of gold nanoparticles (Au@RD NPs) obtained using aqueous extract of Damask rose (*Rosa damascena*)

Synthesis of metal nanoparticles (NPs) based on Sustainable Chemistry is an increasingly popular ecological method, instead of chemical synthesis. In particular, plant extracts as reducing and stabilizing agents are gradually used for the synthesis of metallic nanoparticles. Extracts of Damask rose (*Rosa damascena*) have antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory or anti-cancer properties that can be used to synthesize gold nanoparticles.

The aim of the study was the ecological and controlled synthesis of gold nanoparticles using Damask rose aqueous extract (Au@RD NPs). The effect of NPs Au@RD on survival, DNA damage and apoptosis in normal cells: human lymphocytes and cancer cells: HL60 and A549 was studied.

In vitro studies did not revealed cyto- and genotoxicity of Au@RD NPs in the case of normal cells, while for cancer cells: selective cyto- and genotoxicity and induction of apoptosis were demonstrated. The data show that gold nanoparticles obtained in accordance with the principles of Sustainable Chemistry are attractive hybrid materials for biological purposes combining two active components – metal nanoparticles and plant polyphenols.

Key words: gold nanoparticles; polyphenols; apoptosis; DNA damage

Wprowadzenie

Synteza nanocząstek metali (NPs, ang. *nanoparticles*) oparta na założeniach chemii zrównoważonego rozwoju staje się coraz popularniejszą ekologiczną metodą stosowaną zamiast syntezy chemicznej. W szczególności ekstrakty roślinne jako czynniki redukujące i stabilizujące są stopniowo wykorzystywane do syntezy metalicznych nanocząstek, dlatego synteza ta jest potocznie określana „zieloną chemią” [Akhtar i wsp. 2013, Mittal i wsp. 2013, Bhaumik i wsp. 2015, Duan i wsp. 2015, Sasidharan i wsp. 2018]. Zainteresowanie zastosowaniem nanocząstek jest duże ze względu na relatywną łatwość ich syntezy, dobrą kontrolę rozmiarów i kształtów, właściwości optyczne i wysoką biokompatybilność powstałych nanocząstek.

Nanostruktury złota cieszą się dużym zainteresowaniem w badaniach naukowych ze względu na ich szerokie zastosowanie w fotonice, elektronice, katalizie, detekcji optycznej i obrazowaniu, terapii fototermalnej czy fotodynamicznej oraz w dostarczaniu substancji aktywnych i leków [Hu i wsp. 2006, Rao i Paria 2015, De Crozals i wsp. 2016, Peynshaert i wsp. 2014]. Fizykochemiczne i biologiczne właściwości nanostruktur złota różnią się w zależności od ich wielkości, kształtu, porowatości i modyfikacji powierzchni oraz wielu innych właściwości. Różne strategie i sposoby syntezy opisywane w literaturze pozwalają uzyskać różnorodne i różnowymiarowe nanocząstki, w tym nanosfery, nanopręty, nanoklatki czy nanopowłoki [Akhtar i wsp. 2013, Duan i wsp. 2015, Xia i wsp. 2009, Lofton i Sigmund 2005, Gharib i wsp. 2019]. Na podstawie badań *in vitro* udowodniono, że ogólna toksyczność wykazywana przez anizotropowe nanocząstki złota może pochodzić od środków redukujących i/lub stabilizujących stosowanych w ich syntezie [Gharib i wsp. 2019]. Jednakże dotyczy to przede wszystkim syntez z użyciem toksycznych odczynników organicznych, gdzie istnieje obawa o niedokładne oczyszczanie próbek w obróbce końcowej lub podczas dializy przy wymianianiu ligand powierzchniowych.

Zgodnie z proponowanym w literaturze mechanizmem generowania nanocząstek metalicznych to grupy funkcyjne, takie jak grupy hydroksylowe lub ketonowe flawonoidów, polifenoli oraz innych cząsteczek występujących w ekstraktach roślinnych, są utleniane do odpowiednich kwasów karboksylowych przy jednoczesnej redukcji odpowiednich jonów metali [Ghoreishi i wsp. 2011, Edison i Sethuraman 2012, Lee i Park 2011, Kasthuri i wsp. 2009]. Tak więc ekstrakty roślinne, zawierające zarówno pierwotne, jak i wtórne cząsteczki metabolitów bogatych we wspomniane grupy funkcyjne, można uznać za czynniki redukujące oraz stabilizujące, zapobiegające agregacji cząstek podczas początkowych etapów syntezy oraz późniejszej agregacji i aglomeracji syntetyzowanych z ich użyciem nanocząstek.

Ekstrakty roślinne zawierające polifenole mają szeroko udokumentowany licznymi badaniami *in vitro* i *in vivo* potencjał antyoksydacyjny zapobiegający uszkodzeniom DNA [Kalim i wsp. 2010, Estrela i wsp. 2017] oraz aktywność przeciwnowotworową, którą wykazano także dla nanocząstek złota [Avtanski i Poretsky 2018, Sztandera i wsp. 2019, Khan i wsp. 2019]. Na szczególną uwagę zasługują ekstrakty z róży damasceńskiej

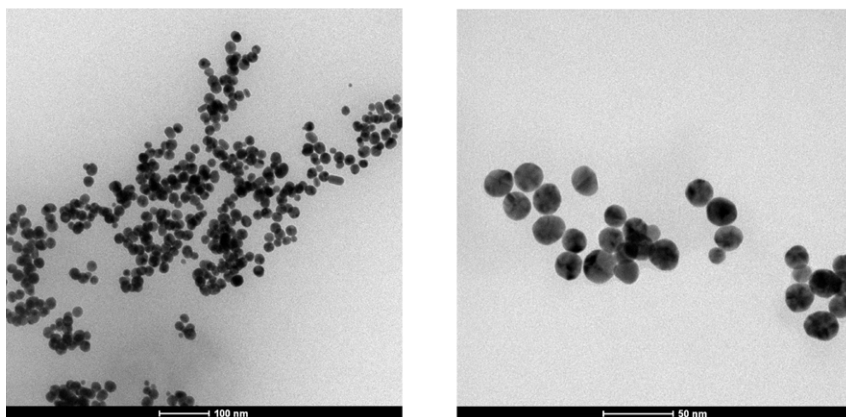
(*Rosa damascena*) (rycina 2, s. 15) bogate w różne substancje aktywne, m.in. terpeny, glikozydy, flawonoidy, antocyjany, taniny czy wielonienasycone kwasy tłuszczowe (np. kwas linolenowy). Odmiana ta jest bogata również w witaminy C i E, beta-karoten oraz minerały, takie jak: wapń, żelazo, potas, mangan, sód, fosfor i cynk [Akram i wsp. 2020]. Ekstrakty z płatków róży damasceńskiej zawierają mircen, kwas karboksylowy, kempferol i kwercetynę [Schiber i wsp. 2005]. Dzięki tak licznie reprezentowanym składnikom bioaktywnym ekstrakty te wykazują potwierdzone wieloma badaniami szerokie spektrum właściwości, m.in. działania: antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwbólowe, moczopędne, przeciwkaszlowe, żółciopędne, rozkurczowe, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne [Mahboubi 2015]. Również wcześniejsze badania prowadzone na ludzkich limfocytach poddanych działaniu wyciągów z róży damasceńskiej potwierdziły właściwości ochronne ekstraktów różanych przeciwko oksydacyjnym uszkodzeniom DNA indukowanym $25 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ [Kalemba-Drożdż i Cierniak 2013]. Obecnie, kiedy coraz więcej uwagi poświęca się rozwojowi biokompatybilnych i biodegradowalnych materiałów na bazie metabolitów roślinnych, hybrydowe biomateriały mogą być obiecującymi wektorami w dziedzinie zastosowań biomedycznych o kontrolowanym uwalnianiu, zwłaszcza w terapii nowotworów [Guo i wsp. 2019, Liang i wsp. 2018]. W szczególności biosyntezyzowane nanocząstki złota mogą stać się terapeutykami nowej generacji przeciwko różnym rodzajom nowotworów. Zaprojektowana wielofunkcyjność nanocząstek metali, polegająca na montażu/zakotwiczeniu metabolitów roślinnych z ich antyoksydacyjnymi właściwościami, może zapewnić selektywną aktywność w stosunku do komórek prawidłowych i nowotworowych.

Zatem, mając do dyspozycji dwie tak różne i jednocześnie posiadające tak szerokie spektra terapeutyczne jednostki budulcowe jak nanocząstki złota i ekstrakt z róży damasceńskiej, postanowiliśmy przeprowadzić syntezę bioaktywnych nanocząstek złota z wykorzystaniem tego ekstraktu i zbadać ich działanie w układzie *in vitro*. Celem badań była ekologiczna, wydajna i kontrolowana synteza nanocząstek złota z zastosowaniem ekstraktu wodnego z róży damasceńskiej (Au@RD NPs) bez użycia innych środków redukujących oraz określenie wpływu Au@RD NPs na przeżywalność, uszkodzenia DNA i proces apoptozy w komórkach prawidłowych – jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBML), oraz

w komórkach nowotworowych: ostrej białaczce promielocytowej (HL60) i ludzkim gruczolakoraku, tj. niedrobnokomórkowym raku płuc (A549).

Materiały i metody

Metody opisujące syntezę Au@RD NPs, określenie właściwości fizykochemicznych (wielkość, kształt, stabilność) otrzymanych Au@RD NPs oraz zawartość polifenoli, flawonoidów, cukrów redukujących i właściwości antyoksydacyjne zostały szczegółowo opisane w publikacji *Towards plant-mediated chemistry – Au nanoparticles obtained using aqueous extract of Rosa damascena and their biological activity in vitro* [Kzyziół i wsp. 2021]. Ogólnie synteza nanocząstek Au@RD została zainicjowana przez dodanie 2 ml 5 mM wodnego roztworu HAuCl_4 do 18 ml wodnego ekstraktu róży damasceńskiej (1 mg/ml) tak, aby końcowe stężenie kwasu Au(III) w mieszaninie reakcyjnej wyniosło 0,5 mM. Mieszanina reakcyjna była mieszana w sposób ciągły w temperaturze pokojowej 22°C, przy czym w ciągu 3 min rozwinęło się różowe zabarwienie wskazujące początek tworzenia się Au@RD NPs. Postęp reakcji monitorowano mierząc absorbancję mieszaniny reakcyjnej w regularnych odstępach czasu. Rycina 3 przedstawia zdjęcie TEM uzyskanych Au@RD NPs. W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki eksperymentów *in vitro* z Au@RD NPs.



Rycina 3. Obraz z mikroskopu TEM przedstawiający nanocząstki złota uzyskane z użyciem wodnego ekstraktu z róży damasceńskiej w różnej skali [Kzyziół i wsp. 2021: 7]

Izolacja limfocytów

Krew będąca źródłem limfocytów kontrolnych pochodziła ze stacji krwiodawstwa w Krakowie i była pobrana od 3 różnych dawców płci męskiej w wieku 23–45 lat. Pobraną krew wirowano [12 min, 1500 rpm ($350 \times g$), 4°C] w celu uzyskania osocza, a następnie krew rozcieńczoną w stosunku 1:1 z PBS wirowano w gradiencie gęstości [Histopaque 1077, 35 min, 1600 rpm ($400 \times g$), w temperaturze pokojowej]. W kolejnym etapie warstwa limfocytarna została dwukrotnie odwirowana w PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} [10 min, 1500 rpm ($350 \times g$) w 4°C]. Limfocyty zostały następnie zamrożone w -80°C w pożywce: 40% RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium), 50% płodowa surowica cielęca (FBS, *fetal bovine serum*), 10% dimetylosulfotlenek (DMSO).

Hodowla komórek HL60 i A549

Komórki HL60 (ATCC: CCL 240TM) hodowano w zawiesinie o gęstości $5 \times 10^5/\text{ml}$ w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Komórki A549 (ATCC: CCL-185TM) hodowano w zawiesinie $5 \times 10^5/\text{ml}$ w pożywce DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z L-glutaminą, czerwieńią fenolową i glukozą (4,5g/L) również z dodatkiem 10% FBS oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C , w atmosferze zawierającej 5% CO_2 o wilgotności 95%, zmieniając płyn hodowlany co 48 godzin. Wszystkie eksperymenty wykonywano w fazie logarytmicznego wzrostu komórek. Do eksperymentów komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości $1,5 \times 10^4/\text{ml}$ i inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie pożywki wymieniano na świeże i do komórek dodawano Au@RD NPs w stężeniu 0–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i inkubowano przez 1, 24 i 48 godzin.

Ocena żywotności komórek – test fluorescencyjny

W celu zbadania wpływu Au@RD NPs na komórki prawidłowe (ludzkie limfocyty) przeprowadzono różnicowe barwienie fluorescencyjne, w którym pod wpływem dwuocianu fluoresceiny komórki żywe barwią się na kolor zielony, a bromek etydyny wybarwia komórki martwe

na pomarańczowo. PBML o gęstości $1,5 \times 10^4$ /ml inkubowano przez 1 i 24 godziny z Au@RD NPs w stężeniu 0–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Następnie komórki odwirowano, zawieszono w 30 μl PBS i mieszano w stosunku 1:1 z mieszaniną dwuoctanu fluoresceiny w acetonie o stężeniu 5 mg/ml , bromku etydydy w PBS o stężeniu 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 4,6 ml PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym z użyciem niebieskiego filtra wzbudzającego, licząc 500 losowo wybranych komórek w każdym preparacie. Zliczano wyniki z trzech niezależnych eksperymentów.

Ocena żywotności komórek – test luminescencyjny CellTiter-blue®

Do monitorowania żywotności komórek HL60 i A549 zastosowano test CellTiter-Blue® (Promega). Oznacza się w nim zdolność żywych komórek do przekształcania barwnika (resazuryny) w produkt fluorescencyjny (rezorufinę). Tylko żywe komórki są w stanie metabolizować i redukować barwnik – komórki bez zdolności metabolicznej nie generują sygnału fluorescencyjnego. Dzień przed eksperymentami komórki wysiewano na 96-dółkowe czarne płytki w gęstość $1,5 \times 10^4$ komórek na dółek. Następnie dodawano Au@RD NPs w ilości 0–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Procedura testu jednorodnego obejmuje dodanie pojedynczego odczynnika bezpośrednio do komórek hodowanych w pożywce uzupełnionej surowicą. Dlatego po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z Au@RD NPs pożywka z hodowli komórkowej została usunięta i zastąpiona świeżo przygotowaną pełną pożywką (50 μl na dółek) uzupełnioną odczynnikami CellTiter Blue (10 μl na dółek). Po 3 godzinach inkubacji w 37°C , w atmosferze 5% CO_2 , mierzono fluorescencję za pomocą czytnika mikropłytek (TECAN Infinite200). Długość fali wzbudzenia: 560 nm; długość fali emisji: 590 nm. Komórki bez Au@RD NPs służyły jako kontrola. Wyniki przedstawione w dalszej części opracowania prezentują średnią żywotność komórek z 6-krotnych powtórzeń (6 studzienek na każdy punkt pomiarowy) z trzech niezależnych eksperymentów dla każdej linii komórkowej.

Badanie uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki – test kometowy

Test kometowy (ang. *comet assay*) polega na elektroforezie nukleoidów w żelu agarozowym i służy do wykrywania uszkodzeń DNA na poziomie

pojedynczej komórki. Jeśli doszło do uszkodzenia DNA w komórce, wówczas po zastosowaniu alkalicznej lizy ($\text{pH} > 13$), a następnie elektroforezy, widoczny jest charakterystyczny obraz tzw. komety. „Ogon komety” odzwierciedla ilość uszkodzeń DNA wyrażoną jako % uszkodzeń DNA w pojedynczej komórce.

W przeprowadzonych doświadczeniach PBML komórki HL60 i A549 o gęstości $5 \times 10^5/\text{ml}$ inkubowano przez 1, 24 oraz 48 godzin z Au@RD NPs w stężeniu 0–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Następnie odwirowano je w PBS w warunkach: 4°C , 5 min, $230 \times g$ (1200 rpm) i zawieszono w 50 μl PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Do zawiesiny komórek dodawano agarozę o obniżonej temperaturze topnienia (LMPA, ang. *low melting point agarose*), po czym nakładano ją na wcześniej przygotowane szkiełka podstawowe pokryte agarozą o normalnej temperaturze topnienia (NMPA, ang. *normal melting point agarose*). Po zastygnięciu agarozy preparaty zanurzano w buforze lizującym (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, $\text{pH} = 10$) na 16 godzin. Następnie prowadzono elektroforezę przez 30 min przy napięciu 0,74 V/cm i natężeniu 300 mA. Po neutralizacji (0,4 M Tris $\text{pH} = 7,5$) preparaty zanurzano na 5 min w zimnym metanolu. Bezpośrednio przed analizą szkiełka inkubowano przez 5 min w wodzie destylowanej oraz barwiono jodkiem propidyny (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pomiarów dokonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX50. Analiza uszkodzeń DNA została przeprowadzona w programie Comet Assay 2.6 (Comet Plus, Theta System GmbH, Germany) określającym stopień uszkodzenia komórek. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach, a z każdego preparatu analizowano po 100 komórek. W dalszej analizie posłużono się % DNA zawartym w ogonie komety reprezentującym stopień uszkodzenia komórek.

Apoptoza – poziom aktywności kaspazy 3/7

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest procesem złożonym, który obejmuje kaskadę molekularnych zdarzeń doprowadzających do powstania tzw. ciał apoptotycznych, które są całkowicie przetwarzane z udziałem lizosomów komórek sąsiadujących z degradowaną komórką lub przez makrofagi. Ważnymi mediatorami apoptozy są kaspazy, które dzielimy na dwie grupy: inicjatorowe (kaspazy 2, 8, 9 i 10) oraz

wykonawcze (kaspazy 3, 6 i 7). Oznaczenie aktywności kaspaz wykonawczych jest jednym ze sposobów potwierdzenia, że komórka wchodzi na drogę apoptozy.

Aktywność kaspaz 3 i 7 mierzono za pomocą testu Caspase-Glo 3/7 (Promega, Madison, USA). Komórki HL60 i A549 (2×10^5 na dołek) wysiano na 12-dółkowych płytkach i wystawiono na działanie od 0 do 100 $\mu\text{g/ml}$ Au@RD NP przez 24 i 48 godzin. Ekstrakty białkowe (3 μg) zmieszano z 50 μl odczynnika Caspase-Glo[®] 3/7 i umieszczono na białych 96-dółkowych płytkach. Po 120 min inkubacji luminescencję mierzono za pomocą czytnika mikroplatek Infinite M200. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach a pomiary w duplikatach dla każdego punktu pomiarowego. Średnią wartość luminescencji dla każdego stężenia Au@RD NPs podzielono przez średnią wartość dla kontroli i przedstawiono jako % kontroli (kontrola traktowana jako 100%).

Apoptoza – wizualizacja komórek apoptotycznych z użyciem barwnika Hoechst 33342 i mikroskopii fluorescencyjnej

Za pomocą barwienia fluorescencyjnego możliwe jest odróżnienie komórek prawidłowych od tych, które weszły w apoptozę. Na poziomie morfologicznym komórki apoptotyczne wyraźnie różnią się od zdrowych: widoczne jest formowanie charakterystycznych ciałek apoptotycznych – struktur zawierających organelle i fragmenty chromosomów otoczonych błoną komórkową, które po zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego (1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 w 3,7% paraformaldehydzie w PBS) jasno świecą. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX50.

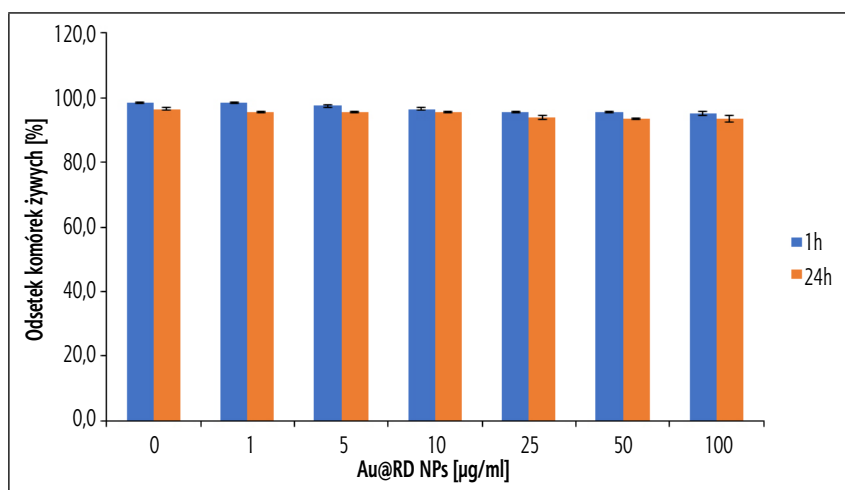
Analiza statystyczna

Analizy statystycznej wyników testu kometowego dokonano w programie Statistica 12.0 (StatSoft Polska), używając testu ANOVA popartego analizą post-hoc Tukeya (HSD). Wyniki przedstawiono w postaci średnich grupowych; słupki błędów oznaczają 1,96 SE (błędu standardowego). Różnice przy $p < 0,05$ przyjęto za istotne statystycznie. W przypadku oceny żywotności oraz apoptozy zastosowano test *t*-studenta.

Wyniki

Wpływ Au@RD NPs na żywotność limfocytów

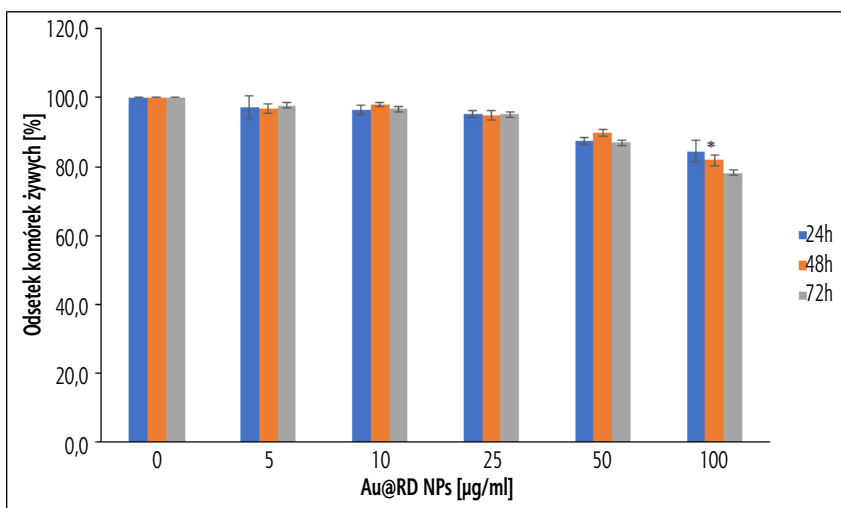
W celu zbadania wpływu nanocząstek złota z polifenolami róży damasceńskiej na żywotność limfocytów izolowanych z krwi zdrowych dawców, komórki traktowano Au@RD NPs przez 1 i 24 godziny w zakresie stężeń 0–100 $\mu\text{g/ml}$. Nie wykazano cytotoksycznego wpływu Au@RD NPs na limfocyty ani istotnych statystycznie różnic pomiędzy czasem inkubacji wynoszącym 1 i 24 godziny dla wszystkich badanych stężeń. Wyniki przedstawiono na rycinie 4.



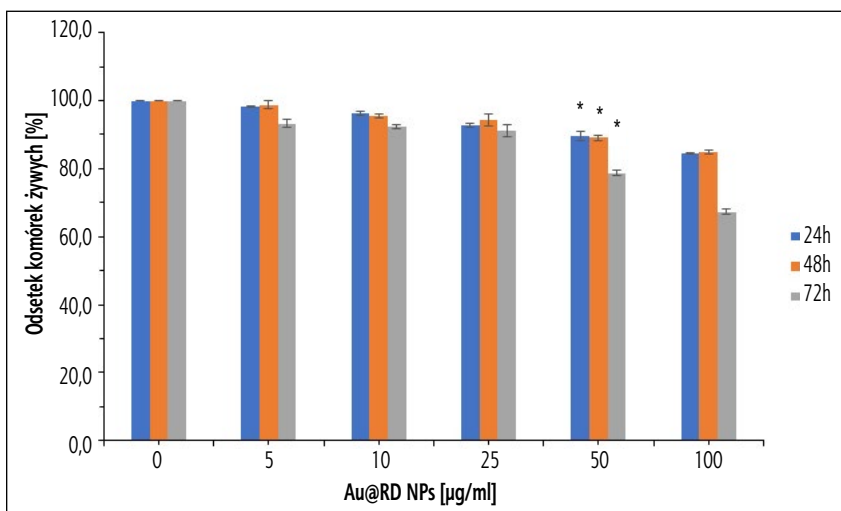
Rycina 4. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 $\mu\text{g/ml}$ na żywotność limfocytów pobranych od zdrowych dawców

Wpływ Au@RD NPs na żywotność komórek A549 i HL60

W celu zbadania wpływu nanocząstek złota z polifenolami róży damasceńskiej na przeżywalność komórek nowotworowych, linie komórkowe A549 oraz HL60 traktowano Au@RD NPs przez 24, 48 i 72 godziny w zakresie stężeń 0–100 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki przedstawiono na rycinach 5 (komórki A549) oraz 6 (komórki HL60).



Rycina 5. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml na żywotność komórek A549 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. * – istotność statystyczna ($p < 0,05$) w stosunku do kontroli (0)



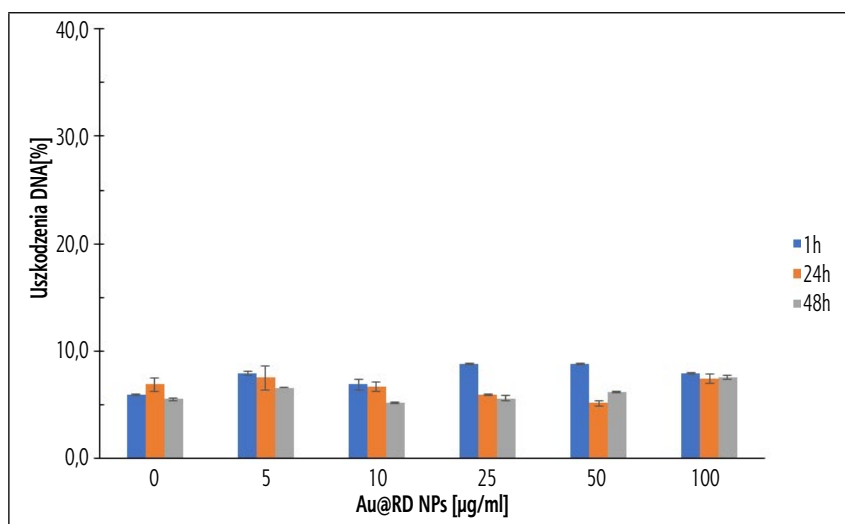
Rycina 6. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml na żywotność komórek HL60 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. * – istotność statystyczna ($p < 0,05$) w stosunku do kontroli (0)

Wykazano, że wraz ze wzrostem czasu inkubacji i stężenia Au@RD NPs zmniejsza się odsetek komórek żywych, co było szczególnie widoczne przy najwyższym zastosowanym stężeniu 100 µg/ml. Ponadto komórki białaczkowe HL60 wykazały większą wrażliwość na zastosowany

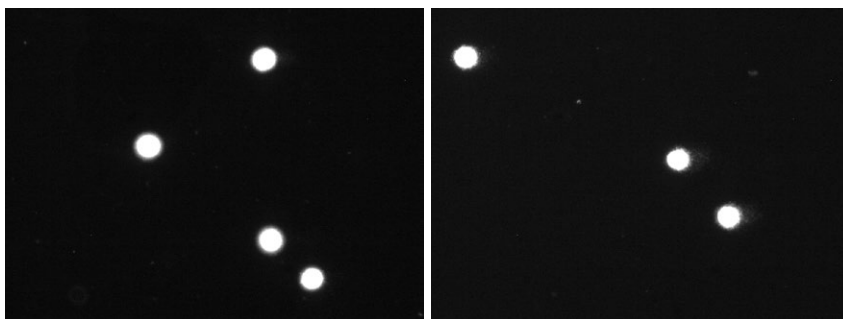
związek, co skutkowało obniżeniem odsetka komórek żywych o 35% przy najwyższym stężeniu po 72 godzinach inkubacji w porównaniu do komórek A549.

Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w limfocytach

W limfocytach izolowanych od zdrowych dawców nie wykazano istotnych statystycznie uszkodzeń DNA w zakresie stosowanych stężeń 0–100 $\mu\text{g/ml}$ Au@RD NPs, nawet wydłużając czas inkubacji do 48 godzin. Wyniki przedstawiono na rycinach 7 oraz 8a i 8b.



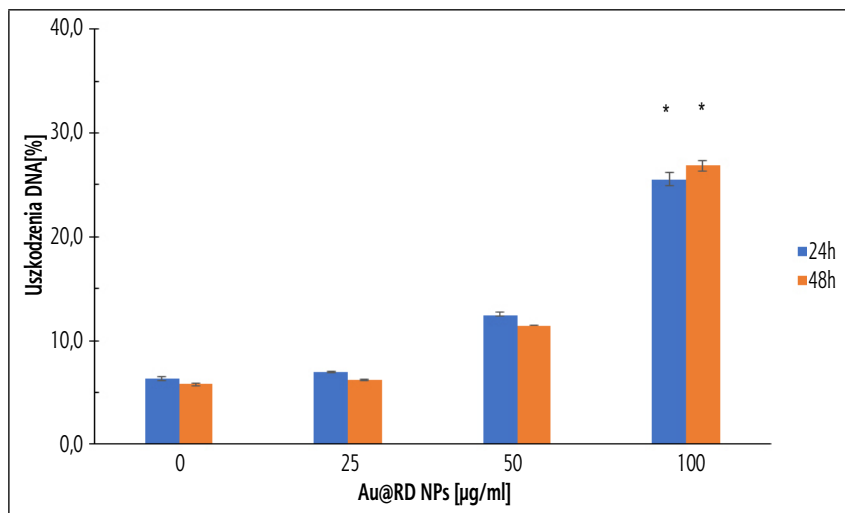
Rycina 7. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w limfocytach izolowanych od zdrowych dawców. Komórki inkubowano z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 $\mu\text{g/ml}$ przez 1, 24 i 48 godzin. Eksperyment powtórzono w trzech niezależnych doświadczeniach na komórkach izolowanych od 3 różnych dawców



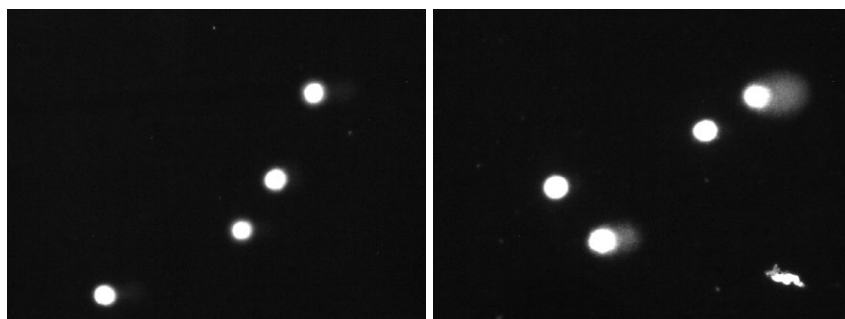
Rycina 8. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (8a) uszkodzenia DNA w limfocytach kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (8b) po 48 godzinach inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml. Na obu rycinach brak charakterystycznego „ogona” komety odpowiadającego stopniowi uszkodzenia DNA w pojedynczej komórce

Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach A549 i HL60

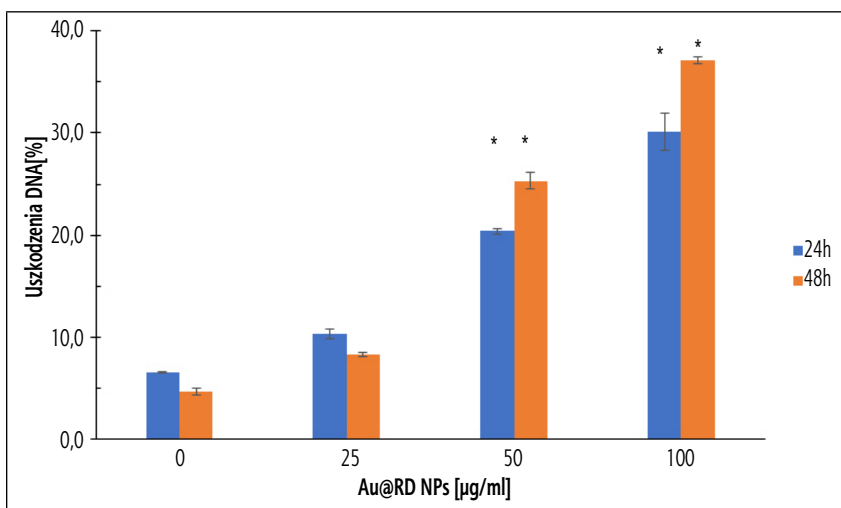
Wykazano, że Au@RD NPs w zakresie stosowanych stężeń 0–100 µg/ml indukuje istotne statystycznie uszkodzenia DNA w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. Wyniki przestawiono na rycinach 9, 10a i 10b dla linii komórkowej A549 oraz na rycinach 11, 12a i 12b dla linii komórkowej HL60. Komórki białaczkowe HL60 wykazały większą wrażliwość na zastosowane nanocząstki złota z polifenolami róży w porównaniu do komórek raka płuc A549, co manifestowało się większym poziomem uszkodzeń DNA – 37% dla HL60 vs 26% dla A549.



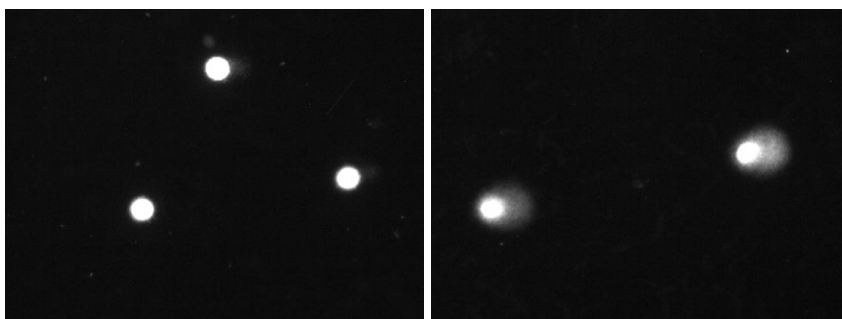
Rycina 9. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach linii A549 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. Wyniki reprezentują średnie wartości z trzech niezależnych eksperymentów. * – oznaczono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem próby kontrolnej (0)



Rycina 10. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (10a) uszkodzenia DNA w komórkach A549 kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (10b) po 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml. Widoczny na obrazie charakterystyczny „ogon” komety odpowiada stopniowi uszkodzenia DNA w pojedynczej komórce



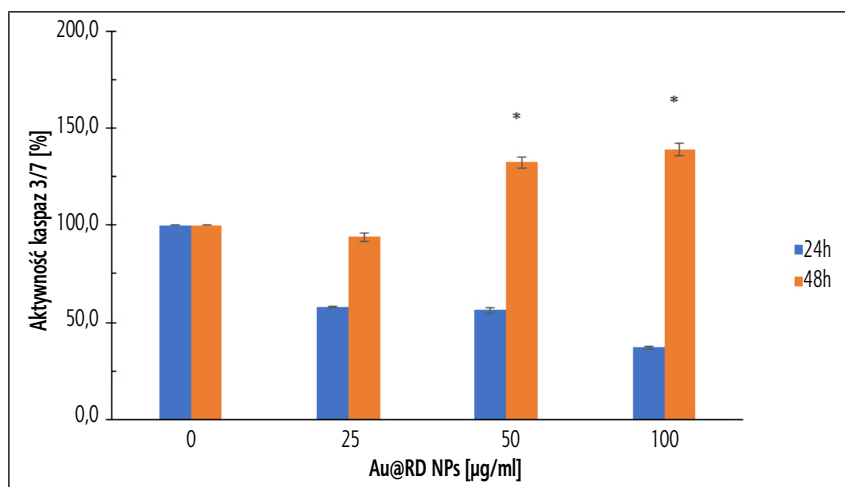
Rycina 11. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach linii HL60 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. Wyniki reprezentują średnie wartości z trzech niezależnych eksperymentów. * – oznaczono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem próby kontrolnej (0)



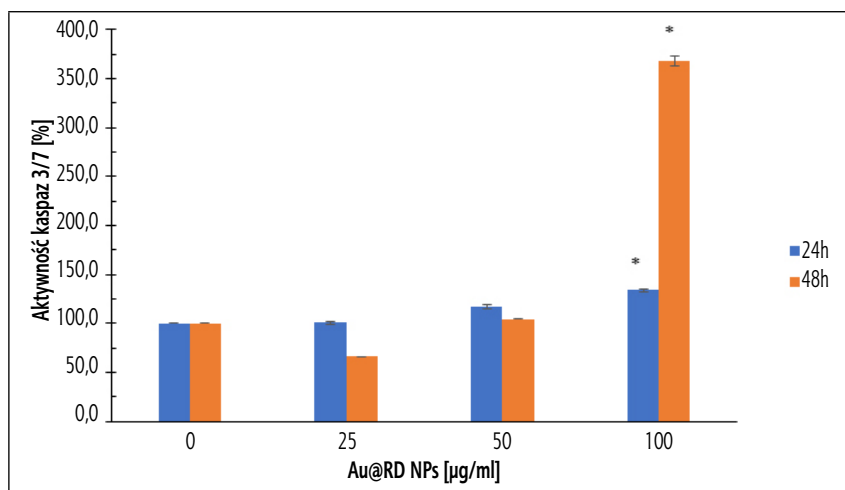
Rycina 12. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (12a) uszkodzenia DNA w komórkach HL60 kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (12b) po 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml

Apoptoza – aktywność kaspaz 3/7 oraz formowanie ciałek apoptotycznych

Wykazano, że 48-godzinna inkubacja komórek A549 z Au@RD NPs w stężeniach 50 i 100 µg/ml powoduje istotny statystycznie wzrost aktywności kaspaz efektorowych 3 i 7, które to kaspazy są decydującymi mediatorami procesu apoptozy. Wyniki przedstawiono na rycinie 13. Podobny, ale dużo silniejszy efekt zaobserwowano dla komórek białaczkowych HL60. Po 48 godzinach inkubacji ze 100 µg/ml Au@RD NPs aktywność kaspaz 3/7 wzrastała o ponad 250% w porównaniu do kontroli – wyniki przedstawiono na rycinie 14.

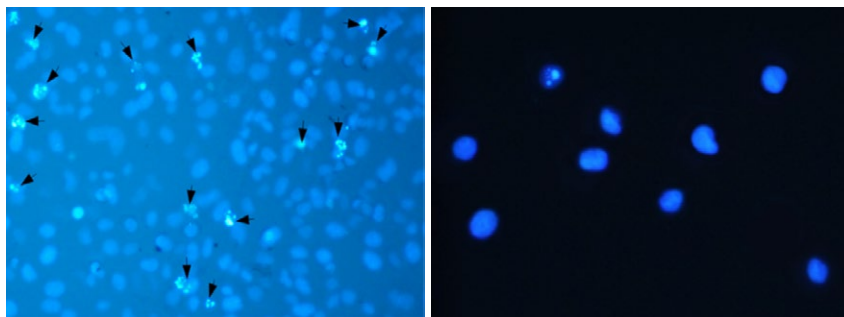


Rycina 13. Wpływ Au@RD NPs na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach linii A549 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. * – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem próby kontrolnej (0). Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach a pomiary w duplikatach dla każdego punktu pomiarowego. Średnią wartość luminescencji dla każdego stężenia Au@RD NPs podzielono przez średnią wartość dla kontroli i przedstawiono jako % kontroli (kontrola traktowana jako 100%)



Rycina 14. Wpływ Au@RD NPs na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach linii HL60 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. * – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem próby kontrolnej (0). Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach a pomiary w duplikatach dla każdego punktu pomiarowego. Średnią wartość luminescencji dla każdego stężenia Au@RD NPs podzielono przez średnią wartość dla kontroli i przedstawiono jako % kontroli (kontrola traktowana jako 100%)

Na poziomie morfologicznym również potwierdzono, że komórki nowotworowe A549 i HL60 po traktowaniu przez 48 godzin Au@RD NPs w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ weszły na drogę apoptozy. Zaobserwowano kondensacje chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych, które po zastosowaniu barwnika Hoechst 33342 wykazywały intensywną niebieską fluorescencję, co przedstawiono na rycinie 15a i 15b.



Rycina 15. Przykładowe zdjęcie (15a) komórek A549 oraz (15b) komórek HL60 wybarwionych Hoechst 33342. Strzałkami zaznaczono intensywnie świecące ciała apoptotyczne. Zdjęcie wykonano przy pomocy mikroskopu epifluorescencyjnego Olympus IX50 stosując powiększenie obiektywu 20x i używając aparatu fotograficznego Nikon D5000

Dyskusja

W ostatnich latach coraz częściej poszukuje się nowych sposobów leczenia nowotworów. Oprócz standardowo stosowanych chemioterapii, hormonoterapii czy radioterapii, często skojarzonych ze składnikami aktywnymi pochodzącymi z roślin, stosuje się również terapię fototermiczną czy fotodynamiczną. Szczególnie dużym zainteresowaniem w zwalczaniu nowotworów cieszą się różnego rodzaju nanomateriały, w tym nanocząstki metali, np. złota.

Nanocząstki złota w porównaniu z innymi metalami charakteryzują się wyjątkowymi właściwościami fizycznymi, chemicznymi, biologicznymi [Fraga i wsp. 2013, Shah i wsp. 2014, Jeong i wsp. 2014]. Rozmiary nanocząstek, ich morfologia oraz sposób funkcjonalizacji powierzchni decydują w głównej mierze o ich szeroko pojętej aktywności i możliwościach aplikacyjnych, w tym diagnostycznych i terapeutycznych. Wysokie powinowactwo do komórek nowotworowych, łatwość modyfikacji

powierzchni oraz specjalne właściwości optyczne stwarzają podstawy do ich efektywnego wykorzystania jako wektorów do docelowej terapii przeciwnowotworowej [Shah i wsp. 2014, Jeong i wsp. 2014].

Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się poszukiwaniu biokompatybilnych i biodegradowalnych nanomateriałów syntetyzowanych na bazie metabolitów roślinnych. Dlatego celem badań była ekologiczna i kontrolowana synteza nanocząstek złota z zastosowaniem ekstraktu z róży damasceńskiej. Synteza nanocząstek Au@RD została zrealizowana za pomocą prostej procedury opartej na redukcji kwasu tetrachlorozłotowego(III) wodnym roztworem ekstraktu z róży damasceńskiej. Tak otrzymane monodispersyjne nanocząstki złota posiadały rozmiar około 20 nm oraz były stabilne przez ponad rok w pH = 3,5. Przeprowadzona charakterystyka ekstraktu wykorzystywanego do syntezy wykazała dużą zawartość polifenoli ($0,853 \pm 0,003$ mg/ml), flawonoidów ($0,156 \pm 0,004$ mg/ml), cukrów redukujących ($0,954 \pm 0,006$ mg/ml) oraz wysoką aktywność antyoksydacyjną ($86,5 \pm 0,4\%$) [Kyzioł i wsp. 2021]. Również inne grupy badawcze stosowały ekstrakty roślinne w syntezie nanocząstek złota, np. Ghoreishi i wsp. [2019] stosując wyciąg z kwiatów róży damasceńskiej uzyskali nanocząstki złota o średnicy poniżej 20 nm. Ponadto Dubey i wsp. [2010] wykazali syntezę heksagonalnych nanocząstek Au ze średnią wielkością 11 nm przy zastosowaniu ekstraktu z liści *Rosa rugosa*. Przy pomocy ekstraktów roślinnych Nadagouda i wsp. [2014] uzyskali nanocząstki o rozmiarach od 20 do nawet 500 nm, w zależności od zastosowanego ekstraktu z jagód, jeżyn, granatów i kurkumy. Wskazuje to na zupełnie inny potencjał redukcji/stabilizacji ekstraktów pochodzących z różnych źródeł biologicznych. Wiadomo, że bogate w przeciwutleniacze ekstrakty roślinne są zdolne do redukcji jonów metali i stabilizacji generowanych nanocząstek metalicznych. Jednak wciąż nie wskazano jednoznacznie, która grupa związków aktywnych pochodzenia roślinnego jest odpowiedzialna za te procesy i decydująco wpływa na rozmiary i kształty otrzymywanych nanocząstek. Choć wielu naukowców próbuje wyjaśnić mechanizm redukcji jonów metali z wykorzystaniem pojedynczych cząsteczek będących składnikami ekstraktów roślinnych, to wciąż mechanizm ten nie jest w pełni poznany. Warto jednak zauważyć, że zastosowana tzw. zielona synteza pozwala, aby powstałe nanocząstki z powłokami antyoksydacyjnymi (bogatymi także w wiele innych

makrocząsteczek pochodzących z ekstraktów roślinnych) mogły być potencjalnie stosowane w terapiach chemoprewencyjnych, dostarczających niezbędnych przeciwutleniaczy oraz/i związków o charakterze przeciwnowotworowym [Wang, Ding i wsp. 2016, Ma i wsp. 2017].

Aktywność biologiczna *in vitro* Au@RD NPs

Nanocząstki złota są intensywnie badane w wielu dziedzinach biomedycznych, nie tylko jako indywidualne środki, ale także jako nośniki leków o doskonałej stabilności [Hu i wsp. 2016] i dużej biogodności (niska toksyczność i immunogenność) w szerokim zakresie ich rozmiarów (30–200 nm) [Woźniak i wsp. 2017, Sun i wsp. 2014]. Co ciekawe, ponieważ ich powierzchnię można łatwo sfunkcjonalizować za pomocą wielu cząsteczek, w tym chemioterapeutyków, oligonukleotydów czy białek, uzyskana w taki sposób aktywność może być całkowicie zmieniona. Na przykład nanocząstki złota modyfikowane kwercetyną, flawonoidem występującym w wielu różnych roślinach i składnikach diety człowieka, wykazywały selektywne działanie antyproliferacyjne i przeciwnowotworowe w stosunku do różnych ludzkich linii nowotworowych [Salehi i wsp. 2020]. To właśnie polifenole są prawdopodobnie jedną z najczęściej badanych klas związków naturalnych, ponieważ wykazują szerokie spektrum właściwości farmakologicznych, w tym działanie chemoprotekcyjne i chemioterapeutyczne [Kalim i wsp. 2010, Avtanski i Poretsky 2018, Mahboubi 2015, Begum i wsp. 2009].

W naszym przypadku oceniano aktywność cytotoksyczną nanocząstek Au@RD NPs *in vitro* wobec komórek prawidłowych – limfocytów krwi obwodowej, oraz względem dwóch linii komórek nowotworowych: ostrej białaczki promielocytowej (HL60) i ludzkiego gruczolakoraka płuc (A549). Nie wykazano aktywności cytotoksycznej względem komórek prawidłowych nawet po 24 godzinach inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. Natomiast w przypadku komórek nowotworowych A549 i HL60 traktowanych tym samym zakresem stężeń Au@RD NPs przez 24, 48 i 72 godziny wykazano selektywną cytotoksyczność zależną od czasu inkubacji, stężenia i linii komórkowej. Spadek przeżywalności komórek A549 nie jest bardzo znaczący, np. po 72 godzinach przy najwyższym badanym stężeniu Au@RD NPs ich żywotność zmniejszyła się

o około 22%, podczas gdy żywotność komórek HL60 była wtedy zmniejszona o około 33%. Zatem można stwierdzić, że komórki ostrej białaczki są bardziej wrażliwe na Au@RD NPs niż komórki nowotworu płuc analizowane w ramach tego samego testu, stężenia i czasów inkubacji. Aby uzyskać lepszy wgląd w mechanizm cytotoxycywności indukowanej przez Au@RD NPs postawiono pytanie, czy nanocząstki złota z polifenolami róży powodują uszkodzenia DNA w badanych komórkach. W tym celu zastosowano test kometowy. W przypadku komórek prawidłowych nie zaobserwowano uszkodzeń DNA nawet po 48 godzinach inkubacji z 100 $\mu\text{g/ml}$ Au@RD NPs, podczas gdy uszkodzenia DNA wykazano w obu liniach nowotworowych. Określony poziom uszkodzenia DNA w ogonach komet był znacznie wyższy dla komórek HL60 niż dla komórek A549. W przypadku komórek A549 uszkodzenia DNA były widoczne po 24 godzinach przy wyższych stężeniach Au@RD NPs, ale nie wzrastały z czasem inkubacji. Co ważne, oznaczony poziom uszkodzeń DNA dla komórek HL60 był większy niż dla komórek A549 i rósł z czasem inkubacji, co daje zgodne wyniki z analizowaną przeżywalnością komórek. Różnica we wrażliwości komórek może być związana z różnicami w proporcji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego lub różną aktywnością topoizomerazy II pomiędzy tymi liniami. Białko naprawy DNA – polimeraza 1 poli[adenozynodifosforanu (ADP)–rybozy] (PARP1) – ma tendencję do silnej ekspresji w nowotworach płuc, co może odpowiadać za mniejszą wrażliwość komórek niedrobnokomórkowego raka płuc na uszkodzenia DNA indukowane Au@RD w porównaniu do komórek białaczkowych. Badania przeprowadzone na obu liniach nowotworowych sugerują, że Au@RD NPs stosowane w wyższych dawkach (100 $\mu\text{g/ml}$) mogą w znaczny sposób przyczyniać się do eliminacji komórek nowotworowych, a jednocześnie nie generować cyto- i genotoksycywności wobec prawidłowych limfocytów krwi. Jest to o tyle ważne, że bardzo często chemioterapeutyki stosowane w tradycyjnym leczeniu nowotworów wykazują działania uboczne w stosunku do komórek prawidłowych, takie jak: mielosupresja, indukcja uszkodzeń DNA poprzez hamowanie topoizomerazy II czy generowanie wolnych rodników [Cierniak i wsp. 2018]. Zastosowane przez nas Au@RD NPs nie prowadzą do śmierci komórkowej i nie uszkadzają komórek prawidłowych, w szczególności tych tak ważnych z punktu widzenia odporności limfocytów.

Apoptoza jest kaskadą zdarzeń molekularnych prowadzących do eliminacji komórek. Sprzyja utrzymaniu ich stałej liczby w tkankach i narządach, a jednocześnie jest kluczowym procesem w eliminacji komórek nowotworowych. Podczas tego procesu dochodzi do kondensacji chromatyny, fragmentacji DNA oraz formowania ciałek apoptotycznych. Głównymi enzymami zaangażowanymi w proces apoptozy są kaspazy: inicjatorowe i wykonawcze. Kaspazy wykonawcze mogą aktywować inne proteazy, trawić docelowe białka (np. laminy jądrowe) oraz aktywować DNAzy powodując ich nieodwracalny rozpad [Sharifi i wsp. 2012, Sabella i wsp. 2014]. Dlatego oznaczenie aktywności kaspaz 3/7 jest jednym ze sposobów potwierdzenia, że komórka wchodzi na drogę apoptozy. Apoptozę można również potwierdzić wizualizując ciała apoptotyczne za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. W naszych badaniach wykazaliśmy, że Au@RD NPs mogą kierować komórki nowotworowe na drogę apoptozy poprzez zwiększenie aktywności kaspaz efektorowych 3/7 o 38% dla komórek A549 i aż o 268% dla komórek HL60.

Apoptozę w komórkach nowotworowych indukują zarówno polifenole [Sharma i wsp. 2018, Abbaszadeh i wsp. 2020], w tym polifenole obecne w ekstraktach z róży damasceńskiej [Al-Oqail i wsp. 2021], jak i same nanocząstki złota [Sun i wsp. 2018]. Również wiele badań, w których otrzymano nanocząstki złota skoniugowane z polifenolami, np. kwercetyną [Balakrishnan i wsp. 2017], wykazuje, że takie biohybrydowe materiały indukują apoptozę w komórkach nowotworu piersi z resweratolem w komórkach nowotworu wątroby [Zhang, Zhang i wsp. 2019] lub z polifenoaliami z liści *Abutilon indicu* (rośliny z rodziny ślazowatych) w komórkach nowotworu jelita grubego [Mata i wsp. 2016].

Jak wynika z naszych badań oraz z doniesień innych naukowców, synteza nanocząstek złota z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych jest obiecującą strategią w kierunku poszukiwania nowych sposobów leczenia nowotworów, łączącą dwa różne składniki o szerokim potencjale terapeutycznym – nanocząstki złota i ekstrakty roślinne. Podsumowując, wszystkie otrzymane przez nas wyniki dla komórek nowotworowych wskazują, że to komórki białaczkowe HL60 wydają się być docelowymi komórkami w dalszych badaniach nad terapeutycznym zastosowaniem Au@RD NPs wykazując większą wrażliwość na zastosowane nanocząstki.

Wnioski

Wodny ekstrakt z róży damasceńskiej jest dobrym czynnikiem redukującym i stabilizującym, pozwalającym otrzymać stabilne i powierzchniowo sfunkcjonalizowane nanocząstki złota metodą ekologicznej, wydajnej i kontrolowanej syntezy. Otrzymane Au@RD NPs nie indukują cyto- i genotoksyczności w stosunku do komórek prawidłowych – limfocytów, jednocześnie wykazując selektywną cyto- i genotoksyczność względem dwóch badanych linii nowotworowych (rak płuca – A549 i białaczka, tj. HL60). Ponadto te hybrydowe nanomateriały są zdolne do indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych. Wstępne wyniki aktualnie prowadzonych badań wypadają bardzo obiecująco, jednak wymagają dalszego potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa stosowanych materiałów, tak wobec komórek prawidłowych, jak i nowotworowych.

Podziękowania

Badania były finansowane przez Fundusz Badań Naukowych Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, projekt badawczy 26/2018 „Synteza nanocząstek złota z wykorzystaniem polifenoli roślinnych jako potencjalnych związków o charakterze przeciwnowotworowym”.



Rycina 16. Piwonia chińska (*Paeonia lactiflora*).
Fot. Małgorzata Kalemba-Drożdż

ROZDZIAŁ 2.

RECEPTURA ZIOŁOWA LCS101 I JEJ ROLA W TERAPII ANTYNOWOTWOROWEJ

**Sylwia Łukasiewicz¹, Marta Dziejicka-Wasylewska²,
Agnieszka Cierniak³, Zoya Cohen⁴, Yair Maimon⁵**

¹ Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biochemii Fizycznej, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0002-6574-1147

² Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biochemii Fizycznej, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0001-6537-2954

³ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0001-6537-2954

⁴ Centrum Medyczne Sheba, Instytut Onkologii, Tel Aviv, Izrael. ORCID: 0000-0002-1284-3035

⁵ Centrum Medyczne Sheba, Instytut Onkologii, Tel Aviv, Izrael

DOI: 10.48269/978-83-66007-99-4-002

Streszczenie

Badania naukowe pokazują, że receptura ziołowa LCS101 stanowi obiecujący środek mogący znaleźć szerokie zastosowanie w leczeniu przeciwnowotworowym. Mieszanka ta, składająca się z 14 ziół dobranych w oparciu o zasady medycyny chińskiej, nie koliduje z lekami przeciwnowotworowymi i może być stosowana razem z radio- lub chemioterapią. Aktywność cytotoksyczną LCS101 wykazano dla różnych linii komórek nowotworowych. Jednocześnie formuła ta nie wykazuje podobnych właściwości w zdrowych komórkach. Ponadto LCS101 chroni komórki nienowotworowe przed śmiercią indukowaną przez chemioterapeutyki i równocześnie wzmacnia działanie przeciwnowotworowe chemioterapeutyku w komórce nowotworowej. W badaniach klinicznych leczenie LCS101 prowadziło do zmniejszenia częstości występowania leukopenii, neutropenii oraz anemii wywołanych chemioterapią. LCS101 wykazuje również właściwości immunomodulacyjne. W praktyce klinicznej stwierdzono, że receptura LCS101 jest bezpieczna i dobrze tolerowana przez pacjentów.

Słowa kluczowe: LCS101; medycyna integracyjna; nowotwory; terapia antynowotworowa

Abstract

The botanical compound LCS101 and its role in anticancer therapy

Studies show the botanical compound LCS101 as the promising agent for anticancer treatment. The LCS101 formula consists of 14 herbs prepared based on the principles of Chinese medicine. It does not interfere with anticancer agents and can be used along with radio- or chemotherapy. The cytotoxic activity of LCS101 has been shown for various cancer cell lines. In parallel the formula does not show similar properties in normal cells. Moreover, LCS101 protects non-tumor cells from death induced by chemotherapeutics and simultaneously enhances the anti-cancer effects of chemotherapeutics in cancer cells. In clinical studies, treatment with LCS101 led to a reduced incidence of chemotherapy-induced leukopenia, neutropenia and anemia. The LCS101 has also an immunomodulatory effect. In clinical practice LCS101 was found to be both safe and well-tolerated by patients.

Key words: LCS101; integrative medicine; cancer; anti-cancer therapy

Wprowadzenie

Z raportu Światowej Organizacji Zdrowia [WHO 2020] wynika, że ponad 15% wszystkich zgonów na świecie powodowanych jest przez nowotwory. Choroba nowotworowa będąca w swej naturze kompleksowym, wielokierunkowym zaburzeniem stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej nauki. Niestety, pomimo coraz większych funduszy przeznaczanych na walkę z tą chorobą, zapadalność na nią zwiększa się z roku na rok. Z czego może to wynikać? Z jednej strony wpływ na taką sytuację ma na pewno coraz częstsza i dokładniejsza diagnostyka prowadząca do zwiększenia wykrywalności zachorowań, jednocześnie przyczyniająca się do podniesienia statystyki zapadalności. Z drugiej jednak strony musimy pamiętać, że żyjemy w starzejącym się społeczeństwie, w warunkach nasilającego się zanieczyszczenia środowiska, a tryb życia – szczególnie w krajach wysokorozwiniętych – coraz bardziej przyspiesza. Wszystkie powyższe kwestie wzięte razem pod uwagę przyczyniają się do generowania coraz większego stresu, z którym wielokrotnie nie jesteśmy w stanie sobie dobrze radzić, co z kolei prowadzi do zaburzeń funkcjonowania organizmu na poziomie psychicznym, emocjonalnym oraz fizycznym, w konsekwencji powodując uaktywnienie procesów nowotworzenia.

Pomimo że wiedza dotycząca chorób nowotworowych jest z roku na rok coraz głębsza oraz pozwala na wdrażanie nowoczesnych terapii, często personalizowanych, to wciąż w wielu przypadkach pręźnie rozwijająca się onkologia pozostaje bezradna. Chociaż obecnie dostępnych jest

wiele nowatorskich metod terapeutycznych, to kluczowe techniki (chirurgia, radio- i chemioterapia) nadal pozostają niezmiennie. Zazwyczaj są to działania bardzo drogie, inwazyjne, które znacznie obniżają jakość życia pacjentów poprzez uciążliwe skutki uboczne, trudne do zniesienia zabiegi i konieczność powtarzania leczenia. Znaczące jest także obciążenie psychiczne towarzyszące chorym osobom. Niestety medycyna klasyczna, która sprawdza się świetnie w leczeniu chorób ostrych czy w nagłych wypadkach, w przypadku chorób przewlekłych czy nowotworowych często pozostaje bezradna. Pacjenci w takiej sytuacji nierzadko szukają pomocy wśród alternatywnych metod leczenia. Niestety równie często podejmują się prób samoleczenia, co może przynieść wręcz przeciwny efekt, bowiem łączenie ze sobą terapii w sposób niekontrolowany, bez należytej wiedzy nie zawsze prowadzi do osiągnięcia pożądanego celu. I tutaj pojawia się możliwość zastosowania medycyny integracyjnej stanowiącej połączenie pomiędzy medycyną klasyczną (zachodnią) a alternatywnymi sposobami leczenia o udowodnionej naukowo skuteczności, reprezentowanymi m.in. przez medycynę wschodnią, której przedstawicielem jest tradycyjna medycyna chińska (TCM, ang. *traditional Chinese medicine*). Choroba nowotworowa to dolegliwość systemowa, dlatego warto w jej leczeniu działać kompleksowo, zapewniając zindywidualizowane, holistyczne podejście do pacjenta.

W niniejszym rozdziale skupiono się na zaprezentowaniu mieszanki ziołowej LCS101 i jej roli w terapii antynowotworowej. Receptura ta składa się z suchych, sproszkowanych ekstraktów 14 ziół (*Astragalus membranaceus*, *Poria cocos*, *Atractylodes macrocephala*, *Lycium chinense*, *Ligustrum lucidum*, *Paeonia lactiflora* (rycina 16, s. 39), *Paeonia obovata*, *Citrus reticulata*, *Ophiopogon japonicus*, *Millettia reticulata*, *Oldenlandia diffusa*, *Scutellaria barbata*, *Prunella vulgaris*, *Glehnia littoralis*) dobranych zgodnie z zasadami medycyny chińskiej. Wszystkie wykorzystane w tej mieszance zioła są uważane za bezpieczne do spożycia i zostały wyprodukowane, importowane, przeanalizowane i certyfikowane zgodnie z przepisami izraelskiego Ministerstwa Zdrowia [Maimon i wsp. 2018]. Nie zakłócają one działania leków przeciwnowotworowych, co oznacza, że nie zmieniają ich farmakodynamiki ani farmakokinetyki oraz biodostępności [Maimon i wsp. 2018, Rachmut i wsp. 2013, Yaal-Hahoshen i wsp. 2011]. W badaniach naukowych pokazano wpływ receptury LCS101 na układ odpornościowy, wybiórcze działanie

przeciwnowotworowe i ochronne, a także bezpieczeństwo jej stosowania, szczególnie podczas konwencjonalnych zabiegów onkologicznych. Dlatego też preparat ten może być jednocześnie stosowany razem z radio- lub chemioterapią [Yaal-Hahoshen i wsp. 2011, Cohen i wsp. 2015, Samuels i wsp. 2013, Cohen i wsp. 2019].

LCS101 – efekt cytotoksyczny

Działanie przeciwnowotworowe zostało udowodnione dla 8 ziół wchodzących w skład receptury LCS101 (*Astragalus membranaceus*, *Atractylodes macrocephala*, *Citrus reticulata*, *Ligustrum lucidum*, *Oldenlandia diffusa*, *Paeonia lactiflora*, *Prunella vulgaris*, *Scutellaria barbata*) [Maimon i wsp. 2018, Cohen i wsp. 2015]. Badania naukowe *in vitro* obejmujące eksperymenty prowadzone przy wykorzystaniu kompletnej mieszanki LCS101 wskazują na jej aktywność przeciwnowotworową w liniach komórkowych stanowiących modele *in vitro* konkretnych nowotworów. Wykorzystując klasyczne testy pozwalające oszacować żywotność komórek, antynowotworowe działanie LCS101 obserwowano w liniach nowotworu piersi (MCF7, MDA-MB-231, MDA-453 i T47D) [Cohen i wsp. 2015, Maimon i wsp. 2010], jelita grubego (HCT116) i prostaty (PC-3, DU-145). Wykazano również, że cytotoksyczny efekt mieszanki LCS101 był wysoce selektywny i ograniczał się tylko do komórek zmienionych nowotworowo, pozostając bez wpływu na nienowotworowe, zdrowe komórki nabłonkowe piersi (MCF10A) oraz prostaty (EP#2) [Maimon i wsp. 2018, Rachmut i wsp. 2013]. W badaniach prowadzonych w Zakładzie Biochemii Fizycznej UJ zaobserwowaliśmy podobne efekty w liniach komórek HL60 – ostra białaczka promielocytowa, oraz A549 – ludzki gruczolakorak płuc (wyniki niepublikowane).

LCS101 – efekt protekcyjny

Kolejną niezwykle ważną cechą związaną ze stosowaniem mieszanki ziołowej LCS101 jest jej działanie protekcyjne. Okazuje się bowiem, że mieszanka ta używana wraz z chemioterapią chroni zdrowe komórki przed uszkodzeniem indukowanym chemioterapeutykami, jednocześnie wzmacniając efekty działania chemioterapeutyku w komórce

nowotworowej. Badania dotyczące powyższego aspektu opublikowano w 2015 roku [Cohen i wsp. 2015], a efekty obserwowano w liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz MCF7 będących modelem *in vitro* nowotworu piersi; kontrolę stanowiły nienowotworowe, zdrowe komórki pochodzące z gruczołu piersiowego – linia komórkowa MCF10A. Wyniki uzyskano w eksperymencie, w którym wyżej wymienione rodzaje komórek inkubowano z chemioterapeutykami, odpowiednio 5-fluorouracylem lub doksorubicyną, przy jednoczesnej obecności mieszanki ziołowej LCS101 lub jej braku. Cytotoksyczność oszacowano na podstawie testów żywotności komórek oraz badań mikroskopowych. Uzyskane wyniki potwierdzono w doświadczeniach przeprowadzonych przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej i wykazano brak indukowanej doksorubicyną apoptozy w nienowotworowych komórkach nabłonkowych MCF-10A przy równoczesnym stosowaniu LCS101, co jednoznacznie wskazuje na protekcyjne działanie formułacji. Jednocześnie, podobnie jak wyżej, w tym doświadczeniu udowodniono cytotoksyczne działanie mieszanki w liniach nowotworowych, a obserwowany efekt był wzmocniony w obecności obydwu preparatów (LCS101 wraz z doksorubicyną) w próbkach. Ponadto wykazano, że ekspozycja komórek nowotworowych na LCS101 indukuje w niektórych liniach proces apoptozy, choć w większości komórki umierały w procesie nekrozy, a cytotoksyczność indukowana przez LCS101 korelowała ze zmniejszonym poziomem polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1) [Cohen i wsp. 2015].

LCS101 – efekt immunomodulacyjny

Rola układu immunologicznego w patogenezie oraz terapii nowotworów jest ogromna i bardzo dobrze udokumentowana [Benítez-Bribiesca i wsp. 2001, Takanami i wsp. 2000, Imada i wsp. 2000]. W badaniach naukowych wykazano także immunomodulacyjne działanie poszczególnych składników receptury LCS101, które uważa się za istotne w terapii antynowotworowej. Podobne efekty zaobserwowano również w badaniach prowadzonych przy udziale kompleksowej mieszanki LCS101. *In vivo*, w modelu mysim, dorosłe osobniki szczepu *Balb/c* traktowane środkami chemioterapeutycznymi (doksorubicyną lub 5-fluorouracylem) eksponowano na działanie formułacji LCS101. Stwierdzono,

że mieszanka LCS101 zwiększa proliferację mysich limfocytów T śledziony, co zmierzono testem wbudowywania 3H-tymidyny. Ponadto obserwowano powrót – zmniejszonego w wyniku podania 5-fluorouracylu – poziomu IFN- γ do stanu sprzed podania chemioterapeutyków. W przypadku podań doksorubicyny poziom IFN- γ nie ulegał zmianie, natomiast po ekspozycji na LCS101 poziom ten znacząco wzrastał [Rachmut i wsp. 2013]. Należy zwrócić uwagę, że wytwarzanie IFN- γ jest indukowane przez komórki T, komórki NK oraz makrofagi i odgrywa istotną rolę w hamowaniu wzrostu guza, promowaniu odpowiedzi immunologicznej Th1 i różnicowaniu cytotoksycznych komórek NK i T. Myszy pozbawione IFN- γ nie są w stanie utrzymać homeostazy w tkankach, co skutkuje przewlekłym stanem zapalnym oraz koreluje ze zwiększoną częstością występowania nowotworów hematologicznych i guzów litych [Enzler i wsp. 2003].

W badaniach *ex vivo* próbki krwi pobrane od zdrowych ochotników poddano działaniu mieszanki LCS101 (kontrolę pozytywną stanowiły próbki inkubowane z IL-2). Po 24 godzinach ekspozycji na LCS101 wykazano zależny od stosowanej dawki wzrost poziomu aktywowanych komórek NK (oszacowany na podstawie ekspresji markera aktywacji CD69 na populacji komórek NK) do 18% (dawka 200 $\mu\text{g/ml}$), w odniesieniu do 12% uzyskanych dla kontroli pozytywnej oraz 2% dla próbek niestymulowanych [Rachmut i wsp. 2013].

W badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach RAW264.7 (ang. *mouse murine macrophage cell line*) wykazano ponad 100-krotny wzrost sekrecji TNF- α w następstwie ekspozycji na mieszankę LCS101 [Rachmut i wsp. 2013]. TNF- α , będąc silną cytokiną przeciwnowotworową, wzmacnia aktywność makrofagów, komórek NK i cytotoksycznych komórek T [Sabel i wsp. 2007]. Badania na komórkach RAW264.7 prowadzono również w naszym laboratorium, gdzie wykazano aktywację wspomnianych komórek w następstwie ekspozycji na mieszankę LCS101. Ponadto, podobnie jak opisano wyżej, zaobserwowano wzrost sekrecji TNF- α , a także inhibitora czynnika NF κ B. Nie obserwowano natomiast różnic w ekspresji IL-6. Dodatkowo wykazano wpływ LCS101 na aktywność fagocytarną badanych komórek. Wyniki powyższych badań są aktualnie zebrane w postaci publikacji i oczekują na recenzję (stan na kwiecień 2022 roku).

LCS101 – badania kliniczne

Toksyczność hematologiczna wywołana chemioterapią jest częstym i istotnym powikłaniem obserwowanym w trakcie leczenia choroby nowotworowej, prowadzącym do ograniczenia częstotliwości oraz intensywności terapii. Niestety konwencjonalne leczenie nastawione jest głównie na usuwanie skutków wspomnianej toksyczności niż na zapobieganie jej powstawaniu. W badaniach klinicznych przeprowadzonych pośród pacjentek chorujących na nowotwór piersi poddawanych chemioterapii i jednocześnie przyjmujących mieszankę LCS101 zaobserwowano znacznie mniejszą częstość rozwoju ciężkiej leukopenii czy neutropenii niż w grupie kontrolnej. Anemia również była mniej powszechna w grupie leczonej LCS101. Co więcej, mieszanka była dobrze tolerowana przez pacjentów i nie zaobserwowano żadnych związanych z nią działań niepożądanych [Yaal-Hahoshen i wsp. 2011].

Wnioski

Wydajna terapia antynowotworowa stanowi spore wyzwanie w dzisiejszym świecie. Biorąc pod uwagę złożoność zaburzenia jakim jest choroba nowotworowa warto poszukiwać rozmaitych rozwiązań, które mogą wspomagać proces powrotu do zdrowia pacjentów cierpiących na schorzenia onkologiczne. Choć dokładny mechanizm działania LCS101 nie został precyzyjnie wyjaśniony, można przypuszczać, że mieszanka ziołowa LCS101 stanowi bardzo obiecującą formułację mogącą znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.



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 PRZECIWIUTLENIAJĄCE 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 dzikie owoce, kwiaty i jadalne pospolite rośliny dzikorosnące 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 wyciszenie 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, odwary 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*), mięętę 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 rozpierzchła (*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 z 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, Śtornik 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 zamkniętych, ale niezamkniętych szklanych butelkach i mieszano dwa razy dziennie przez 4 tygodnie. Po zakończeniu fermentacji octowej ocet został zwirowany i zdekantowany z 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 z nad osadu roślinnego. Maceraty przygotowano 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*), koniczyna czerwona (koniczyna łąkowa, *Trifolium pratense*), liliowiec ogrodowy (*Helianthus 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 perennis*), 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*), bluszcz 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 oznaczenia 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%. Próbki 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 gradencie 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. próbki 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 $\text{dm}^3/\text{mol} \times \text{cm}$;
- 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 wcześniej 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:

$$\begin{aligned} &(\text{stosunek A/B}) 20:80\%, t = 0-20 \text{ min}; 30:70\%, t = 35 \text{ min}; 60:40\%, \\ &t = 60 \text{ min}; 100:0\%, t = 70-75 \text{ min}; 20:80\%, t = 80-90 \text{ min}. \end{aligned}$$

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 fenyllooctowy; kwas 3,4-dihydroksyfenyllooctowy; kwas 3-hydroksyfenyllooctowy; 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 fenylpropanoidowymi: 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-robinozyd-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-rutynozyd kwercetyny); 7-O-neohesperozyd naryngeniny; 7-O-rutynozyd 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.

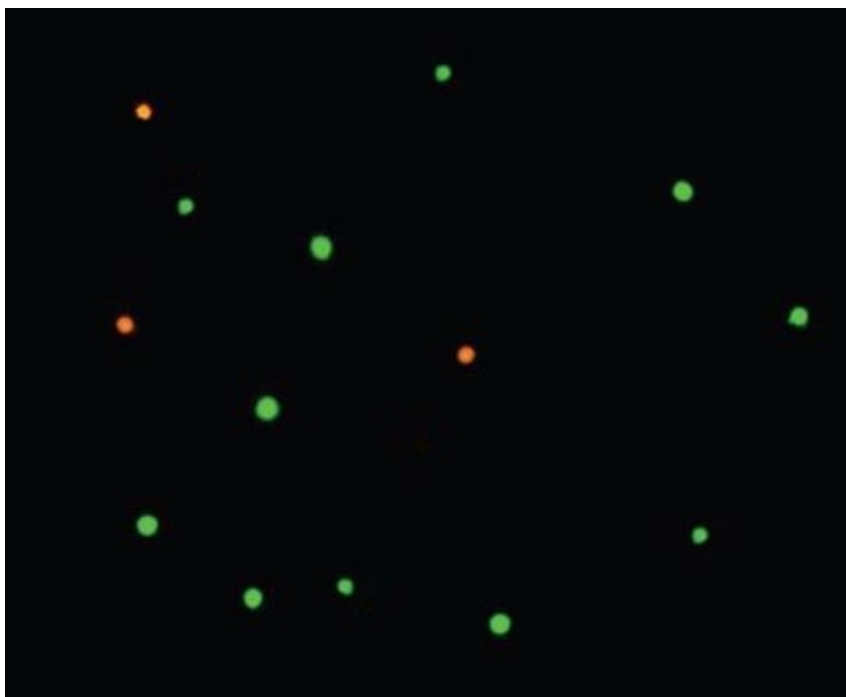
Zawartość karotenoidów

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. Próbki 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 płytkach; 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+} .



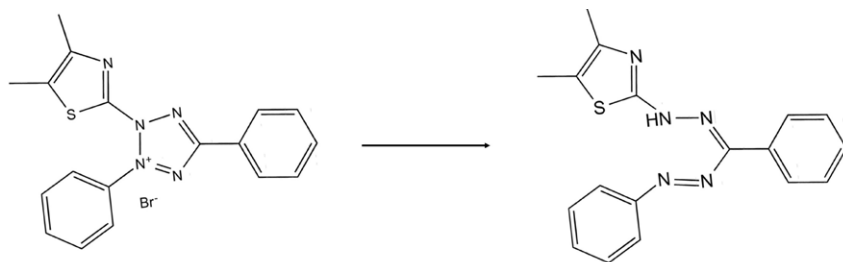
Rycina 18. Obraz mikroskopowy badania żywotności limfocytów w metodzie fluorescencyjnego barwienia różnicowego. Komórki aktywne metabolicznie wykazują zieloną fluorescencję, komórki martwe – czerwoną

Próbki zmieszano z FDA/EtBr w proporcji 1:1 i umieszczono na szkiełkach mikroskopowych. Komórki aktywne metabolicznie są zdolne do hydrolizy dwuocianu fluoresceiny do fluoresceiny przez co wykazują zieloną fluorescencję, podczas gdy utrata integralności błony umożliwia wnikanie bromku etydyny 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-dołkowych 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.

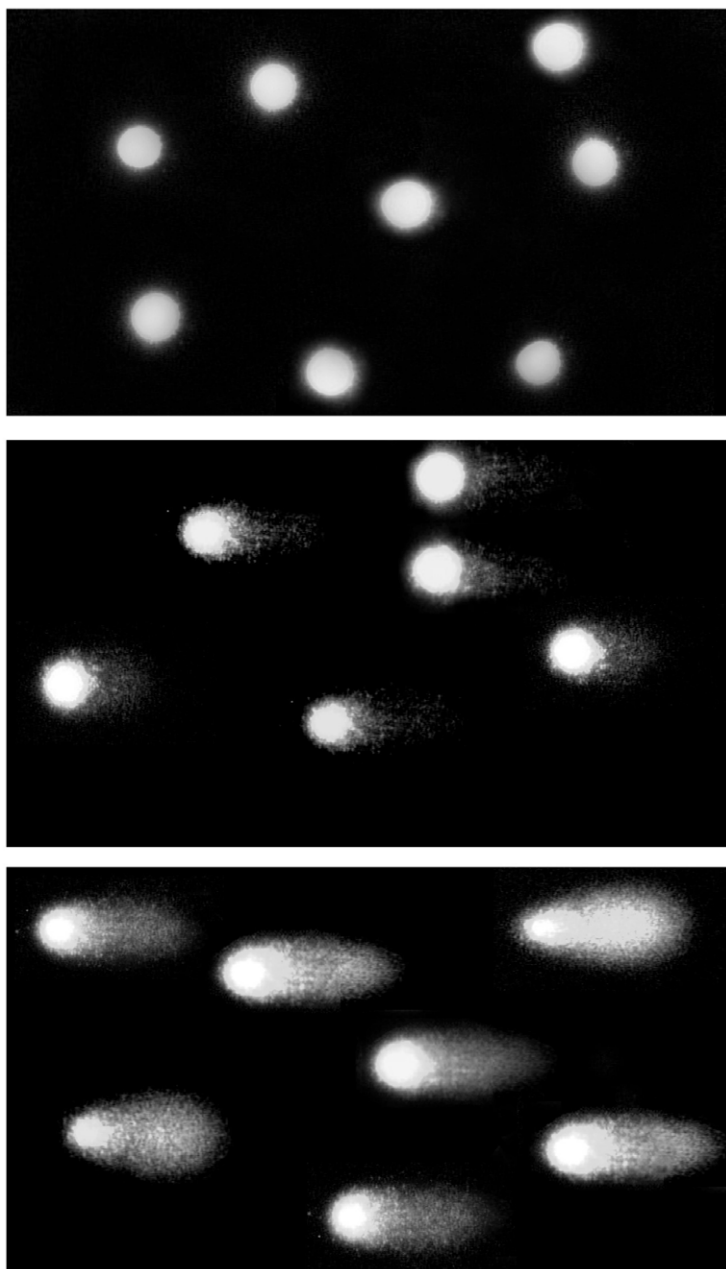


Rycina 19. Redukcja MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu) do formazanu ((E,Z)-5-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-1,3-difenyloformazan)

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 nadtlenkiem 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, $\text{pH} = 10$) w 4°C na 1 godzinę. Następnie preparaty płukano trzykrotnie w 0,4 M Tris ($\text{pH} = 7,4$) i układano w aparacie do elektroforezy wypełnionym świeżym, zimnym buforem elektroforetycznym (300 mM NaOH, 1 mM EDTA). Preparaty przebywały w tym alkalicznym buforze ($\text{pH} > 13$) 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 ($\text{pH} = 7,4$).



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

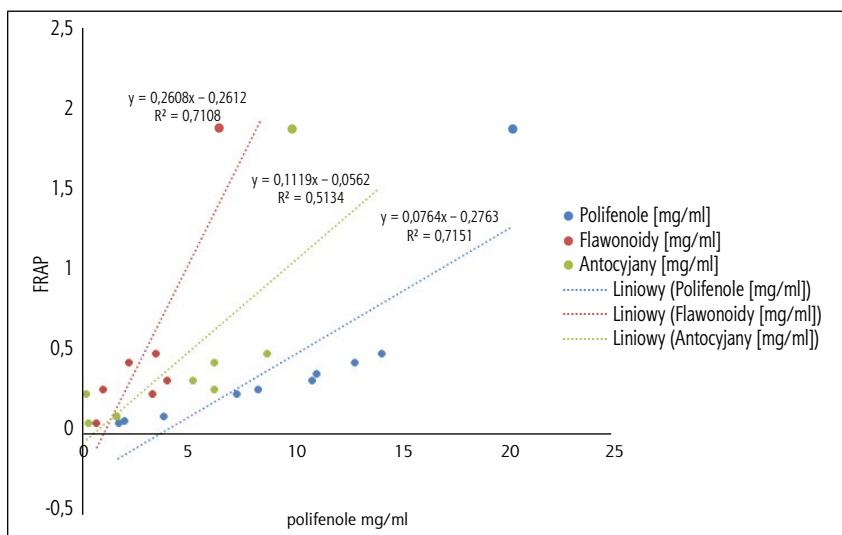
Sok z owoców	Polifenole ± odch. st. [mg/ml]	Flawonoidy ± odch. st. [mg/ml]	Antocyjany ± odch. st. [mg/ml]	Witamina C ± odch. st. [mg/100ml]	FRAP ± odch. st. [mM Fe ²⁺]
żurawina błotna <i>Vaccinium oxycoccos</i>	1,71 ± 0,06	0,69 ± 0,21	0,29 ± 0,02	9,2 ± 0,4	7,1 ± 0,1
malina właściwa <i>Rubus idaeus</i>	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

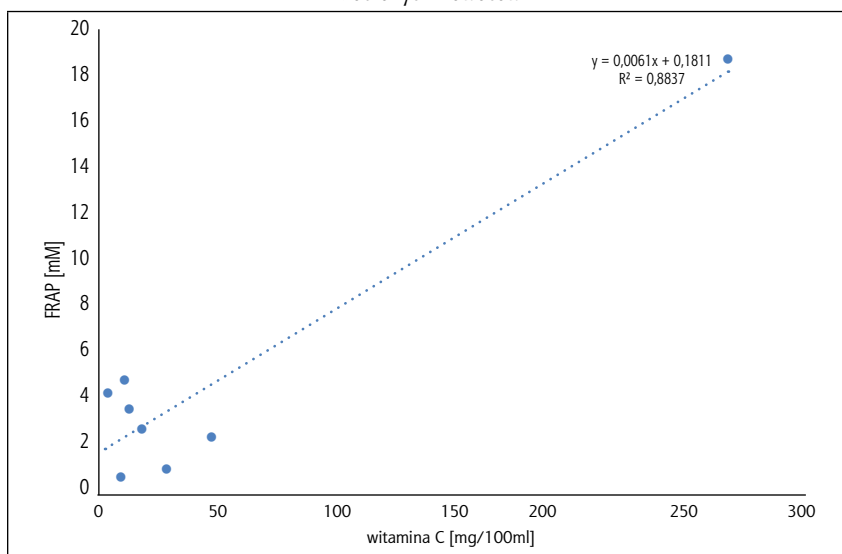
Stwierdzono występowanie dodatniej korelacji między aktywnością przeciwutleniającą soków owocowych a całkowitą zawartością związków fenolowych ($y = 0,0764x - 0,2763$; $R^2 = 0,7151$; $p = 0,004$). Odstający punkt reprezentuje wynik uzyskany dla soku z owoców róży, który wykazał znacznie wyższe zdolności 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

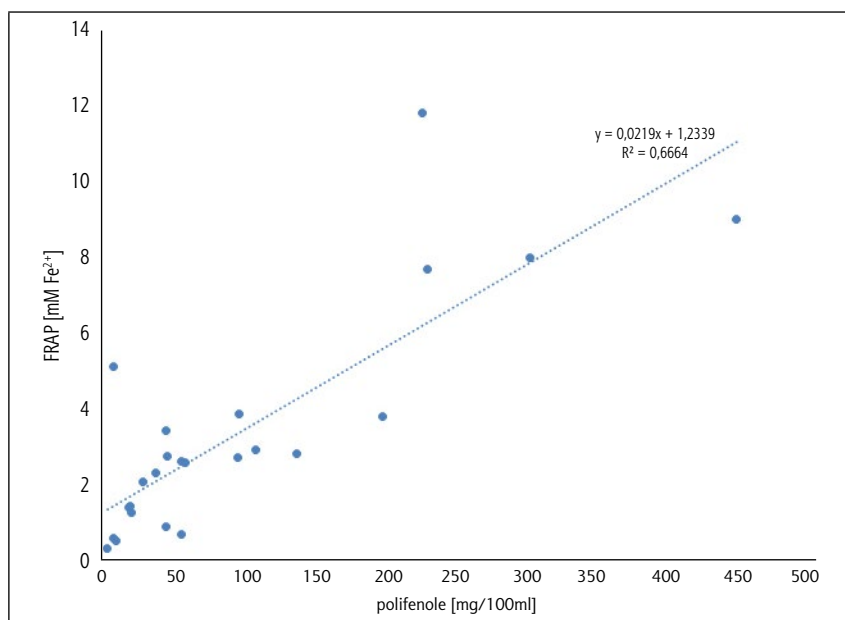
W badanych ekstraktach obecne były jedynie śladowe ilości karotenoidów. Fermentowane octy miały nieco wyższe pH niż maceraty octowe, ale różnica nie była znacząca (tabela 2). Zaobserwowano, że wszystkie ekstrakty z owoców dzikiej róży miały najwyższe stężenie polifenoli. Ekstrakty z płatków róży i nalewka 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 chabra bławatka, liliowców, lawendy, niebieskich fiołków rogatych, mniszka, wrzosu, nasturcji, dzikiego bzu, aksamitki, pysznogłówek, koniczyny 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

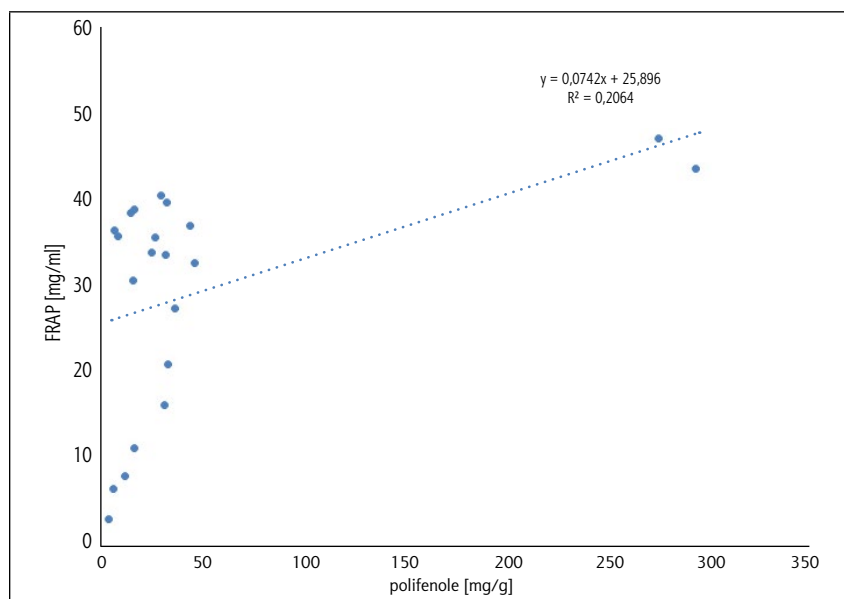
1-procentowe ekstrakty wodno-alkoholowe z suszonych kwiatów	Polifenole [mg/g]	Karotenoidy [ug/ml]	FRAP eq wit. C [mg/ml]
malwa różowa <i>Alcea rosea</i>	5,0 ± 1,7	54,3 ± 8,0	3,3 ± 0,16
ketmia szczawiowa <i>Hibiscus sabdariffa</i>	7,0 ± 1,2	9,4 ± 1,4	6,8 ± 0,40
rumianek pospolity <i>Matricaria chamomilla</i>	12,5 ± 1,6	130,1 ± 19,2	8,2 ± 1,00
słonecznik zwyczajny <i>Heliantus 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 [µg/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

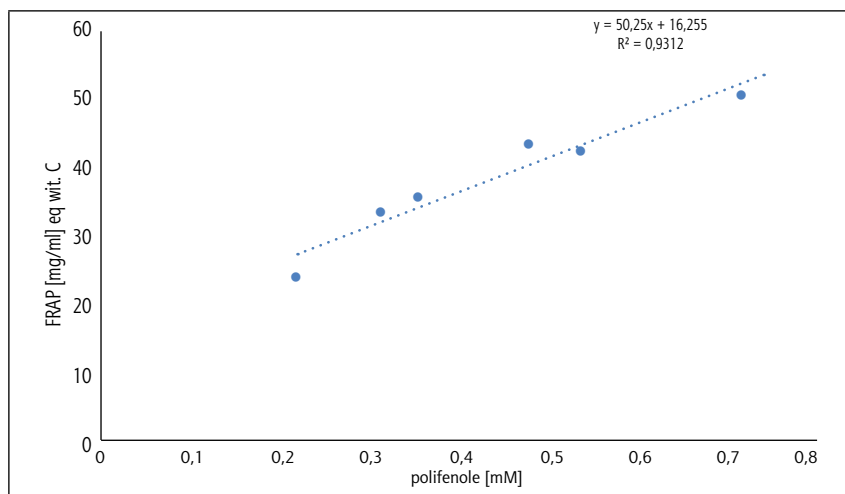
Ekstrakty z liści dzikich roślin jadalnych

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
bluszczyk 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]

roślina	ekstrakt	Kwasy fenolowe [mg/100ml]														suma kwasów fenolowych		
		kwas chlorogenowy	kwas cynamonowy	kwas kawowy	kwas elagowy	kwas fenolowy	kwas izofenolowy	kwas galusowy	kwas p-hydroksybenzoesowy	kwas p-kumarynowy	kwas protokatechinowy	kwas rozmarynowy	kwas wanilinowy					
skórki jabłka	ocet	0,63 ± 0,00								0,24 ± 0,02								1,21 ± 0,11
<i>Malus domestica</i>	macerat	0,77 ± 0,29								0,26 ± 0,03								1,40 ± 0,03
	nalewka	2,08 ± 0,13								0,10 ± 0,01								2,32 ± 0,11
	odwar	0,82 ± 0,01								0,34 ± 0,03								1,55 ± 0,03
owoce maliny	ocet				2,11 ± 0,07										0,48 ± 0,07			2,59 ± 0,08
<i>Rubus idaeus</i>	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	ocet	0,38 ± 0,02								3,09 ± 0,02								3,47 ± 0,02
<i>Rosa canina</i>	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	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
<i>Mentha piperita</i>	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	ocet			5,08 ± 0,22					2,63 ± 0,12	1,85 ± 0,01							3,66 ± 0,12	13,22 ± 0,23
<i>Lavanda angustifolia</i>	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	ocet													1,27 ± 0,02				1,27 ± 0,02
<i>Rosa rugosa</i>	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	catechina	epikatechina	kempferol	3-o-galaktozyd kempferol	3-o-glukozyd kempferol	7-ramnozyd kempferol	luteolina	izkwercetyna	kwercetyna	3-o-arabinoofuran- zyd/kwercetyna	3-o-glukuronid kwercetyna	3-o-ramnozyd kwercetyna	7-o-glukozyd kwercetyna	kwercytyna	lutozyd	suma flawonoidów
skórki	ocet			7,80 ± 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			8,99 ± 0,28						0,54 ± 0,01	1,93 ± 0,11	3,69 ± 0,31	8,51 ± 0,15	12,86 ± 0,55			2,91 ± 0,14	39,46 ± 0,73
<i>Malus</i>	nalewka			13,28 ± 0,45						1,69 ± 0,04	1,68 ± 0,02	7,57 ± 0,02	19,85 ± 0,65	21,28 ± 2,48			5,70 ± 0,28	71,02 ± 2,62
<i>domestica</i>	odwar			9,49 ± 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
maliny	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
<i>Rubus</i>	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
<i>idzeus</i>	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
róży	macerat		12,04 ± 1,04							1,29 ± 0,01						4,37 ± 0,02	0,77 ± 0,04	18,47 ± 1,04
<i>Rosa</i>	nalewka		58,90 ± 0,69							1,46 ± 0,05						3,52 ± 0,06	5,83 ± 0,08	69,71 ± 0,90
<i>canina</i>	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
<i>Mentha</i>	nalewka	5,17 ± 0,18	0,60 ± 0,03														0,23 ± 0,01	5,99 ± 0,20
<i>pipperita</i>	odwar	2,45 ± 0,12	1,98 ± 0,20															4,43 ± 0,20
kwiaty	ocet									0,29 ± 0,08								0,29 ± 0,08
lawendy	macerat									0,57 ± 0,02								0,57 ± 0,02
<i>Lavanda</i>	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
<i>angustifolia</i>	odwar									0,92 ± 0,01							1,56 ± 0,03	2,49 ± 0,03
płatki	ocet			7,03 ± 0,05	3,06 ± 0,02			2,99 ± 0,09										18,22 ± 0,36
róży	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
<i>Rosa</i>	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
<i>rugosa</i>	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

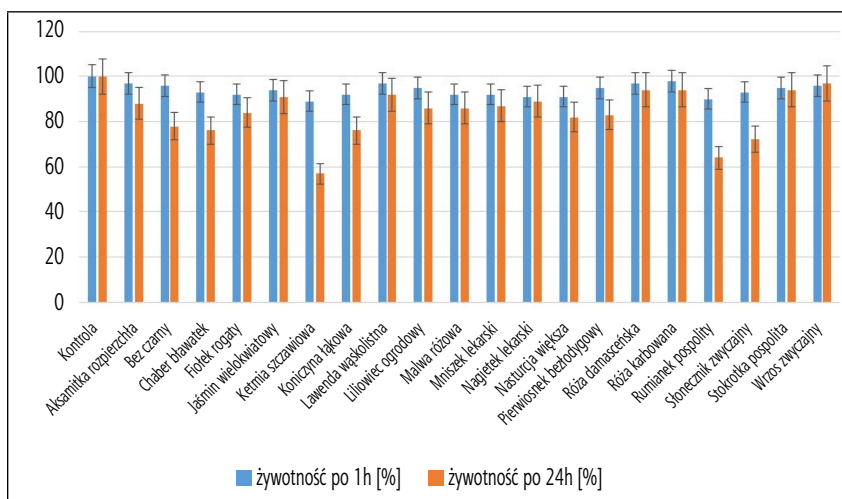
Tabela 6. Żywotność limfocytów od zdrowych dawców po inkubacji z sokami owocowymi przez 1 i 24 godziny

	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

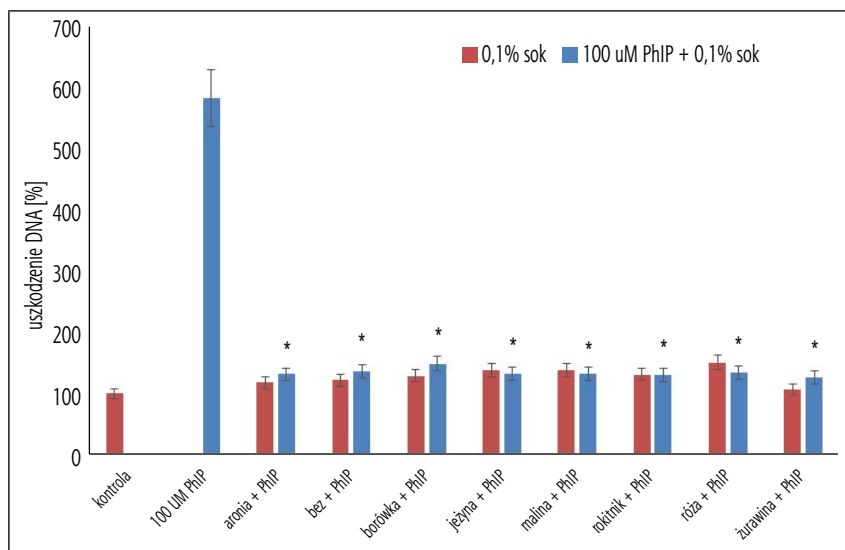
Poddanie limfocytów od zdrowego dawcy działaniu 1-procentowych ekstraktów z liści dzikich roślin jadalnych wykazało, że ekstrakty te nie działały cytotoksycznie po 1 i 24 godzinach inkubacji (tabela 8).

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

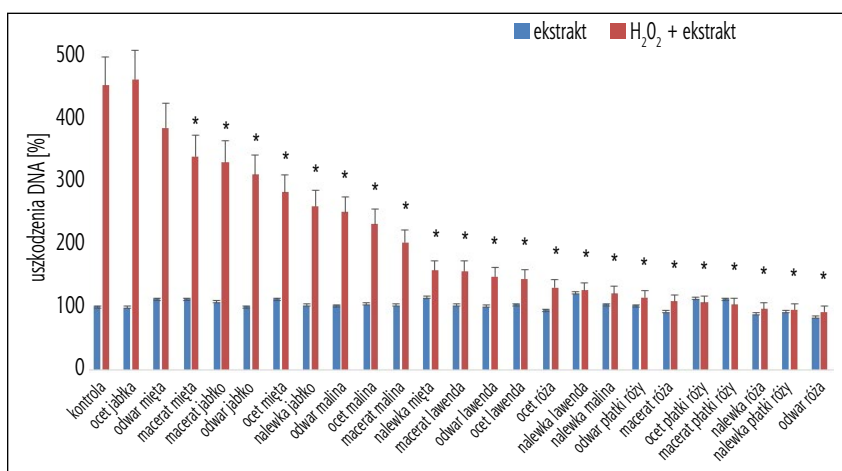
Stwierdzono, że PhIP indukuje uszkodzenie DNA w sposób zależny od dawki ($y = 37,134x + 29,62$; $R^2 = 0,99$). Przy wyższych stężeniach 75 i 100 μM zaobserwowano najsilniejszy potencjał PhIP do indukowania pęknięć nici DNA. W oparciu o te wyniki przeprowadzono dalsze eksperymenty przy użyciu PhIP w stężeniu 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 eksponowanymi 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).

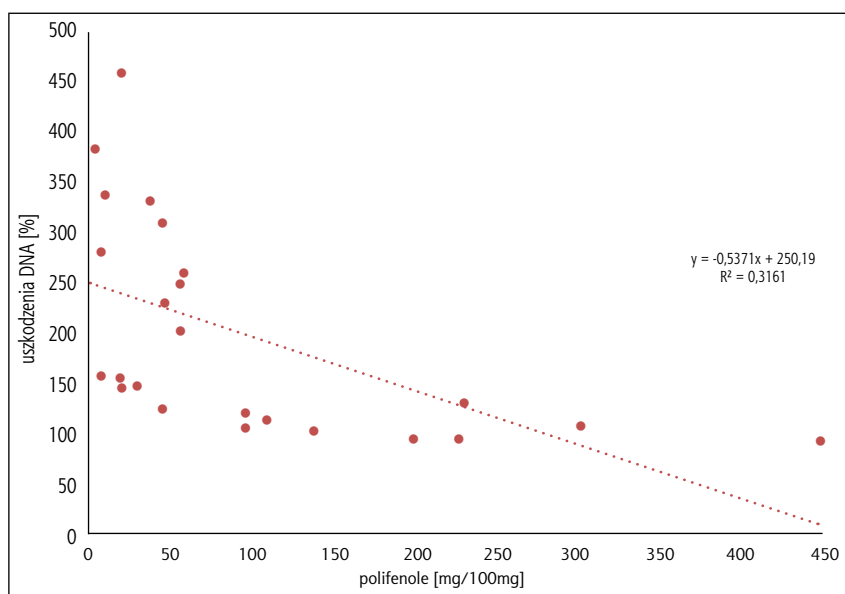


Rycina 28. Uszkodzenia DNA w limfocytach mierzone testem kometowym po ekspozycji na analizowane ekstrakty przez 1 godzinę (słupki niebieskie). Uszkodzenia oksydacyjne DNA indukowano przez inkubację komórek w 25 μM H₂O₂ (słupki pomarańczowe). Wyniki testu kometowego wyrażono jako TDC i przedstawiono jako % 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

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

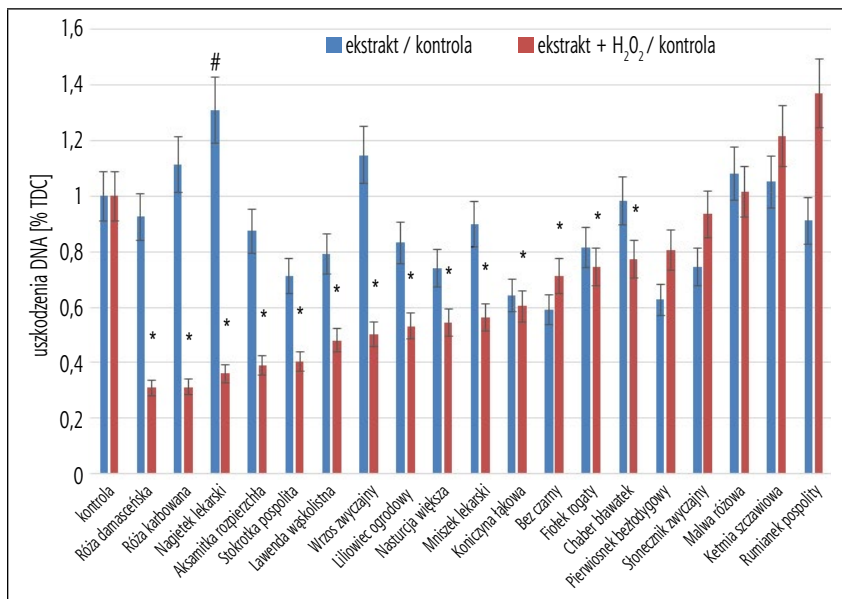
Ochronne działanie ekstraktów owocowych i ziołowych było skorelowane z mocą antyoksydacyjną ($y = -20,513x + 266,93$; $R^2 = 0,3314$; $p = 0,02$) oraz ze stężeniem polifenoli (rycina 29) ($y = -0,5371x + 250,19$; $R^2 = 0,3161$; $p = 0,034$). Najwyższe właściwości ochronne wykazywały nalewki, a najmniejsze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



Rycina 29. Zależność między zdolnościami genoprotekcyjnymi ekstraktów ziołowych i owocowych a stężeniem związków polifenolowych. Limfocyty ekspozycjonowano na analizowane ekstrakty przez 1 godzinę. Uszkodzenie oksydacyjne DNA indukowano przez inkubację komórek w $25 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 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 $p = 0,0004$).

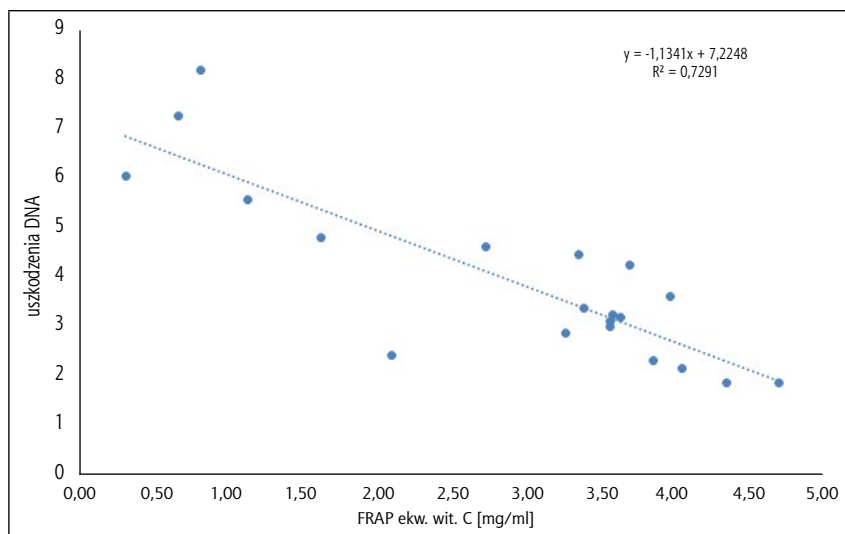


Rycina 30. Poziom uszkodzeń DNA w limfocytach mierzony metodą kometową. Komórki inkubowano w 1-procentowych ekstraktach wodno-alkoholowych z jadalnych kwiatów rozcieńczonych 100-krotnie w medium hodowlanym. Oksydacyjne uszkodzenia DNA indukowano przez inkubację komórek z $25 \mu\text{M}$ nadtlaniem wodoru przez 5 min. Wyniki przedstawiono jako % zawartości TDC w odniesieniu do komórek kontrolnych. Wyniki zostały uszeregowane pod względem malejących właściwości ochronnych przeciwko indukowanemu uszkodzeniu 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

Spśród kwiatowych ekstraktów największe właściwości ochronne przeciwko endogennym (nieindukowanym) uszkodzeniom DNA obserwowano 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 koniczyny ($p = 0,018$), czarnego bzu ($p = 0,004$), granatowego fiołka rogatego

($p = 0,016$), chabra ($p = 0,032$) 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 eksponowanych 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, Bhave 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 [Bhave 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 [Elmastaş i wsp. 2017, Murathan i wsp. 2016, Bhave 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, Cunja 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-nitrozodietylaminy 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, Cunja 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 [Cunja 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-Barrío 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 redukcyjną a zawartością polifenoli, co sugeruje, że obecność karotenoidów, najprawdopodobniej luteiny, może być odpowiedzialna za ten wynik [Park i wsp. 2017].

Przypadek wrzosu, 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 przekaźnictwa 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 zmiękzczać 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 przeciwutleniające, 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 zjadamy, 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.



Rycina 32. Liście kapusty właściwej (*Brassica rapa*) poddane fermentacji mlekowej.

Fot. Małgorzata Kalemba-Drożdż

ROZDZIAŁ 4.

KWASY FENOLOWE I FLAWONOIDY W KISZONKACH WARZYWNYCH

Patryk Zdziobek¹, Grzegorz Jodłowski²

¹ Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Wydział Energetyki i Paliw, Katedra Technologii Paliw, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0001-7578-555X

² Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Wydział Energetyki i Paliw, Katedra Technologii Paliw, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0001-7220-887X

DOI: 10.48269/978-83-66007-99-4-004

Streszczenie

Kiszenie rozumiane jako fermentacja mlekowa konserwuje żywność, ale jest też sposobem na zachowanie polifenoli, a nawet na zwiększenie ich stężenia lub ich dekompozycję. Wysoka zawartość związków polifenolowych w diecie zmniejsza stres oksydacyjny i wspomaga organizm w utrzymaniu równowagi mikrobioty wzmacniając system immunologiczny, może też wspomagać terapie przeciwko wielu chorobom, m.in.: nadciśnieniu, cukrzycy, osteoporozie, zakażeniom bakteryjnym i wirusowym, np. Covid-19. Rozdział zawiera przegląd prozdrowotnych właściwości polifenoli, przedstawia sposoby ich pozyskiwania oraz prezentuje wybrane naturalne źródła polifenoli dostępne w europejskiej, umiarkowanej strefie klimatycznej w postaci surowej i po kiszeniu.

Słowa kluczowe: polifenole; kwasy fenolowe; flawonoidy; Covid-19; kiszonki; fermentacja

Abstract

Phenolic acids and flavanoids in lactofermented vegetable

Lactic acid fermentation preserves food but it is also a way to preserve polyphenols, and even increase their concentration or their decomposition. The high content of polyphenols in the diet reduces oxidative stress and supports the body in maintaining balance with the microflora, strengthening the immune system and supporting therapies against many diseases (hypertension, diabetes, osteoporosis, bacterial and viral infections, even Covid-19). The article provides an overview of the health-promoting

properties of polyphenols, presents the methods of obtaining them and presents selected natural sources of polyphenols available in the European temperate climate zone in raw form and after pickling.

Key words: polyphenols; phenolic acids; flavonoids; Covid-19; pickles; fermentation

Wprowadzenie

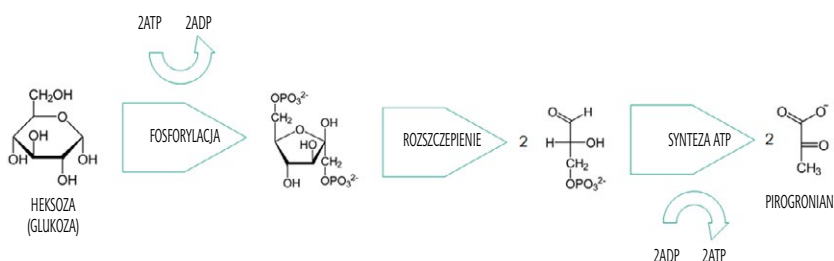
Wśród polifenoli obecnych w kiszonych sokach warzywnych można wyróżnić kwasy fenolowe i flawonoidy. Do najczęściej występujących kwasów fenolowych zaliczamy kwasy: protokatechowy, kawowy, synapinowy, ferulowy i *p*-kumarowy. Wśród najczęściej spotykanych flawonoidów w sfermentowanych sokach warzywnych znajdują się: rutyna, epikatechina, luteolina i kwercetyna [Ciska i wsp. 2005, Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013]. Posiadają one znaczący potencjał przeciwutleniający chroniąc tym samym komórki przed stresem oksydacyjnym i apoptozą. Obecność polifenoli pomaga utrzymać homeostazę oksydacyjno-redukcyjną komórek równoważąc procesy związane z obecnością reaktywnych form tlenu [Scalbert i wsp. 2005].

Celem przeglądu jest wprowadzenie do zagadnienia zwiększania zawartości antyutleniaczy, jak polifenole i flawonoidy, na drodze fermentacji mlekowej jarzyn oraz warzyw, aby wykorzystać je następnie w celach prozdrowotnych.

Proces fermentacji mlekowej zachodzący w trakcie kiszenia warzyw może przebiegać na różne sposoby. W czasie heterofermentacji z cząsteczki glukozy powstaje kwas mlekowy, etanol i ditlenek węgla. Bakterie biorące udział w tej fermentacji, jak np. *Lactobacillus bifermentans*, należą do względnych lub bezwzględnych anaerobów, które preferują wzrost w niższych temperaturach (5–22°C) i przy niższym stężeniu chlorku sodu. Z kolei produktem działania bakterii homofermentatywnych jest tylko kwas mlekowy. Do tej grupy bakterii należą m.in. *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, które najskuteczniej prowadzą produkcję kwasu mlekowego w temperaturach wyższych (30–35°C) i wykazują tolerancję na wyższe stężenie chlorku sodu. W trakcie fermentacji prowadzonej przez bifidobakterie powstaje kwas mlekowy i kwas octowy, a bakterie uzyskują więcej energii niż w procesach homo- i heterofermentacji, jednak bifidobakterie nie występują w kiszonych warzywnych [Oliveira i wsp. 2017]. W kiszeniu w warunkach

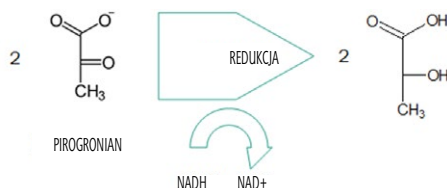
domowych zwykle wykorzystuje się dzikie szczepy mikroorganizmów, podczas gdy przy fermentacji na skalę przemysłową często wykorzystuje się wyselekcjonowane kultury starterowe.

Mechanizm homofermentacji mlekowej przedstawia się następująco: w warunkach anaerobowych bakterie kwasu mlekowego przetwarzają heksozy do kwasu mlekowego zgodnie ze szlakiem Embdena-Meyerhofa-Parnasa (glikoliza EMP). W kolejnych przemianach 1 mol glukozy jest fosforylowany z pośredniczącą izomeryzacją, w wyniku czego dochodzi do rozszczepienia fruktozo-1,6-bisfosforanu, by po transformacji, utlenieniu i syntezie 2 moli ATP uzyskać 2 mole pirogronianu (rycina 33).



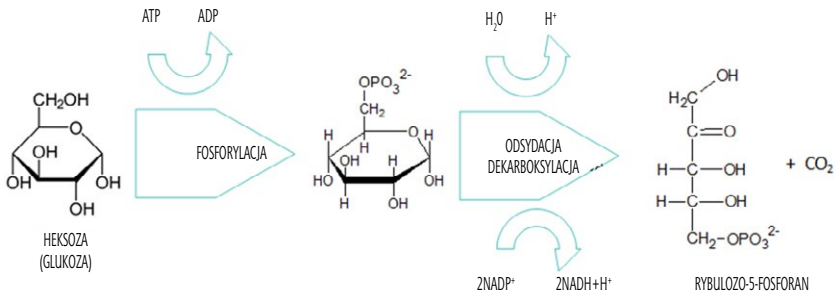
Rycina 33. Szlak Embdena-Meyerhofa-Parnasa – schemat uproszczony, opracowanie na podstawie [Ratajczak i Piotrowska-Cyplik 2017]

W następnym kroku przy jednoczesnym utlenieniu NADH oraz redukcji pirogronianu (warunki beztlenowe) uzyskuje się kwas mlekowy (rycina 34) [Ratajczak i Piotrowska-Cyplik 2017].



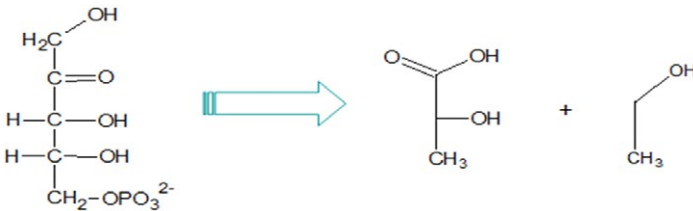
Rycina 34. Redukcja pirogronianu do kwasu mlekowego

Heterofermentacja heksoz przebiega zgodnie ze szlakiem pentozofosforanowym. Z 1 mola glukozy powstaje 1 mol rybulozo-5-fosforanu i 1 mol dwutlenku węgla już w fazie oksydacyjnej (rycina 35).



Rycina 35. Szlak pentozofosforanowy – faza I oksydacyjna, schemat uproszczony

Natomiast w fazie nieoksydacyjnej, w wyniku wieloetapowego procesu, rybulozo-5-fosforan jest transformowany przez enzymy: transaldolazę lub transketolazę, do krótszych węglowodoro-fosforanów, które po glikolizie przechodzą w 1 mol kwasu mlekowego i 1 mol etanolu. Możliwy jest także inny produkt uboczny – kwas octowy (rycina 36).



Rycina 36. Szlak pentozofosforanowy – faza II nieoksydacyjna, schemat uproszczony

Bakterie fermentacji mlekowej poprzez zakwaszenie środowiska hamują rozwój bakterii gnilnych i pleśni, co pozwala zachować w żywności witaminy i makroelementy. Witaminy występujące w kiszonych sfermentowanych sokach to m.in.: prowitamina A, witaminy C, K i witaminy z grupy B. Natomiast wśród makroelementów można wyróżnić: wapń, żelazo i potas. Niedobory składników odżywczych zarówno u osób młodych, jak i u osób w podeszłym wieku mogą przysporzyć wielu problemów zdrowotnych, zatem spożywanie kiszzonek może mieć pozytywny wpływ na organizm człowieka [Steinkraus 1998, Garcia i wsp. 2020]. Obecne w surowych sfermentowanych sokach bakterie kwasu mlekowego przyczyniają się do uzupełnienia mikrobioty przewodu pokarmowego.

Dodatkowo regularne spożywanie kiszonych sfermentowanych warzyw pozwala usuwać z organizmu metale ciężkie. Nadmiar cynku i żelaza w organizmie może przyczynić się do zachorowania na chorobę Alzheimera i Parkinsona. Prawdopodobnie kiszone soki chelatuja metale ciężkie, co może obniżyć ryzyko pojawienia się tych chorób [Hegde i wsp. 2009], co jest wskazówką, by w celach prewencyjnych spożywać kiszonki od młodości. Należy jednak pamiętać, że surowce roślinne same mogą być zanieczyszczone metalami ciężkimi, jeśli rośliny były uprawiane na terenach zanieczyszczonych przemysłowo.

Wiele osób starszych, szczególnie tych przebywających w placówkach opiekuńczych i szpitalach, przyjmuje posiłki o często niskiej wartości odżywczej [NIK 2018]. Z tego powodu potrzebna jest zmiana polityki żywienia tych osób, aby zapewnić im odpowiednią podaż witamin i minerałów oraz fitozwiązków o znanej wartości odżywczej i wysokim potencjalnie antyoksydacyjnym. Profesjonalnie przygotowane posiłki powinny być monitorowane przez dietetyków, którzy mogą pomóc w zredukowaniu niedoborów spowodowanych nieporadnością życiową i przyjmowaniem pokarmu niskiej jakości. Posiłki oferowane przez firmy cateringowe mogłyby stać się częścią rozwiązania problemu złego odżywiania u osób starszych, a nie być postrzegane jako jego część. Fermentowane soki warzywne stanowią postbiotyki, który wprowadza pożądane dla mikrobioty układu pokarmowego związki bioaktywne będące metabolitami bakterii kwasu mlekowego, zatem mogą stanowić cenny element diety oferowanej osobom starszym, pensjonariuszom domów opieki i pacjentom szpitali.

Dodatkowo w trakcie trwającej pandemii Covid-19 spożycie probiotyków (żywych kultur bakterii mlekowych), prebiotyków i postbiotyków wśród osób starszych powinno być pod wzmożoną kontrolą, ponieważ są one powszechnie stosowane w stymulacji zdrowia jelit, które mogą wzmacniać wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną. Ponadto biegunki i zapalenie jelit są częstymi objawami powikłań po zakażeniu wirusem SARS-CoV-2. Pomimo braku informacji klinicznych na temat przyjmowania preparatów zawierających bakterie kwasu mlekowego w trakcie trwającej pandemii koronawirusa, dbałość o mikrobiotę jelitową może być istotna dla zwiększenia odporności osób w podeszłym wieku [Garcia i wsp. 2020, Hoffmann 2017, Akatsu 2021].

Właściwości prozdrowotne flawonoidów i kwasów fenolowych

Od wieków fermentacja mlekowa, czyli kiszenie, stosowana jest w celu konserwacji żywności i zabezpieczenia jej przed bakteriami gnilnymi. Kiszonki warzyw i owoców przetwarzane z surowych materiałów w trakcie fermentacji mlekowej wzbogacają się w wiele prebiotyków i probiotyków [Lavefve i wsp. 2019]. Uważa się, że do 70% komórek układu immunologicznego zlokalizowanych jest w jelitach [Belkaid i Hand 2014, Takii-shi i wsp. 2017], stąd zapewnienie rozwoju właściwej bioty jelitowej jest istotną funkcją żywności konserwowanej z wykorzystaniem fermentacji kwasu mlekowego.

Żywe kultury bakterii mlekowych dostarczane są wraz z kiszonymi warzywami. Niektóre oligosacharydy czy błonnik obecne w warzywach lub owocach stanowią prebiotyki stymulujące wzrost prawidłowej mikroflory jelitowej [Jovanovic-Malinovska i wsp. 2014]. Wachlarz działań substancji zawartych w kiszonkach jest bardzo szeroki i obejmuje: obniżanie poziomu cholesterolu, wzmacnianie systemu immunologicznego, zapobieganie uszkodzeniu komórek, zapobieganie i wspomaganie leczenia cukrzycy, aktywność antymutagenną, poprawę trawienia i polepszanie mikrobiomu jelitowego, poprawianie walorów sensorycznych pokarmów i wydłużanie ich żywotności, szerokie spektrum działań antibakteryjnych i antygrzybiczych, dostarczanie wartościowych składników odżywczych i antyoksydantów [Behera i wsp. 2020]. Tym ostatnim w szczególności warto poświęcić uwagę ze względu na prowadzone współcześnie badania nad działaniem wybranych polifenoli, w tym flawonoidów i izoflawonoidów, na organizm. Przeciwutleniacze zapewniają lepszą kondycję komórek i zapobiegają ich starzeniu się. Wykazano, że zastosowanie ligandów flawonoidowych może mieć istotny wpływ na leczenie zakażenia wirusem dengi [Muhamad i wsp. 2017]. W innym badaniu stwierdzono wpływ izoflawonów na lekooporność kobiet w okresie menopauzy [Benvenuti 2009]. Flawonoidy mogą odgrywać rolę wspierającą w leczeniu zakażeń bakteryjnych *E. coli*, gronkowcem (*Staphylococcus*) czy pałeczką zapalenia płuc (*Klebsiella pneumoniae*). Samodzielnie nie wykazują działań sanityzacyjnych, ale oddziałują synergicznie w mieszaninie różnych flawonoidów, które mogą być pozyskane z kozieradki pospolitej, bazylii azjatyckiej czy Rooibos [Ali i Dixit 2012]. Podobne działanie wykazują kwasy fenolowe na *Listeria*

monocytogenes wspomagając leczenie listeriozy [Wen i wsp. 2003]. Już w ubiegłym wieku stwierdzono, że kuracja z użyciem wybranych flawonoidów może zmniejszyć infekcyjność wirusa HIV, a tym samym spowolnić rozwój choroby nabytego braku odporności immunologicznej (AIDS) [Mahmood i wsp. 1993]. Flawonoidy występujące w różnych roślinach posiadają szeroki zakres działań farmakologicznych: przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwalergiczne, przeciwcukrzycowe, neuroprotektoryjne, kardioprotektoryjne i przeciwbakteryjne [Karthika i wsp. 2021, Patra i wsp. 2021, Potshangbam i wsp. 2020]. Co więcej, różne formy kemferolu mogą oddziaływać na lekooporne szczepy bakterii, jak prątki trądu (*Mycobacterium leprae*) [Potshangbam i wsp. 2020]. Z kolei naringinina może mieć wpływ na osłabianie efektu toksycznego dla nerek podczas leczenia zatrucia nikiem [Amudha i Pari 2011]. Polifenole mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów, obniżając ból i usprawniając funkcjonowanie stawów, przy jednoczesnym niższym wpływie na zaburzenia gastryczne w porównaniu do stosowanych wcześniej leków [Ruan i wsp. 2021]. Najnowsze badania wskazują, że stosowanie diety bogatej w polifenole o działaniu antywirusowym może być skuteczną metodą w zwalczaniu pandemii Covid-19 [Montenegro-Landívar i wsp. 2021]. Oprócz powyżej wymienionych działań prozdrowotnych polifenole znajdują zastosowanie w profilaktyce chorób cywilizacyjnych, w tym osteoporozy czy chorób układu krążenia [Koszowska i wsp. 2013]. Flawanole kakaowca mogą mieć pozytywny wpływ na czynniki ryzyka zespołu metabolicznego [Jaramillo Flores 2019] lub obniżać ryzyko chorób krążenia poprzez łagodzenie nadciśnienia tętniczego [Erdman i wsp. 2008]. Powyższe przykłady nie wyczerpują możliwych prozdrowotnych właściwości polifenoli występujących w surowcach roślinnych, a także kiszonkach z nich przygotowanych.

Warto zaznaczyć, że dostępność kwasów fenolowych w niefermentowanym pożywieniu wydaje się być często niewystarczająca do osiągnięcia dawek koniecznych do uzyskania działania terapeutycznego [de Oliveira i Markowicz-Bastos 2011]. Hydroliza alkaliczna może powodować dekompozycję i zmniejszanie zawartości kwasów polifenolowych w materiale [Nardini i wsp. 2002], stąd prowadzenie fermentacji mlekowej obniżającej pH zapobiega rozpadowi tych kwasów w produktach spożywczych.

Polifenole w kiszonkach warzywnych

Jak już wspomniano, do polifenoli występujących w największych stężeniach w soku uzyskanym w trakcie fermentacji mlekowej należą głównie kwasy fenolowe i flawonoidy. Kwasy fenolowe to grupa związków, która dzieli się na pochodne kwasu benzoowego, powstające w wyniku metabolizmu cukrów, i pochodne kwasu cynamonowego, powstające na drodze przemian kwasu cynamonowego, który otrzymywany jest w wyniku dezaminacji fenyloalaniny. Kwasy fenolowe rzadko występują w czystej postaci, najczęściej pełnią rolę glikozydów i estryfikowanych kwasów fenolowych. Flawonoidy w roślinach występują jako barwnik mający właściwości przeciwutleniające w przypadku uszkodzenia tkanek, a także jako naturalny insektycyd i fungicyd. Poprzez nadanie intensywnej barwy mają one za zadanie chronić powierzchniowe tkanki roślinne ograniczając wpływ promieniowania ultrafioletowego. Flawonoidy i kwasy fenolowe wywierają pozytywny wpływ na komórki ludzkie, wykazując działanie przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe i wzmacniające organizm seniorów.

Kwasy fenolowe występujące w kiszonkach warzywnych

Najpopularniejsze kiszonki w Polsce to kapusta kiszona (rycina 32, s. 99), ogórki kiszane i sok z kiszonych buraków ćwikłowych. Z roku na rok wzrasta popularność kiszonych fermentowanych soków, co można zauważyć m.in. w dużych sieciach handlowych, a także w sklepach ze zdrową żywnością. Ze względu na ich właściwości zaliczane są one do probiotyków i postbiotyków [Ciska i wsp. 2005, Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013, Garcia i wsp. 2020, Akatsu 2021, Rodríguez i wsp. 2009].

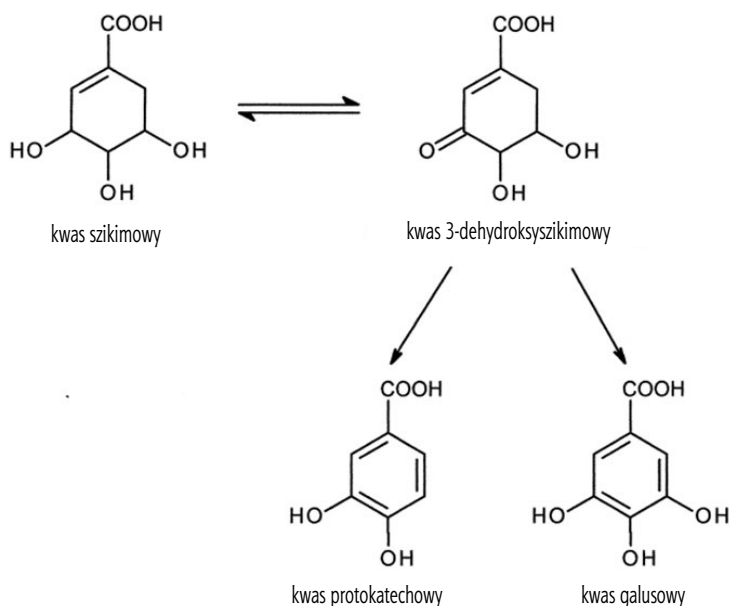
W tabeli 9 zestawiono najczęściej występujące w kiszonkach pochodne kwasu hydroksycynamonowego i kwasu hydroksybenzoowego. Można zauważyć, że w zależności od użytego materiału roślinnego powstają inne metabolity z grupy kwasów fenolowych w fermentowanych sokach warzywnych.

Tabela 9. Zestawienie kwasów fenolowych występujących w kiszonkach warzywnych

Nazwa związku	Materiał roślinny użyty do fermentacji mlekowej	Źródło
kwasy galusowy	kapusta czerwona, kapusta biała, ogórek gruntowy, oliwki, kapary, bakłażan	[Hunaefi i wsp. 2013, Rodríguez i wsp. 2009]
kwasy <i>p</i> -hydroksybenzoesowy	kapusta czerwona, burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013]
kwasy <i>m</i> -hydroksybenzoesowy	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
kwasy kawowy	kapusta czerwona, burak ćwikłowy, kapusta biała, ogórek gruntowy, oliwki, kapary, bakłażan	[Ciska i wsp. 2005, Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013, Garcia i wsp. 2020, Akatsu 2021, Rodríguez i wsp. 2009]
kwasy wanilinowy	kapusta czerwona	[Hunaefi i wsp. 2013]
kwasy chlorogenowy	kapusta czerwona, burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013]
kwasy syringowy	kapusta czerwona, burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013]
kwasy <i>p</i> -kumarowy	kapusta czerwona, burak ćwikłowy, kapusta biała, ogórek gruntowy, oliwki, moszcz winogronowy, kapary, bakłażan	[Ciska i wsp. 2005, Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013, Rodríguez i wsp. 2009]
kwasy <i>m</i> -kumarowy	kapusta biała, ogórek gruntowy, oliwki, kapary, bakłażan	[Rodríguez i wsp. 2009]
kwasy synapinowy	kapusta czerwona, burak ćwikłowy, kapusta biała	[Ciska i wsp. 2005, Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013]
kwasy rozmarynowy	kapusta czerwona	[Hunaefi i wsp. 2013]
kwasy ferulowy	kapusta czerwona, burak ćwikłowy, kapusta biała, ogórek gruntowy, oliwki, kapary, bakłażan	[Ciska i wsp. 2005, Płatosz i wsp. 2020, Hunaefi i wsp. 2013, Rodríguez i wsp. 2009]
kwasy izoferulowy	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
kwasy cynamonowy	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
kwasy 3,4-dihydroksyfenylooctowy	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
kwasy protokatechowy	burak ćwikłowy, kapusta biała, ogórek gruntowy, oliwki, kapary, bakłażan	[Płatosz i wsp. 2020, Rodríguez i wsp. 2009]

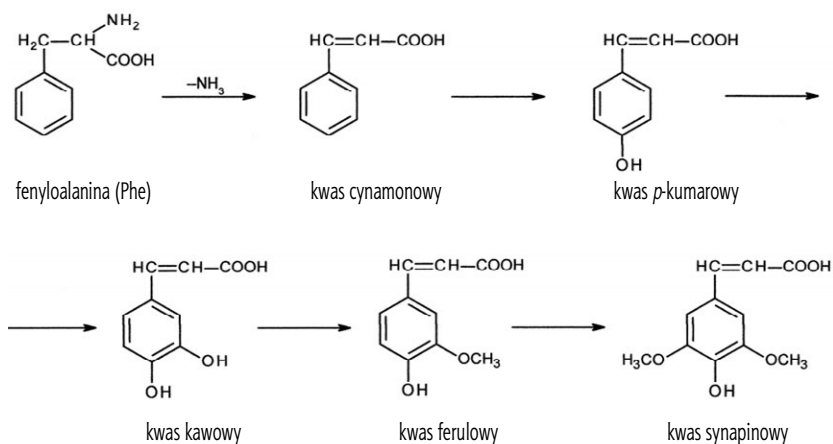
Mimo że większość fermentacji warzywnych jest spontaniczna, *Lactobacillus plantarum* jest jedną z najczęściej używanych komercyjnych kultur starterowych w fermentacji roślinnych produktów spożywczych. Badania nad metabolitami bakterii kwasu mlekowego zapoczątkowała

grupa badawcza G.C. Whitinga i R.A. Cogginsa, która skoncentrowała się na pochodnych chininy i kwasu szikimowego. Określili oni, że w obecności donorów wodoru następuje redukcja obydwu związków. W przypadku kwasu szikimowego jest to produkt metabolizowania cukrów przez bakterie kwasu mlekowego. Jest on również prekursorem pochodnych kwasów fenolowych. Mechanizm redukcji kwasu szikimowego poprzez aromatyzację kwasu 3-dehydroksyszikimowego do kwasu protokatechowego i kwasu galusowego został przedstawiony na rycinie 37 [Whiting 1975, Santos-Sánchez i wsp. 2019, Heldt i Piechulla 2011: 431–449].



Rycina 37. Poglądowy mechanizm transformacji pochodnych kwasu benzooesowego, opracowanie własne na podstawie [Santos-Sánchez i wsp. 2019]

Pochodne kwasu cyjanonowego są wytwarzane na drodze przemian kwasu cyjanonowego, który powstaje w wyniku usunięcia grupy aminowej ($-\text{NH}_2$) występującej w łańcuchu bocznym fenyloalaniny (Phe) [Heldt i Piechulla 2011: 431–449]. Schemat reakcji przedstawiono na rycinie 38.



Rycina 38. Poglądowy mechanizm powstawania pochodnych kwasu cynamonowego, opracowanie własne na podstawie [Heldt i Piechulla 2011]

Wpływ na powstanie metabolitów bakterii kwasu mlekowego w postaci kwasów fenolowych ma także stężenie NaCl w kiszonych sokach warzywnych. Grupa badawcza Marsilio i wsp. [1996] potwierdziła, że przy niskich stężeniach, tj. 0,5g/l NaCl produkcja metabolitów kwasów fenolowych nie jest hamowana. Natomiast w przypadku zawartości 40g/l NaCl zauważono mniejsze stężenie aromatycznych kwasów polihydroksylowych. Określili oni również, że przekroczenie stężenia 60g/l NaCl w fermentowanych sokach hamuje proces produkcji kwasów fenolowych przez *Lactobacillus plantarum*.

Flawonoidy występujące głównie w kiszonkach warzywnych

Biosynteza flawonoidów w komórkach roślin, podobnie jak w przypadku kwasów fenolowych, zaczyna się od kwasu szikimowego (rycina 37), który jest prekursorem w otrzymywaniu aminokwasów aromatycznych (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan). W wyniku deaminacji fenyloalaniny przy udziale amoniakolizy fenyloalaninowej (PAL) otrzymywany jest kwas cynamonowy. Kolejnym etapem jest wprowadzenie grupy -OH do pierścienia benzenu przy udziale 4-hydroksylazy

cynamonowej, w wyniku czego powstaje kwas kumarowy (4-hydroksycynamonowy), którego mechanizm powstawania został przedstawiony na rycinie 38. Następnie *p*-kumarynian, przy użyciu ligazy kwasu kumarowego-koenzym A (CoA), przekształcany jest do specyficznego połączenia estrowego z CoA aktywując go do przeprowadzenia reakcji z malonylo-CoA. W wyniku łączenia się cząsteczki 4-kumaroilo-CoA i trzech cząsteczek malonylo-CoA przy udziale syntazy chalkonu powstaje chalkon. W kolejnym etapie następuje cyklizacja chalkonu do flawanonu przy udziale izomerazy chalkon-flawanon. Główny szlak syntezy na etapie cyklizacji chalkonu rozgałęzia się na kilka reakcji syntezy prowadzących do uzyskania różnych klas flawonoidów. Jednym z etapów jest proces utleniania przy udziale hydroksyhydrolazy, w którym biorą udział kolejno dwa enzymy: 3'-hydroksylaza flawonoidowa oraz 3',5'-hydroksylaza. Następnie dochodzi do redukcji przy udziale reduktazy dihydroflawonolu-4 do leukocyjanidyny. W ostatnim etapie leukocyjanidyna utleniana jest przez syntazę antocyjanidynową (dioksygenazę leukocyjanidynową) do antocyjanidyn. Do grupy flawonoidów należą antocyjany (cyjanidyny), leukoantocyjany i katechiny [Geissmann 1962, Kohlmünzer (cop.) 1988, Czaplińska i wsp. 2012].

Tabela 10. Zestawienie flawonoidów występujących w kiszonkach warzywnych

Nazwa związku	Materiał roślinny użyty do fermentacji mlekowej	Źródło
apigenina	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
epikatechina	burak ćwikłowy, kapary	[Płatosz i wsp. 2020, Czyżowska i wsp. 2020, Bisakowski i wsp. 2007]
izoramnetyna	kapary	[Bisakowski i wsp. 2007]
katechina	kapary	[Bisakowski i wsp. 2007]
kemferol	burak ćwikłowy, kapusta biała, kapary	[Płatosz i wsp. 2020, Aksay i wsp. 2020, Bisakowski i wsp. 2007]
kwercecytyna	burak ćwikłowy, cebula biała, kapary	[Płatosz i wsp. 2020, Czyżowska i wsp. 2020, Aksay i wsp. 2020, Bisakowski i wsp. 2007]
luteolina	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
orientyna	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
rutyna	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]
witekсыna	burak ćwikłowy	[Płatosz i wsp. 2020]

Dokonując przeglądu dostępnej literatury opisującej zawartości flawonoidów w przypadku fermentowanych warzyw dokonano zbiorczego zestawienia najczęściej występujących flawonoidów w wybranych warzywach i ich fermentowanych sokach (tabela 10). Do grupy flawonoidów występujących w kiszonkach można zaliczyć: flawony, katechiny, flawanole, katechiny i flawanole. Wśród flawanonów można wyróżnić: orientinę, apigeninę, witeksynę i luteolinę. Do grupy katechin występujących w kiszonkach zalicza się katechinę i kemferol. Do ostatniej z grup flawonoidów występujących w fermentowanych warzywach należą flawanole: kwercetyna, kemferol i izoramnetyna [Płatosz i wsp. 2020, Czyżowska i wsp. 2020, Tolonen i wsp. 2002, Aksay i wsp. 2021, Bisakowski i wsp. 2007].

Pierwotną funkcją flawonoidów występujących w warzywach i owocach jest funkcja barwnikowa i przeciwutleniająca w przypadku uszkodzenia skórki. Chronią one również materiał roślinny przed bytowaniem organizmów grzybiczych i uszkodzeniem powierzchniowych tkanek przez insekty [Heber 2008, Chyu i wsp. 2004, Mittal i wsp. 2004]. W trakcie syntezy chlorofilu i wzrostu młodych roślin flawonoidy pełnią funkcję ochronną blokując dostęp szkodliwego promieniowania UV. W tym okresie działają także jako naturalny fungicyd i herbicyd. W wyniku występowania flawonoidów w młodych roślinach możliwa jest stymulacja mechanizmów obronnych, które wspomagają endogenne systemy komórek roślinnych [Smith i Banks 1986, Timberlake i Henry 1986].

Podsumowanie

Kiszenie jest znanym od dawna sposobem konserwowania żywności. W czasach świetności żeglarstwa odkryto, że kwas askorbinowy (witamina C) zawarty w kiszonkach zapobiega skorbutowi. Mimo upływu lat odkrywamy kolejne możliwości korzystnego działania polifenoli naturalnych i tych występujących w kiszonkach na organizm ludzki. Zmniejszają one stres oksydacyjny, działają antybakteryjnie i antygrzybiczo, a nawet mogą wspomagać kuracje antywirusowe. Ciągłe prowadzi się badania nad sposobem pozyskania, ekstrakcji i podawania polifenoli z różnych źródeł naturalnych. Ustalane są dawki terapeutyczne, co pozwoli na przygotowanie suplementów wspomagających leczenie, niezależnie od diety.

Szerokie spektrum działania polifenoli na organizm ludzki czyni je superdodatkiem dietetycznym. Jednak w niektórych przypadkach istnieje także ryzyko związane z ich przedawkowaniem, dlatego konieczne są dalsze badania tej klasy substancji i jej wpływu na zdrowie.

Dotychczasowe badania wykazują wzrost ogólnej zawartości flawanoidów i polifenoli w trakcie procesu kiszenia. Badane soki warzyw krzyżowych (kapustnych) wykazywały niemierzalnie małe zawartości antyoksydantów w przeliczeniu na kwas galusowy. Natomiast odciek fermentacyjny zawierał mierzalne ilości związków fenolowych. Wykorzystanie antyutleniaczy naturalnie występujących w warzywach oraz w zwiększonej koncentracji w odciekach pofermentacyjnych do celów prozdrowotnych nie jest jedynym ich zastosowaniem. Badacze uważają, że można je wykorzystać także do ochrony biokomponentów paliw przed starzeniem się w magazynach i zbiornikach stacji paliwowych. To użycie stanowiłoby alternatywę dla syntetycznych, toksycznych antyoksydantów. Charakterystyka zmian zawartości związków fenolowych podczas kiszenia jest przedmiotem dalszych badań.



Rycina 39. Karpobrot jadalny (*Carpobrotus edulis*).
Fot. Tomasz Wilk

ROZDZIAŁ 5.

PRZEGLĄD WŁAŚCIWOŚCI NATURALNYCH ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH ZAPEWNIAJĄCYCH PODWYŻSZENIE OCHRONY SKÓRY PRZED PROMIENIOWANIEM UV

Artur Budzowski¹, Regina Gil²

¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Chemii Kosmetycznej. ORCID: 0000-0002-2714-0877

² Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Chemii Kosmetycznej. ORCID: 0000-0002-7315-6159

DOI: 10.48269/978-83-66007-99-4-005

Streszczenie

Różnorodne ekstrakty roślinne i zawarte w nich związki polifenolowe mogą być wykorzystane jako naturalne surowce promieniochronne, stosowane w celu wzmocnienia efektu działania fizycznych i chemicznych filtrów UV wchodzących w skład kosmetyków. Naturalne ekstrakty roślinne, ze względu na niski SPF, samodzielnie nie zapewniają wystarczającej ochrony przed promieniowaniem UV-B, a zwłaszcza UV-A. Dlatego większość kosmetyków promieniochronnych zawiera kombinacje filtrów chemicznych z naturalnymi ekstraktami roślinnymi, które poprzez synergiczne działanie zapewniają efektywną ochronę przed promieniowaniem UV.

W rozdziale przytoczone zostały wyniki wieloaspektowych badań mających na celu wyjaśnienie korzystnych właściwości wybranych związków polifenolowych, prowadzących do podwyższenia ochrony skóry przed promieniowaniem UV. Porównane zostały wyniki badań *in vivo* z udziałem pacjentów lub zwierząt laboratoryjnych z badaniami *in vitro* obejmującymi hodowle komórkowe, pomiary fizyczne oraz analizy chemiczne. Sklasyfikowano główne kierunki działania promieniochronnego polifenoli, do których należą: absorpcja promieniowania UV, działanie antyoksydacyjne poprzez dezaktywację wolnych rodników, a także dwa kierunki działania biologicznego – przeciwzapalne oraz immunomodulacyjne. Efekt wymienionych działań objawia się w postaci dobroczynnych skutków podwyższenia ochrony przed szkodliwym działaniem ultrafioletu.

Słowa kluczowe: polifenole; flawonoidy; filtry UV; surowce promieniochronne; przeciwutleniacze

Abstract

Review of the properties of natural polyphenolic compounds ensuring increased protection of the skin against UV radiation

Various plant extracts and polyphenolic compounds contained in them can be used as natural sunscreens, used to enhance the effect of physical and chemical UV filters included in cosmetics. Due to the low SPF, natural plant extracts alone do not provide sufficient protection against UV-B and especially UV-A rays. That is why most sunscreens contain combinations of chemical filters with natural plant extracts, which, through synergistic action, provide effective protection against UV rays.

The chapter presents the results of multifaceted research aimed at explaining the beneficial properties of selected polyphenolic compounds, leading to increased protection of the skin against UV rays. The results of *in vivo* studies in patients or laboratory animals were compared with *in vitro* studies involving cell cultures, physical measurements and chemical analyzes. The main directions of polyphenols' radiation protection have been classified, including: absorption of UV radiation, antioxidant activity by deactivating free radicals, as well as two directions of biological activity – anti-inflammatory and immunomodulatory. The effect of these activities manifests itself in the form of beneficial effects of increasing the protection against the harmful effects of ultraviolet.

Key words: polyphenols; flavonoids; UV filters; sunscreens; antioxidants

Wprowadzenie

Każdy z nas, niezależnie od wieku, marzy o zdrowo wyglądającej skórze, wolnej od zmarszczek i przebarwień. Niestety nadmierna ekspozycja na promieniowanie słoneczne jest główną przyczyną naruszenia naturalnej bariery ochronnej skóry, przyspiesza procesy starzenia się, pogłębia zmarszczki oraz zwiększa ryzyko zachorowania na nowotwory, w tym czerniaka [Pacholczyk i wsp. 2016].

Słońce emituje promieniowanie ultrafioletowe o różnej długości fali, na które składa się promieniowanie UV-A (320–400 nm), UV-B (280–320 nm) oraz UV-C (200–280 nm). Promieniowanie UV-B w około 90 procentach jest zatrzymywane przez naskórek i tylko niewielka jego część, około 10%, dociera do skóry właściwej. Reakcje skórne wywołane działaniem promieniowania UV-B są natychmiastowe i mają charakter oksydacyjny, ponieważ są efektem działania reaktywnych form tlenu (RFT), które przyczyniają się do uszkodzenia błon komórkowych, wywołują stany zapalne skóry oraz rozszerzają naczynia włosowate

powodując obrzęk i rumień. Ponadto, w odpowiedzi na przewlekłe działanie promieniowania UV-B, fibroblasty skórne wytwarzają enzymy zwane metaloproteinazami (MMP-1, MMP-2 i MMP-9), które zaangażowane są w degradację kolagenu typu 1. Promieniowanie o długości fali 320–400 nm przenika aż do skóry właściwej i tkanki podskórnej, dlatego odpowiada za reakcje fotoalergiczne i fototoksyczne. Z kolei w wyniku reakcji opóźnionych będących wynikiem działania promieniowania UV-A niszczone są białka obecne w skórze, m.in. elastyna i kolagen. Dodatkowo promieniowanie UV-A wykazuje działanie genotoksyczne z udziałem wolnych rodników o działaniu utleniającym, które powodują uszkodzenia oksydacyjne reagując z białkami, lipidami i DNA. Poza fotostarzeniem się skóry, promieniowanie UV powoduje także obniżenie jej funkcji immunologicznych, czyli tzw. immunosupresję oraz kancerogenezę, która prowadzi do nowotworów [Resich-Kozieł i Niemyska 2020, Brennerr i Hearing 2008, Agar i wsp. 2004].

Skutki biologicznego oddziaływania promieniowania UV na skórę mogą ujawnić się bezpośrednio po ekspozycji na słońce albo dopiero po wielu latach. Nie ulega więc wątpliwości, jak ważna jest ochrona skóry przed promieniowaniem UV poprzez miejscowe zastosowanie preparatów kosmetycznych o właściwościach fotoprotekcyjnych. W celu zapewnienia pełnego spektrum ochrony przeciwslonecznej w preparatach tych stosowane są fizyczne i chemiczne filtry UV, wybrane spośród substancji promieniochronnych dopuszczonych do stosowania w systemie prawnym danego kraju. Biorąc pod uwagę budowę chemiczną oraz mechanizm działania, filtry ochronne zostały podzielone na dwie grupy: filtry fizyczne, określane również jako filtry mineralne, oraz filtry chemiczne, zwane także filtrami organicznymi. Aktywność filtrów mineralnych polega na odbijaniu i rozpraszaniu promieni słonecznych. Do tej grupy zaliczane są surowce nieorganiczne, takie jak: tlenek cynku (INCI: *Zinc Oxide*) oraz dwutlenek tytanu (INCI: *Titanium Dioxide*). Natomiast filtry chemiczne wykazują zdolność do absorpcji promieniowania UV. Są to syntetyczne związki organiczne pochłaniające promieniowanie w określonym zakresie długości fali. W zależności od zakresu długości fali pochłanianego światła można je podzielić na filtry absorbujące w zakresie UV-B (pochodne kwasu *p*-metoksycynamonowego, kwasu salicylowego i PABA – kwasu *p*-aminobenzoesowego, np. INCI:

Ethylhexyl Triazone), filtry mające szeroki zakres absorpcji obejmujący zarówno promieniowanie UV-A, jak i UV-B: *Bemotrizinol* (INCI: *Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine*), *Bisotrizole* (INCI: *Methylene bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol*), pochodna benzotriazolu (*Drometrizole Trisiloxane*) oraz filtry absorbujące głównie promieniowanie UV-A, np. *Benzophenone-3* czy pochodna benzotriazolu *Terephthalylidene Dicamphor Sulfonic Acid* [Budzowski i Gil 2018]. Dlatego w recepturze preparatów promieniochronnych często stosuje się kombinacje filtrów fizycznych i chemicznych, jak również dobiera się filtry pod względem zakresu absorpcji tak, aby zapewniały ochronę zarówno w zakresie UV-A, jak i UV-B.

Niestety, syntetyczne filtry chemiczne posiadają często niewystarczającą fotostabilność, przez co po upływie pewnego czasu od nanieśnięcia preparatu na skórę może nastąpić uszkodzenie chromoforu, co prowadzi do spadku lub wręcz utraty jego właściwości ochronnych. Dodatkowo efektem niepożądanym wielu filtrów UV aplikowanych miejscowo jest ich przenikanie przez skórę oraz działanie alergizujące i fotouczulające. Mając na uwadze bezpieczeństwo konsumenta, we współczesnej recepturze preparatów promieniochronnych obok fizycznych i chemicznych filtrów UV dodatkowo wprowadza się substancje pochodzenia naturalnego, najczęściej w formie ekstraktów roślinnych, które oprócz właściwości antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych wykazują także działanie absorbujące promieniowanie UV. Co więcej, ich obecność w preparatach promieniochronnych wykazuje działanie synergiczne względem fizycznych i chemicznych filtrów UV oraz łagodzi skutki negatywnego działania promieni słonecznych. Takie rozwiązanie zwiększa bezpieczeństwo stosowania preparatów anty UV nie tylko przez ograniczenie ilościowe szkodliwych filtrów chemicznych w recepturze kosmetycznej, ale przede wszystkim przez zapewnienie szerokiego spektrum działania fotoprotekcyjnego.

W rozdziale przytoczone zostały wyniki badań mających na celu wyjaśnienie działania promieniochronnego wybranych związków polifenolowych.

Współczynnik ochrony przeciwsłonecznej – SPF

W celu wyrażenia efektywności ochrony produktu kosmetycznego przed promieniowaniem UV-B stosuje się współczynnik ochrony przeciwsłonecznej (SPF, ang. *sun protection factor*), który uznawany jest za uniwersalny wskaźnik służący do opisu skuteczności produktów przeciwsłonecznych w ochronie skóry przed oparzeniami słonecznymi. Współczynnik ten został zdefiniowany jako stosunek minimalnej dawki promieniowania powodującej rumień na skórze chronionej środkiem promieniochronnym w ilości 2 mg/cm^2 do minimalnej dawki promieniowania powodującej rumień na skórze nie chronionej filtrem UV. Im wyższe stężenie filtru w danym kosmetyku, tym wyższa ochrona i wartość SPF. Preparaty fotoprotekcyjne są klasyfikowane zgodnie z ich wartościami SPF, przy czym wartości od 6 do 10 są klasyfikowane jako „minimalna ochrona przeciwsłoneczna”, od 15 do 25 to „umiarkowana ochrona przeciwsłoneczna”, a produkty przeciwsłoneczne o wartościach SPF 30 i wyższych są zdefiniowane jako „wysoka ochrona przed słońcem”. Najwyższą ochronę zapewniają produkty kosmetyczne oznaczone jako SPF 50+, co w praktyce oznacza wartości SPF > 60.

SPF można oznaczać metodą bezpośrednią *in vivo*, podając badany preparat na skórę wybranej grupy ochotników i mierząc dawkę promieniowania wywołującą rumień, która następnie jest porównywana z grupą kontrolną. W przypadku badań nad zastosowaniem ekstraktów roślinnych do celów kosmetycznych powszechnie stosowana jest przybliżona metoda *in vitro* spektrofotometrycznego oszacowania SPF, na podstawie pomiaru absorpcji w zakresie długości fali 290–320 nm. Wartość liczbowa SPF oblicza się zgodnie z równaniem opracowanym przez Mansura i wsp. [1986], na podstawie sumy przyczynków będących iloczynami absorpcji badanego ekstraktu roślinnego mierzonej co 5 nm w zakresie 290–320 nm, pomnożonymi przez stałą wartość będącą iloczynem natężenia światła symulatora słonecznego $I(\lambda)$ oraz wielkości $EE(\lambda)$ opisującej efektywność wywoływania rumienia dla danej długości fali (ang. *erythemogenic effect*). Standardowe wartości iloczynów $I(\lambda)$ i $EE(\lambda)$ dla światła słonecznego w zakresie 290–320 nm zostały wyznaczone eksperymentalnie i były kilkakrotnie doprecyzowywane przez różnych autorów [Webb i wsp. 2011].

$$SPF = CF \times \sum EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

gdzie:

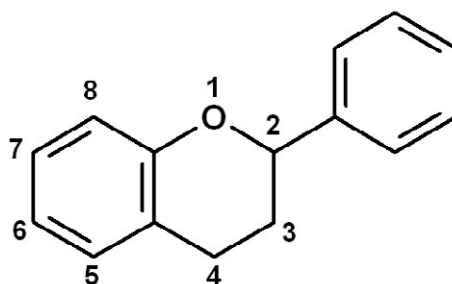
- $EE(\lambda)$ – efektywność wywoływania rumienia dla danej długości fali;
- $I(\lambda)$ – natężenie światła słonecznego;
- $Abs(\lambda)$ – wynik pomiaru absorbancji dla kosmetyku promieniochronnego;
- CF – współczynnik korygujący (=10);
- $EE \times I$ – wartości stałe.

Charakterystyka polifenoli o działaniu promieniochronnym

Związki aktywne pochodzenia roślinnego są obecnie powszechnie stosowane w recepturze preparatów kosmetycznych. Lecznicze i kosmetyczne właściwości ekstraktów roślinnych znane były już w starożytności, a dynamiczny rozwój przemysłu kosmetyczno-farmaceutycznego pozwolił na zastosowanie tych ekstraktów także w fitofarmacji.

Dużą rolę w kosmologii przypisuje się polifenolom – związkom organicznym zawierającym co najmniej dwie grupy hydroksylowe (–OH) przyłączone do pierścienia aromatycznego. Są to metabolity wtórne roślin, które powstają na drodze dwóch szlaków metabolicznych: kwasu szikimowego i kwasu malonowego. Prekursorem obu szlaków jest acetylo-CoA [Dudka i wsp. 2016]. Polifenole magazynowane są w różnych częściach roślin, np. w owocach, kwiatach, liściach i korzeniach. Nadają im barwę oraz stanowią ochronę przed różnymi drobnoustrojami chorobotwórczymi i promieniowaniem UV [Kosiorek i wsp. 2013]. Pełnią także funkcję regulatorów wzrostu i hormonów [Cook i Samman 1996].

Pod względem budowy chemicznej polifenole należą do grupy związków organicznych charakteryzujących się obecnością w cząsteczce jednego lub kilku pierścieni aromatycznych oraz różną liczbą grup hydroksylowych, które warunkują ich działanie antyoksydacyjne. Aktywność ta rośnie wraz ze wzrostem liczby grup hydroksylowych w cząsteczce. Do roślinnych związków polifenolowych należą: kwasy fenolowe, flawonoidy, antocyjany, stilbeny oraz lignany [Kosiorek i wsp. 2013]. Dużą różnorodnością chemiczną charakteryzują się flawonoidy, których budowa oparta jest na szkielecie flawanu (rycina 40).



Rycina 40. Struktura flawanu

Podstawowym elementem struktury chemicznej flawonoidów jest heterocykliczny układ flawanu, składający się z trzech pierścieni, z których środkowy zawiera jeden atom tlenu. Dodatkowo, dzięki obecności pierścieni aromatycznych oraz sprzężonych układów wiązań podwójnych, większość flawonoidów ma zdolność do absorpcji promieniowania UV, najczęściej w zakresie UV-B. Ponadto niektóre flawonoidy, w tym antocyjany, absorbują światło widzialne i są barwne. Natomiast liczne grupy hydroksylowe pełnią rolę grup auksochromowych o charakterze elektronowo-donorowym, zwiększających intensywność absorpcji światła i wpływających na wzrost intensywności barwy. Na podstawie układu grup funkcyjnych i obecności wiązań podwójnych w obrębie środkowego, heterocyklicznego pierścienia, dokonano podziału flawonoidów na kilka grup. Najważniejsze z nich to: katechiny, flawony, flawanony, flawonole i izoflawony [Makowska-Wąs i Janeczko 2004]. W przyrodzie większość flawonoidów występuje w postaci glikozydów. Reszty cukrów związane chemicznie z flawonoidami w połączeniach glikozydowych to najczęściej: glukoza, galaktoza i arabinoza. Flawonoidy wolne, pozbawione cząsteczek cukru, nazywane też aglikonami flawonoidowymi, mają charakter bardziej hydrofobowy i dzięki temu mogą być transportowane przez błony biologiczne w organizmach żywych [Shahidi i Naczek 2005].

Związki polifenolowe są bardzo ważne nie tylko dla roślin, ale także dla zdrowia człowieka. Wykazują one właściwości antyoksydacyjne, chroniąc organizm żywy przed stresem oksydacyjnym. Działanie takie ma na celu nie tylko destrukcję reaktywnych form tlenu, ale także zablokowanie wolnych rodników i enzymów biorących udział w powstawaniu reaktywnych form tlenu, jak np. oksydazy ksantynowej, błonowej

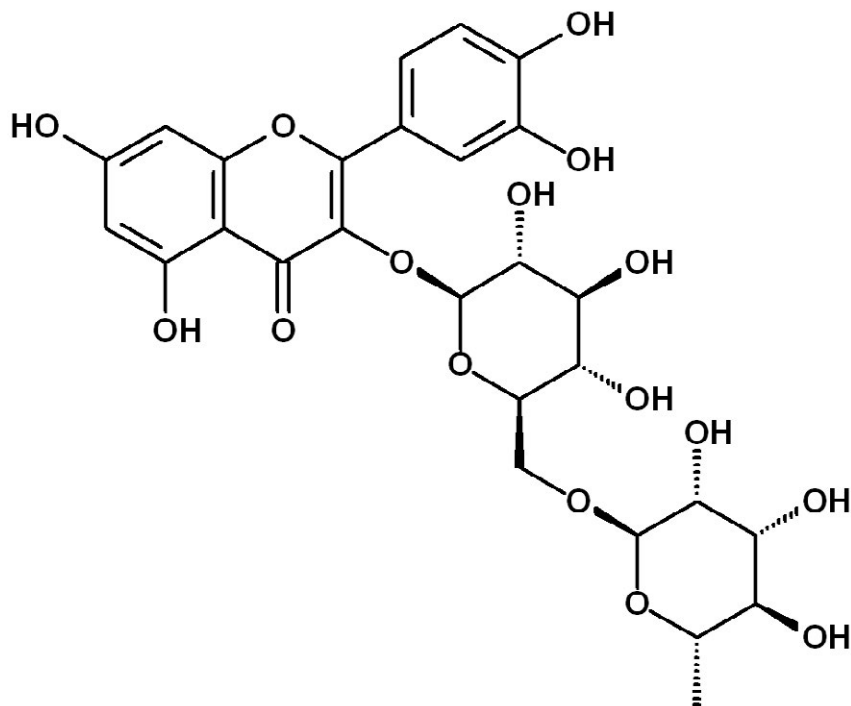
oksydazy NAD(P)H czy mieloperoksydazy. Ponadto związki fenolowe wykazują zdolność chelatowania jonów metali wielowartościowych, zapobiegając powstawaniu reaktywnego rodnika hydroksylowego. Pośrednio flawonoidy mają także zdolność do zatrzymania kaskady przemian wolnorodnikowych w enzymatycznej i nieenzymatycznej peroksydacji lipidów [Rice-Evans i wsp. 1996].

Ekstrakty roślinne o działaniu absorpcyjnym w zakresie UV i przeciwutleniającym

Stopień ochrony przed promieniowaniem UV zarówno fizycznych, jak i chemicznych filtrów przeciwsłonecznych jest w rzeczywistości słabszy niż ten przedstawiony na etykietach produktów kosmetycznych. Co więcej, prace badawcze przeprowadzone przez Haywooda i wsp. [2003] wykazały, że nawet filtry przeciwsłoneczne o szerokim spektrum działania są w stanie zahamować powstawanie wolnych rodników tylko o 55%. Taka sytuacja wymaga włączenia dodatkowych substancji promieniochronnych i przeciwutleniaczy, spoza określonej w przepisach prawnych listy filtrów UV, do preparatów kosmetycznych w celu nadania dodatkowych korzyści uzupełniających skuteczność kosmetyków z filrami UV. Naturalnymi kandydatami do wypełnienia tej luki są liczne ekstrakty roślinne otrzymywane z egzotycznych roślin pozyskiwanych w różnych częściach świata. Najczęściej przydatność nowych preparatów roślinnych do wykorzystania w kosmetykach promieniochronnych jest szacowana metodami *in vitro*, które są szybsze i mniej kosztochłonne.

W ostatnich latach malezyjscy naukowcy przeprowadzili badanie w celu oceny właściwości przeciwutleniających i fotoochronnych ekstraktu ze skórki *Hylocereus polyrhizus*, jako aktywnego składnika w recepturze kosmetyków promieniochronnych, metodą *in vitro* przy użyciu technik spektrofotometrycznych [Vijayakumar i wsp. 2020]. *Hylocereus polyrhizus* powszechnie znany jako smoczy owoc lub czerwona pitaja jest owocem kaktusa z rodzaju *Hylocereus* o czerwonym miąższu i różowej skórce. Ten egzotyczny owoc pochodzi z Meksyku oraz Ameryki Środkowej i Południowej, a także jest uprawiany w krajach Azji Południowo-Wschodniej, zarówno jako roślina ozdobna, jak i jadalna. Smoczy owoc zyskał światową popularność nie tylko dzięki wyraźnemu

fioletowo-czerwonemu zabarwieniu i wyjątkowej słodyczy, ale przede wszystkim dzięki wysokiej zawartości substancji o właściwościach antyoksydacyjnych. Dynamiczny rozwój przetwórstwa *Hylocereus polyrhizus* powoduje generowanie dużej ilości produktów ubocznych – odpadów, zwłaszcza skórek, które są bogatym źródłem przeciwutleniaczy, witamin, błonnika, pektyny oraz barwnika betacyjaniny. Analiza HPLC etanolowego roztworu skórki smoczego owocu potwierdziła obecność sześciu związków zaklasyfikowanych do grupy flawonoidów oraz dwóch kwasów fenolowych – kwasu galusowego i kwasu synapinowego. Dominującym składnikiem okazała się rutyna (rycina 41) – glikozyd kwercetyny, którego część cukrową stanowi disacharyd rutynoza złożony z reszt glukozy i ramnozy.



Rycina 41. Struktura rutyny

Od lat znana jest wysoka aktywność antyoksydacyjna rutyny, która polega na usuwaniu rodników hydroksylowych i nadtlenkowych poprzez ich redukcję powodującą ich neutralizację do bardziej stabilnych i mniej

reaktywnych form. W przeprowadzonym badaniu całkowita aktywność/ zdolność antyoksydacyjna etanolowego ekstraktu skórki *Hylocereus polyrhizus* została oceniona metodą fosforomolibdenową i wahała się na poziomie 23,76%–31,87%. Ponadto dowiedziono, że ekstrakt ten posiada bardzo silny potencjał antyoksydacyjny w porównaniu z kwasem askorbinowym w zakresie neutralizowania wolnych rodników, np. ABTS+ (2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowych)).

Związki fenolowe i flawonoidowe zawarte w skórcie egzotycznego owocu przyczyniły się nie tylko do ogólnej aktywności przeciwutleniającej, ale także do wysokiej wartości SPF i szerokiego spektrum fotoprotekcji przed promieniowaniem UV-A i UV-B. Określanie wartości SPF przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy długości fali od 260 do 400 nm. Jako substancje porównawcze zastosowano tlenek cynku oraz dwa dostępne na rynku produkty przeciwsłoneczne z dwutlenkiem tytanu i 3-benzofenonem. Wartości SPF obliczono według zależności zaproponowanej przez João de Souza Mansura. W pracy oceniono wpływ etanolowego ekstraktu *Hylocereus polyrhizus* o różnych stężeniach w zakresie od 0,05 do 1,00 mg/ml (0,05, 0,10, 0,25, 0,50 i 1,00 mg/ml) pod kątem jego fotoochronnej aktywności przeciwsłonecznej, przy czym uzyskane wartości SPF wynosiły odpowiednio: 15,38; 22,62; 33,38; 34,35 i 35,02. Badania potwierdziły wzrost fotoochronnej aktywności przeciwsłonecznej wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu *Hylocereus polyrhizus*. Ponadto wartości SPF badanego ekstraktu były bardzo zbliżone do SPF tlenku cynku i preparatu komercyjnego zawierającego dwutlenek tytanu. Wyniki wyraźnie pokazują, że ekstrakt ten jest dobrym składnikiem fotoochronnym, gdyż wykazuje absorbancję w szerokim zakresie UV. Przy najniższym stężeniu 0,05 mg/ml posiadał on wartość SPF 15,38. Natomiast w stężeniu 1,00 mg/ml *Hylocereus polyrhizus* wykazywał najwyższą absorbancję 3,608 przy długości fali 300 nm, a więc w obszarze UV-B. Ponadto wykazano silny pik absorpcji w obszarze UV-A o krótkiej długości fali 325 nm, z absorbancją 3,38 [Vijayakumar i wsp. 2020].

Peres i wsp. [2016] również podjęli próbę zbadania wpływu rutyny, flawonoidu o właściwościach antyoksydacyjnych, na fotostabilność i właściwości fotoprotekcyjne preparatu kosmetycznego zawierającego filtr UV-B (INCI: *Ethylhexyl dimethyl PABA*; *Ethylhexyl methoxycinnamate*). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że obecność

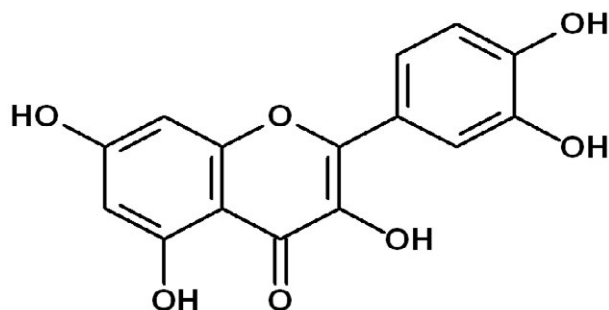
rutyny powodowała dodatnią synergiją z wykorzystanym filtrem UV-B, jak również zaobserwowano wzrost skuteczności fotoochronnej przed promieniowaniem UV-A. Ponadto próbki zawierające rutynę były kompatybilne ze skórą ludzką i wykazywały wyraźny potencjał antyoksydacyjny, tj. o 75% wyższą zdolność neutralizowania wolnych rodników. Niestety obecność rutyny w preparatach analizowanych nie zapobiegała fotodegradacji filtrów przeciwsłonecznych po napromieniowaniu, ale wykazała podwyższenie poziomu ochrony, zwłaszcza w zakresie UV-A. Dodatkowo Tomazelli i brazylijscy współbadacze [2018] dowiedli, że rutyna w połączeniu z filtrami UV podnosi wartość SPF o około 70%.

Badania tunezyjskich naukowców miały na celu ocenę skuteczności działania wodnego ekstraktu z liści rośliny *Carpobrotus edulis* (rycina 39, s. 115) jako surowca kosmetycznego o działaniu fotoprotekcyjnym. Już wcześniej było wiadomo, że roślina ta jest bogata w naturalne polifenole, które stosowane miejscowo wykazują obiecujące działanie ochronne przed fotouszkodzeniami i odpowiedzią zapalną wywołaną promieniowaniem UV [Saewan i Jimtaisong 2013]. Obecność związków fenolowych w badanym ekstrakcie oznaczono spektrofotometrycznie według metody Folin-Ciocalteu, natomiast całkowitą zawartość flawonoidów oceniono metodą autorów: Lamaison i Carnat, która polegała na tworzeniu kompleksu flawonoidów z glinem. Wyniki analiz fitochemicznych potwierdziły obecność 20 związków polifenolowych. Największy udział procentowy wykazywały: katechina należąca do flawan-3-oli (19,39%), procyanidyna B2 (16,04%) oraz 3-O-rutynozyd syringetyny należący do grupy flawanoli (14,28%). Autorzy badań podjęli także próbę porównania składu jakościowego i ilościowego wodnych oraz wodno-alkoholowych ekstraktów z *Carpobrotus edulis*, przy czym zawartość związków fenolowych w ekstrakcie wodnym była prawie dwukrotnie wyższa niż w wodno-etanolowym. Analiza ekstraktów metanolowych wykazała duże zróżnicowanie jakościowe i ilościowe w zależności od badanych organów roślinnych (pędy, korzenie, liście i łodyga) oraz okresu zbioru (wiosna, lato, jesień i zima). W metanolowym ekstrakcie z młodych pędów *Carpobrotus edulis* zidentyfikowano floretynę, kwercetynę, katechinę, procyanidynę B2, (-)-epicatechinę i kwas hydroksycynamonowy, natomiast procyanidynę B2 i (-)-epicatechinę oznaczono w ekstrakcie z korzenia rośliny [Hafsa i wsp. 2016, Falleh i wsp. 2012].

Alkoholowy ekstrakt z pędów *Carpobrotus edulis* poddano także badaniom *in vitro* pod kątem jego właściwości przeciwutleniających oraz ocenie aktywności fotoprotekcyjnej. W celu oceny aktywności fotoprotekcyjnej przygotowano emulsje kosmetyczne typu olej w wodzie (o/w) zawierające ekstrakt o różnych stężeniach: 2% i 10%. Aktywność przeciwrodnikową badanych kremów oceniano metodą *in vitro* poprzez reakcje z DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Preparat zawierający największą ilość ekstraktu wykazywał największą aktywność względem rodnika DPPH w porównaniu z pozostałymi preparatami. Świadczy to o większej aktywności przeciwrodnikowej wynikającej z obecności związków fenolowych, szczególnie katechiny i procyanidyny B2, które są silnymi dezaktywatorami wolnych rodników.

Aby skutecznie zapobiegać uszkodzeniom skóry wywołanym przez promieniowanie UV, konieczny jest szeroki zakres jego absorpcji. Na podstawie analizy widma UV badanego ekstraktu podjęto próby oszacowania SPF. Analiza spektrofotometryczna w obszarze UV wykazała, że wodny ekstrakt z liści *Carpobrotus edulis* absorbuje promieniowanie w zakresach UV-C (190–290 nm), UV-B (290–320nm) i UV-A (320–400 nm). Wartości SPF surowego ekstraktu, obliczone na podstawie wzoru Mansura, wynosiły 1,426 i 6,996 odpowiednio dla stężenia 200 i 1000 µg/ml. Uzyskana wartość SPF zbliżona do 7 przy stężeniu 1000 µg/ml odpowiadająca 80–90 procentom blokady UV wskazuje na dużą aktywność fotoochronną tego ekstraktu. Emulsje kosmetyczne zawierające ekstrakt o stężeniu 2% i 10% wykazały wartości SPF odpowiednio o 0,646 i 1,626 wyższe od preparatu bazowego. Ponadto ekstrakt roślinny dodany do emulsji o/w w stężeniu 10% wykazywał dobrą aktywność przeciwutleniającą (≈70%) i wartość SPF 1,7, co odpowiada około 50 procentom blokady UV [Lassoued i wsp. 2021].

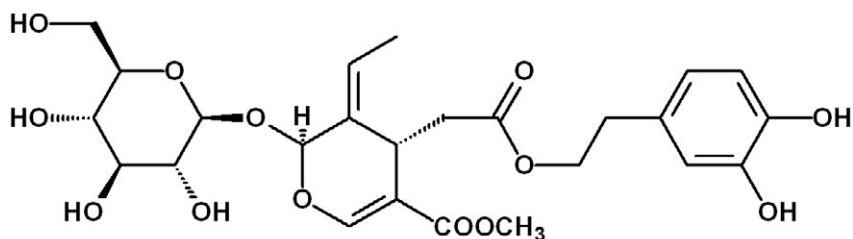
Marcetia taxifolia to endemiczna roślina północno-wschodniej Brazylii, należąca do rzędu mirtowców. Zawiera znaczną ilość flawonoidów i jest szczególnie bogata w kwercetynę (rycina 42).



Rycina 42. Struktura kwercetyny

Potwierdza to analiza HPLC alkoholowego ekstraktu z liści *Marcetia taxifolia* przeprowadzona przez Costę i wsp. [2015]. Podjęli oni także badania mające na celu potwierdzenie antyoksydacyjnego działania analizowanego ekstraktu za pomocą testu DPPH. Dla etanolowego ekstraktu z *Marcetia taxifolia* oznaczono również SPF metodą spektrofotometryczną przy wykorzystaniu równania Mansura. Aby określić stopień aktywności fotoprotekcyjnej przygotowano wzorcową emulsję typu o/w zawierającą benzofenon-3 jako filtr chemiczny UV oraz cztery próby badawcze – emulsje typu o/w zawierające ekstrakt z *Marcetia taxifolia* o stężeniu: 5, 10, 20 i 30%. Wartości SPF badanych ekstraktów były zależne od stężenia – jego wzrost powodował wzrost SPF. Osiągnięto również zadawalającą aktywność przeciwsłoneczną, wymaganą prawem brazylijskim dla kosmetyków fotoprotekcyjnych (SPF > 6), przekraczając minimum określone przez ANVISA (Brazilian Health Regulatory Agency). Ponadto wykazano, że preparaty zawierające ekstrakt etanolowy *Marcetia taxifolia* osiągały wartości SPF zbliżone do często stosowanego w przemyśle kosmetycznym filtra chemicznego benzofenonu-3. *Marcetia taxifolia* ma więc duży potencjał do wykorzystania jako naturalny filtr przeciwsłoneczny.

Aktywność fotoprotekcyjną potwierdzono także w przypadku ekstraktu z liści oliwki europejskiej (*Olea europaea*) [da Silva i wsp. 2019]. Liście oliwne, stanowiące produkt odpadowy, zawierają więcej polifenoli niż oliwa z oliwek. Składnikiem polifenolowym o najwyższej zawartości w badanym ekstrakcie jest oleuropeina (rycina 43) należąca do pochodnych kumaryny zwanych sekoirydoidami.



Rycina 43. Struktura oleuropeiny

Aby określić potencjał fotoochronny liści *Olea europaea* przeprowadzono badania *in vitro* na 20-procentowym standaryzowanym ekstrakcie oleuropeiny. Oprócz analizy absorpcji promieniowania UV oraz badania aktywności antyoksydacyjnej przy zastosowaniu testu DPPH, oceniono także potencjalne działanie fotoochronne i antymutagenne oleuropeiny po naświetlaniu sztucznym światłem UV, symulującym dawkę promieniowania odpowiadającą ekspozycji środowiskowej w Brazylii latem. Ponadto przygotowano promieniochronne emulsje kosmetyczne typu o/w służące jako preparaty porównawcze. Emulsje te zawierały chemiczne filtry UV: benzoesan hydroksybenzoiloheksylu (INCI: *Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate*), metoksy cynamonian etyloheksylu (INCI: *Ethylhexyl Methoxycinnamate*) oraz Octocrylene. Następnie wprowadzano do nich badany ekstrakt, celem zbadania SPF metodą transmitancji spektralnej UV. Uzyskane wyniki porównano z wartościami SPF dla analogicznych emulsji typu o/w zawierających niestandaryzowany ekstrakt *Polypodium leucotomos* oraz resweratrolu. W zakresie niższych stężeń ekstrakt z liści *Olea europaea* uzyskał wyższe wartości SPF, nawet w porównaniu z resweratrolem, który wykazuje silną absorpcję w zakresie UV-B. W odniesieniu do aktywności przeciwutleniającej, zdolność oleuropeiny do dezaktywacji rodnika DPPH jest podobna do resweratrolu i wyższa niż witaminy C i E. Potwierdzono także, że ekstrakt z liści oliwnych wykazuje wyższą aktywność przeciwutleniającą niż sama oleuropeina. Oprócz oleuropeiny zawiera on także inne związki polifenolowe, które odpowiadają za jego wysoką aktywność antyoksydacyjną, wykazując synergiczne działanie. To badanie potwierdza słuszność stosowania ekstraktu z liści oliwnych w recepturze preparatów promieniochronnych jako naturalnych składników

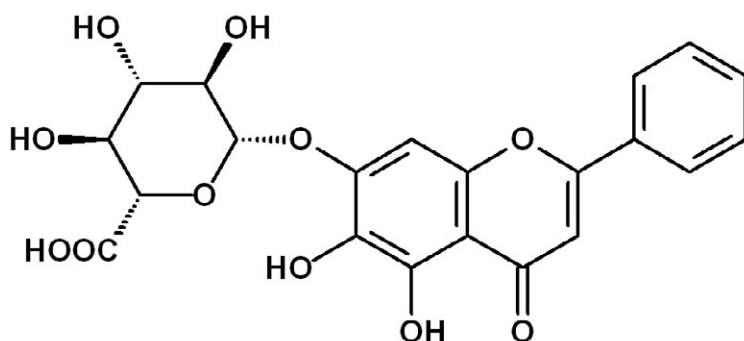
o działaniu fotoprotekcyjnym i antyoksydacyjnym, wykazujących efekt synergiczny w połączeniu z chemicznymi filtrami UV, skutkujący poprawą SPF [da Silva i wsp. 2019].

Sprawdzono także działanie fotoochronne jedenastu ekstraktów wodno-metanolowych z naturalnie występujących na wyspie Cejlon roślin o działaniu leczniczym, stosowanych w tradycyjnej medycynie. W celu określenia zdolności fotoprotekcyjnych badanych ekstraktów zmierzono absorpcję UV, a SPF obliczono zgodnie z równaniem Mansura. Za materiał referencyjny posłużyły dwa dostępne na rynku produkty ochrony przeciwsłonecznej zawierające chemiczny filtr UV (INCI: *Benzophenone-4*) i filtr mineralny – TiO_2 (INCI: *Titanium Dioxide*). Spośród przebadanych ekstraktów, sześć wykazało $\text{SPF} \geq 25$, były to ekstrakty z: *Atalantia ceylanica*, *Hibiscus furcatus*, *Leucas zeylanica*, *Mollugo cerviana*, *Olox zeylanica* i *Ophiorrhiza mungos*. Uzyskane wartości SPF były wyższe niż porównawcze wartości SPF dwóch komercyjnych kremów fotoochronnych [Napagoda i wsp. 2016]. Podsumowując, przebadane ekstrakty roślinne poza działaniem fotoochronnym wykazywały także działanie antyoksydacyjne, co potwierdza, że opracowany na ich podstawie filtr przeciwsłoneczny może wzmocnić system obronny organizmu przed powstawaniem wolnych rodników indukowanych promieniowaniem UV, zapewniając w ten sposób lepszą fotoochronę.

Preparaty roślinne o wielokierunkowym działaniu fotoprotekcyjnym

Drugie podejście do oszacowania działania ochronnego polifenoli przed niekorzystnym wpływem promieniowania ultrafioletowego polega na bezpośrednich obserwacjach skóry ludzkiej lub zwierzęcej pokrytej maścią lub kremem zawierającym badane związki chemiczne, naświetlanej promieniami o odpowiedniej długości fali. Ta grupa metod jest określana mianem *in vivo*, gdyż obejmuje badania z udziałem organizmów żywych. Wnioski można wyciągać na podstawie makroskopowej obserwacji skóry, zmian mikroskopowych, a także zmian stężeń metabolitów. SPF, zgodnie z międzynarodową procedurą, oznaczany jest na podstawie porównania minimalnych dawek promieniowania UV powodujących rumień na skórze (MED, ang. *minimum erythemat dose*) chronionej badaną mieszaniną filtrów oraz na skórze nie chronionej.

Tarczycza bajkalska (*Scutellaria baicalensis*) to wieloletnia roślina z rodziny *Lamiaceae*, wykorzystywana powszechnie w tradycyjnej medycynie chińskiej, gdzie znana jest pod nazwą *Huang Qin*, co oznacza „złote zioło”. Naturalnie występuje na obszarze środkowej i wschodniej Azji – Syberia, północne Chiny, Półwysep Koreański i Japonia. Szczególnie cenny dla kosmetologii jest wyciąg z korzenia tarczyczy bajkalskiej, który wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne. Ekstrakt bogaty jest w związki flawonoidowe, z których najistotniejsze to bajkalina (rycina 44), bajkaleina i wagonina.



Rycina 44. Wzór strukturalny bajkaliny

Koreańscy naukowcy podjęli próby określenia antyoksydacyjnego i fotoprotekcyjnego działania butanolowego ekstraktu z korzenia *Scutellaria baicalensis* [Seok i wsp. 2016]. Przeprowadzone badania wykazały silną absorpcję promieniowania UV oraz wysoką aktywność neutralizowania wolnych rodników wobec DPPH i ABTS+. Aby potwierdzić skuteczną ochronę przed promieniowaniem UV ekstraktu z korzenia *Scutellaria baicalensis*, dokonano porównania aktywności dwóch kremów: jeden zawierał mineralny filtr UV – tlenek cynku (ZnO) w stężeniu 24%, a drugi poza ZnO został wzbogacony w 5-procentowy ekstrakt z korzenia tarczyczy bajkalskiej. Badanie *in vivo* przeprowadzone na ludziach potwierdziło, że oba kremy nie powodowały podrażnień skóry, a krem zawierający wyłącznie ZnO wykazywał wartość SPF 17,8. W przypadku kremu wzbogaconego w 5-procentowy ekstrakt z *Scutellaria baicalensis* wartość SPF wzrosła do 22,7 [Peres i wsp. 2018]. Badanie to dowodzi, że ekstrakty z korzenia tarczyczy bajkalskiej są przydatne jako bezpieczne dodatki kosmetyczne zapewniające ochronę przed promieniowaniem UV.

Kwas ferulowy jest związkiem fenolowym powszechnie występującym w jadalnych i uprawnych organizmach roślinnych. W celu zbadania promieniochronnych właściwości tego kwasu brazylijscy badacze sporządzili dwie emulsje zawierające standardową mieszankę dwóch ogólnie dostępnych filtrów organicznych: *Ethylhexyl triazone* (5%) oraz *Bis-ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine* (10%), przy czym druga emulsja zawierała dodatkowo kwas ferulowy o stężeniu 1%. Następnie oznaczono wartość SPF metodą *in vivo* z udziałem ochotników, którym zaaplikowano badane emulsje na fragment skóry pleców, którą następnie poddawano naświetlaniu lampą UV o spektrum zbliżonym do światła słonecznego. Emulsje zawierające dodatek kwasu ferulowego wykazywały SPF = 26, czyli wyższy o ponad 6 jednostek w porównaniu z emulsjami bez kwasu ferulowego, co daje 32-procentowy wzrost SPF. Zmierzono również współczynnik UVA-PF (*UVA-protection factor*) – ochrony dla światła UV-A, który da się wyznaczyć wyłącznie metodą *in vitro* na podstawie pomiarów transmitancji w zakresie 290–400 nm. Dla emulsji z kwasem ferulowym uzyskano wartość UVA-PF 14, tj. o 24% wyższą w porównaniu z emulsją bez tego składnika. Tak znaczny wzrost przy niewielkiej zawartości kwasu ferulowego nie może wynikać wyłącznie z absorpcji UV przez ten składnik, lecz świadczy o wystąpieniu efektu synergicznego [Peres i wsp. 2018]. Wyjaśnieniem tego efektu może być silne działanie przeciwutleniające kwasu ferulowego, które zostało potwierdzone dodatkowo pomiarami porównawczymi aktywności przeciwutleniającej metodą *ex vivo*, polegającą na pomiarze stopnia peroksydacji lipidów w próbkach zewnętrznej warstwy *stratum corneum* ochotników biorących udział w badaniu.

Podobne pomiary porównawcze przeprowadzono w celu zbadania wpływu glikolowego ekstraktu z owoców występującej naturalnie w Brazylii palmy euterpy warzywnej (*Euterpe oleracea*), czyli jagód açai (rycina 46, s. 146). Wartości SPF zostały oznaczone metodą *in vivo* z udziałem ochotników. Przeprowadzono badania porównawcze dla receptur zawierających standardowe mieszanki filtrów organicznych: 7% PABA i 3% Benzophenone-3, z dodatkiem oraz bez badanego ekstraktu, uzyskując SPF odpowiednio 25,3 i 22,5. Natomiast UVA-PF wyliczono metodą *in vitro* na podstawie pomiarów transmitancji w standardowym zakresie UV-A. Okazało się, że dodatek ekstraktu z jagód açai, zawierający duże stężenie polifenoli, w tym przede wszystkim antocyjanów, nie powodował

znaczącego podwyższenia SPF przy nie zmienionym stosunku SPF do UVA-PF [Daher i wsp. 2014]. Biorąc pod uwagę znane i potwierdzone przez wielu autorów działanie przeciwutleniające jagód ąca, słabe wyniki zastosowania ekstraktu w recepturach kosmetyków promieniochronnych mogą być zaskakujące. Autorzy publikacji tłumaczą ten efekt trudnościami w doborze oraz wpływem składników pomocniczych, w tym polimerycznych środków powierzchniowo czynnych, zapewniających stabilność badanych emulsji.

W przypadku oznaczenia SPF dla ekstraktów z zielonej oraz białej herbaty metodą *in vivo* grupa badaczy z USA zastosowała inną procedurę. Sporządzono żele zawierające badane ekstrakty, bez dodatku handlowych filtrów UV. Fragmenty skóry ochotników naświetlano przy pomocy lamp UV symulujących promieniowanie słoneczne aż do osiągnięcia MED. Poprzez porównanie z próbami kontrolnymi wykazano, że obie mieszanki posiadają SPF zbliżony do 1, przy czym dla białej herbaty ta wartość jest nieznacznie wyższa, co pozostaje w zgodzie z danymi wskazującymi na wyższe stężenie polifenoli, w tym głównie galusanu 3-epigallokatechiny, w ekstrakcie z białej herbaty [Camouse i wsp. 2009]. Autorzy prowadzili równoległe analizę ilości uszkodzonych przez ultrafiolet komórek układu odpornościowego, w tym komórek Langerhansa, na podstawie badań antygenowych białka CD1a, a także badania stopnia uszkodzeń DNA pod wpływem promieniowania UV na podstawie zawartości 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny, będącej produktem utlenienia kwasów nukleinowych z DNA. Badania wykazały, że naniesione na skórę mieszanki zawierające ekstrakty zarówno zielonej, jak i białej herbaty, w znacznym stopniu zapobiegają negatywnym zmianom zachodzącym w skórze pod wpływem promieniowania ultrafioletowego. Zdaniem autorów świadczy to o tym, że działanie promieniochronne obydwu ekstraktów herbacianych nie wynika tylko z absorpcji promieniowania UV przez składniki ekstraktu, ale dowodzi oddziaływania polifenoli na funkcjonowanie układu odpornościowego wewnątrz skóry.

Wcześniejsze badania właściwości promieniochronnych ekstraktu z zielonej herbaty, również przeprowadzone w USA z udziałem grupy ochotników, wykazały działanie ochronne tego ekstraktu przed negatywnym wpływem ultrafioletu na negatywne zmiany histologiczne w skórze, w tym zniszczenie komórek przez promienie UV, uszkodzenia komórek Langerhansa, a także uszkodzenia DNA.

Aplikacja na skórę roztworów mieszanki wyselekcjonowanych polifenoli z zielonej herbaty, w tym galusanu 3-epigallokatechiny, galusanu 3-epikatechiny, a także (-)-epigallokatechiny i (-)-epikatechiny, pozwalała na znaczne obniżenie poziomu apoptozy keratynocytów przy naświetlaniu lampą UV emitującą światło słoneczne w dawkach dwukrotnie przekraczających dawkę MED, oznaczaną indywidualnie dla pacjentów. Przeprowadzono także porównanie działania promieniochronnego powyższej mieszanki z każdym z wyizolowanych, czystych składników. Oryginalna mieszanka polifenoli dała najlepszy wynik obniżenia rumienia na skórze pod wpływem dawki UV równej dwukrotności MED; dość dobre wyniki uzyskano również przy zastosowaniu obu katechin z przyłączoną resztą kwasu galusowego. Natomiast katechiny pozbawione reszty kwasu galusowego działały znacznie słabiej [Elmets i wsp. 2001]. Ważna dla zrozumienia mechanizmu działania tych związków była obserwacja, że galusany katechin zapewniają ochronę przed szkodliwym wpływem zarówno promieniowania UV-B, jak i UV-A, pomimo tego, że widmo absorpcyjne tych związków wykazuje słabą absorpcję w zakresie UV-A. Świadczy to o występowaniu dodatkowego mechanizmu ochronnego, który może wpływać na synergię działania z tradycyjnymi filtrami organicznymi, ale nie polega na absorpcji promieniowania.

Interesujące wyniki uzyskano podczas badań odwaru z hipokotyli, czyli dolnych części łodyg rosnącej na dużych wysokościach w peruwiańskich Andach endemicznej rośliny pieprzycy peruwiańska (*Lepidium meyenii*), zwanej lokalnie macą. Badania zostały przeprowadzone na znieczulonych szczurach szczepu Wistar, których wygolone fragmenty grzbietów były naświetlane promieniami ultrafioletowymi w różnych, ściśle określonych zakresach, w tym oddzielnie UV-A, UV-B oraz UV-C. Zidentyfikowano zmiany histologiczne zachodzące pod wpływem długotrwałego naświetlania u badanych szczurów, m.in. nienaturalne zwiększenie grubości naskórka. Podanie na skórę szczurów wodnego odwaru z *Lepidium meyenii* zapobiegało negatywnym zmianom zachodzącym w naskórku dla wszystkich trzech badanych zakresów ultrafioletu. Szczegółowe pomiary rozrostu naskórka szczurów wykazały, że odwar z macy zapewnia wyższy stopień ochrony niż komercyjnie dostępny filtr o SPF 30, użyty w próbach kontrolnych. Biorąc pod uwagę wyjątkowo szeroki zakres ochrony przed promieniami UV badanego ekstraktu, obejmujący także promieniowanie UV-C, ekstrakt z *Lepidium meyenii*

może być uwzględniany jako cenny składnik recepturowy. Wykorzystany do badań hipokotyl badanej rośliny jest jadalny i znany w lokalnej medycynie naturalnej. Autorzy zwracają uwagę, że pieprzyca peruwiańska rośnie w Andach, na wysokościach przekraczających 4000 m n.p.m., w warunkach zwiększonego narażenia na promieniowanie UV-C, co wpływa na podwyższenie zawartości substancji ochronnych w roślinach, w tym polifenoli. Na skład ekstraktu wpływał także sposób jego przygotowania, gdyż odwar o najlepszych właściwościach promieniochronnych posiadał zawartość polifenoli wynoszącą 1,36 g związków polifenolowych na 100 g suszonego i liofilizowanego ekstraktu, czyli o 75% wyższą od ekstraktu sporządzanego na zimno, ale także wykazywał nieco inne widmo absorpcyjne w zakresie UV w porównaniu z ekstraktem otrzymanym w niskiej temperaturze. Może to świadczyć o przemianach chemicznych w cząsteczkach polifenoli zachodzących pod wpływem temperatury. Autorzy spektrofotometrycznie oznaczyli przybliżoną zawartość polifenoli, przy zastosowaniu pirogalolu jako wzorca, jednak nie dokonali identyfikacji składników, wskazując, że drugim istotnym składnikiem mającym wpływ na niezwykle właściwości odwaru z *Lepidium meyenii* jest glukozynolan benzylu [Gonzales-Castañeda i Gonzales 2008].

Jako przetworzony materiał pochodzenia roślinno-zwierzęcego można traktować również propolis, czyli kit pszczele. Gatunki propolisu otrzymywane w różnych regionach świata różnią się składem. Wodno-alkoholowy ekstrakt brazylijskiego czerwonego propolisu o wysokiej zawartości flawonoidów, w tym głównie formononetyny, daidzeiny oraz biochaniny, po usunięciu rozpuszczalnika został wprowadzony w skład emulsji testowanych pod względem ochrony przed promieniowaniem UV na szczurach albinosach szczepu Holtzman. Badane emulsje naniesiono na wygolone fragmenty grzbietów gryzoni, które następnie poddawano naświetlaniu ultrafioletem. Dla porównania, analogiczne eksperymenty wykonano z dodatkiem dostępnego handlowo filtra *Benzophenone-3*. Na podstawie analizy zmian patologicznych powstałych na skórze gryzoni ustalono, że ekstrakt z propolisu wykazywał działanie ochronne w stopniu bardzo zbliżonym do szeroko stosowanej pochodnej benzofenonu. Autorzy badań sugerują, że wysoki stopień ochrony przed poważnymi skutkami naświetlania dużymi dawkami promieniowania UV, obejmującymi zarówno naskórek, jak i skórę właściwą, mogą wynikać nie tylko z właściwości absorpcyjnych polifenoli, ale również z ich działania

przeciwzapalnego [Batista i wsp. 2018]. Dodatkowym argumentem potwierdzającym aktywność przeciwzapalną jest stwierdzenie obniżania w naświetlanych promieniowaniem UV fragmentach skóry poziomu enzymu mieloperoksydazy, która jest uwalniana w reakcjach zapalnych.

Informacje istotne dla zrozumienia działania biologicznego polifenoli można uzyskać także metodami *in vitro*. Taką metodologię zastosowano podczas badania działania promieniochronnego wodno-etanolowego ekstraktu z pestek czerwonych winogron uprawianych w Rumunii. Użytkano ekstrakt zawierający około 3400 mg związków fenolowych na litr, w przeliczeniu na kwas galusowy. Głównymi składnikami ekstraktu były katechiny, procyanidyny oraz antocyjanidyny, a także wolny kwas galusowy. Otrzymany ekstrakt dodawano do hodowli komórkowych keratynocytów HaCaT, które naświetlano lampą UV emitującą szerokopasmowo w zakresie UV-B, po czym badano stopień przeżywalności komórek, jak również stężenia metabolitów, w tym malonodialdehydu będącego produktem wolnorodnikowego utlenienia lipidów. Ustalono, że ekstrakt z pestek czerwonych winogron posiada właściwości promieniochronne, a jego dodatek znacznie zmniejsza procent apoptozy hodowlanych komórek pod wpływem światła UV. Ponadto badany ekstrakt powoduje znaczne obniżenie poziomu malonodialdehydu w naświetlanych promieniami UV liniach komórkowych w porównaniu z próbą kontrolną, co jest dowodem na silne działanie przeciwutleniające składników ekstraktu [Perde-Schrepler i wsp. 2013]. Wynik ten jest potwierdzeniem wcześniejszych badań aktywności antyoksydacyjnej przy udziale stabilnego rodnika DPPH.

Pod względem właściwości promieniochronnych został przebadany również etanolowy ekstrakt z kwiatów drzewa herbacianego, zwanego również kajeputowym (*Melaleuca leucadendron*), a więc rośliny powszechnie występującej w Australii oraz południowo-wschodniej Azji. Uzyskany ekstrakt posiadał wysoką zawartość związków fenolowych, w tym tanin – około 154 mg/1 g ekstraktu, w przeliczeniu na kwas galusowy, natomiast zawartość flawonoidów była znacznie niższa. Właściwości promieniochronne ekstraktu zostały sprawdzone eksperymentalnie metodą *in vitro* z udziałem linii komórkowej keratynocytów HaCaT. Do hodowli komórkowych wprowadzano badany ekstrakt w różnych stężeniach, a następnie naświetlano je ultrafioletem w zakresie UV-B. Autorzy przeprowadzili szereg badań biochemicznych dotyczących stężenia

enzymów oraz metabolitów. Na podstawie badań poziomu kilku enzymów metodą *western blot* wykazano, że badany ekstrakt blokuje wzrost poziomu enzymu cyklooksigenazy COX-2, który występuje w przypadku wzrostu stężenia wolnych rodników wewnątrz komórek, pośrednio przyczyniając się do obniżenia stanów zapalnych, jak również hamuje aktywność tego enzymu [Bianchini Silva i wsp. 2020]. Dane dla podobnych związków [Al.-Sayed i wsp. 2020] wskazują, że polifenole z grupy tanin oddziałują na układ odpornościowy poprzez obniżanie poziomu niektórych cytokin, w tym IL-1 β , IL-6, TNF- α , a także obniżanie aktywności enzymu syntazy tlenu azotu (iNOS) oraz prostaglandyn.

Podsumowanie

Powyższe dane literaturowe pozwalają na syntetyczne spojrzenie na promieniochronne działanie związków polifenolowych. W literaturze dostępnych jest bardzo wiele przykładów korzystnego działania polifenoli na organizm ludzki, w szczególności na skórę człowieka poddawaną działaniu światła UV, pochodzącego tak ze światła słonecznego, jak i ze sztucznych źródeł. Zdolność polifenoli do przenikania do głębszych warstw skóry, różna dla różnych przykładów, powoduje, że korzyść z ich działania promieniochronnego objawia się zarówno na powierzchni skóry, w postaci podwyższenia zewnętrznej ochrony przed promieniowaniem UV dającej się opisać przy pomocy SPF, jak i wewnątrz skóry, obniżając stres oksydacyjny i podwyższając barierę ochrony przeciwnowotworowej.

Działanie promieniochronne polifenoli opisywane jest często jako synergiczne względem dopuszczonych do stosowania w kosmetykach filtrów UV. Różne grupy badaczy, poprzez zastosowanie przyjętych metodologii badań, zwracają uwagę na wybrane aspekty działania ochronnego polifenoli. Jednak zestawione razem dane wskazują na wielokierunkowe działanie tych związków, obejmujące zarówno działanie fizyczne, czyli absorpcję ultrafioletu przez układy chromoforowe cząsteczek, działanie chemiczne poprzez reakcje utleniania–redukcji prowadzące do dezaktywacji wolnych rodników, a także działanie biologiczne, a więc wpływ na procesy biochemiczne zachodzące wewnątrz komórek naświetlanych ultrafioletem. Przy obecnym stanie wiedzy można wyróżnić dwa główne

rodzaje działania biologicznego polifenoli związane z ich działaniem promieniochronnym: przeciwwzapalne oraz immunomodulacyjne. Z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że bardziej zaawansowane badania mogą dostarczyć dowodów na kolejne mechanizmy działania polifenoli w warunkach stresu oksydacyjnego. Przykładowo, pojawiały się sugestie, że polifenole mogą wpływać na przyspieszenie mechanizmu naprawczego DNA uszkodzonego podczas długotrwałego naświetlania ultrafioletem, jednak mechanizm takiego działania nie został do końca poznany.

Biorąc pod uwagę, że poziom ochrony przed promieniowaniem UV oferowany przez ekstrakty roślinne oraz czyste polifenole nie zawsze jest wystarczający do samodzielnego zapewnienia wysokiej ochrony, polifenole powinny stanowić cenne dodatki skutecznie podnoszące poziom ochrony kosmetyków promieniochronnych. Polifenole stanowią, obok powszechnie stosowanych filtrów mineralnych i organicznych, dodatkowy filar ochrony niezbędny dla skutecznego zabezpieczenia naszej skóry przed wszelkimi skutkami wynikającymi z przyjmowania dawek promieniowania UV.



Rycina 45. Jagody borówki bagiennej (*Vaccinium uliginosum*).
Fot. Tomasz Wilk

ROZDZIAŁ 6.

BIOLOGIA, EKOLOGIA I MOŻLIWOŚCI UPRAWY MNIJEJ ZNANYCH ROŚLIN BOGATYCH W POLIFENOLE

Adam Kapler

„Łąki Kwietne Karol Podyma”, ul. Łowicka 10 b, 05-870 Bolimów, Polska.
PAN Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie,
ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa, Polska. ORCID: 0000-0002-6779-6512

DOI: 10.48269/978-83-66007-99-4-006

Streszczenie

W całej Unii Europejskiej za nader obiecujące źródło polifenoli uważa się pestkowce euterpy warzywnej (*Euterpe oleracea* Mart.), zwane w handlu „jagodami acai”. Przekonanie o ich wysokich walorach zdrowotnych może być jednak błędne. Ogromny potencjał posiadają za to liczne *Ericaceae* rodzące jadalne jagody. W rozdziale omówiono kilka dotychczas nieuprawianych gatunków, jakie warto udowodnić, zwłaszcza *Vaccinium angustifolium* Ait., *Vaccinium myrtilloides* Michx. i kompleks *Empetrum nigrum* L./*Empetrum hermaphroditum* Hagerup. Przedstawiono wyzwania i możliwości uprawy oraz hodowli tych roślin uwzględniając szerokie tło ich biologii i ekologii. Mniej znane wrzosowate nie wymagają mocno torfiastych podłoży, niezbędnych borówce wysokiej i żurawinie wielkoowocowej, co pozwoli zredukować ślad węglowy oraz lepiej chronić ostatnie mokradła Europy. Posiadanie własnych, nowych źródeł polifenoli uczyni Europę mniej zależną od jagód acai oraz pozostałych owoców egzotycznych, co jest istotne w dobie zrywania się łańcuchów dostaw podczas kolejnych fal pandemii.

Słowa kluczowe: *Euterpe oleracea*; *Vaccinium angustifolium*; polifenole; uprawa

Abstract

Biology, ecology and cultivation
of some lesser known edible polyphenole rich plants

In the entire European Union the drupes of the vegetable euterpa (*Euterpe oleracea* Mart.), known as „acai berries”, are considered to be a very promising source of

polyphenols. However, the belief about their high health values may be wrong. However, numerous *Ericaceae*, producing edible berries, have enormous potential. This chapter discusses a number of heretofore uncultivated species worth domesticating, notably *Vaccinium angustifolium* Ait., *Vaccinium myrtilloides* Michx. and the *Empetrum nigrum* L./*Empetrum hermaphroditum* Hagerup. The challenges and possibilities of their cultivation and breeding were presented against a broad background of their biology and ecology. Less known heather plants do not require highly peaty substrates, necessary for northern highbush blueberry and large-fruited cranberry, which will reduce the carbon footprint and better protect the last European wetlands. Having its own, new sources of polyphenols will make Europe less dependent on acai berries and other exotic fruits, which is important in times when supply chains break down during pandemic waves.

Key words: *Euterpe oleracea*; *Vaccinium angustifolium*; polyphenols; cultivation

Wprowadzenie

Pestkowce euterpy warzywnej (*Euterpe oleracea* Mart.), znane pod handlową nazwą „jagody acai”, są uważane w Unii Europejskiej za cenne źródło polifenoli [Fern 1997, Brondízio i wsp. 2002, Barros i wsp. 2015, de Oliveira i wsp. 2015]. Jednak niezależne badania dietetyczne i biochemiczne weryfikują opinię o wysokim stężeniu polifenoli w jagodach acai i ich aktywności biologicznej, a ogromne walory zdrowotne owoców euterpy okazują się jedynie zręcznym chwytym marketingowym [Kuskoski i wsp. 2006, Gallori i wsp. 2004, Joven i wsp. 2014].

Ogromny, naukowo potwierdzony potencjał posiadają za to liczni przedstawiciele rodziny wrzosowatych (*Ericaceae* Juss.), rodzący jadalne jagody [Prencipe i wsp. 2014, Kalemba-Drożdż, Cierniak i wsp. 2020] (rycina 45, s. 141). W rozdziale omówiono kilka dotychczas nie uprawianych gatunków, jakie warto udomowić, zwłaszcza *Vaccinium angustifolium* Ait., *Vaccinium myrtilloides* Michx. i kompleks gatunków *in statu nascendi* *Empetrum nigrum* L./*Empetrum hermaphroditum* Hagerup. Zaprezentowano wyzwania i możliwości uprawy oraz hodowli tych roślin uwzględniając szerokie tło ich biologii i ekologii.

Euterpa warzywna jako źródło jagód acai

Euterpa warzywna, inaczej warzywnia warzywna (*Euterpe oleracea* Mart., syn. *Catis martiana* Cook, *Euterpe brasiliiana* Oken, *E. beardii* L.H. Bailey, *E. cuatrecasana* Dugand), należy do rodziny palm właściwych

(arekowatych; *Arecaceae* Bercht. & J. Presl.) i podrodziny arekowych *Arecoideae* Beilschmied. Wywodzi się z Ameryki Południowej i stała się intensywnie uprawiana w całej strefie międzyzwrotnikowej pod koniec XX w. Euterpa charakteryzuje się pierzastymi liśćmi osiągającymi do 3,5 m długości zebranymi na szczycie prostego, smukłego pnia, który wyrasta nierzadko na wysokość ponad 25 m. Kwiatostan euterpy jest rozgałęziony, obupłciowy, złożony z setek kwiatów o czerwonej koronie i białym kielichu (rycina 46).

Euterpa warzywna wywodzi się ze stanowisk w nadrzecznych lasach i mokradłach Brazylii, występując na obszarze od Trynidadu i Tobago oraz Wenezueli po Ekwador. Służyła rdzennym mieszkańcom tych ziem, a potem również konkwistadorom jako materiał konstrukcyjny. Kłodziny (pnie palmy) wykorzystywano jako budulec oraz opał, z liści pleciono okrycia, kosze i maty, natomiast „serc palmowych” używano jako warzyw. Spożywano także marynowane i solone kwiatostany. Popularność owoców euterpy jako lekarstwa i pokarmu dla ludzi gwałtownie wzrosła pod koniec XX w. Pod względem botanicznym jagoda acai jest fioletowo-czarnym lub zielonym pestkowcem o średnicy około 25 mm, przypominającym nieco budowę orzecha włoskiego albo pekana. Owoc euterpy zbudowany jest z trzech warstw: na zewnątrz znajduje się skórzaasty egzokarp, dalej włóknisty lub mięsisty, raczej cienki mezokarp, gruby na 1 mm, oraz zdecydowanie bardziej obszerny endokarp stanowiący 60–85% masy całego owocu, który wewnątrz kryje właściwe nasiono mierzące 7–10 mm. W jednym owocostanie może znajdować się około 500–900 owoców. Euterpa zawiązuje owoce przez cały rok, ale zbiera się je zwykle dwukrotnie. Ogromne zapotrzebowanie na sok, pulpę i susz owocowy spowodowało wzrost zainteresowania endocarpem acai wyrzucanym przedtem jako odpad produkcyjny. Wcześniej niestosowane sposoby wykorzystania euterpy to np.: produkcja podłoży dla storczyków i paprotników, jak również szersze użycie tychże „pestek” w kosmetyce oraz analityce chemicznej [Podbielkowski 1989, Murrieta i wsp. 1999, Heinrich i wsp. 2011, Cymerys i wsp. (cop.) 2011].

Stwierdzono, że średnia zawartość polifenoli w owocach euterpy warzywniej jest mniejsza niż w winogronach, mango, aceroli i truskawkach; z kolei właściwości przeciwutleniające komercyjnie dostępnych soków z jagód acai są słabsze niż w przypadku czerwonego wina, soków z borówek i granatu, natomiast podobne do siły przeciwutleniającej



Rycina 46. Jagody acai – owoce euterpy warzywnej (*Euterpe oleracea*) [Saidis 2021]

soków z żurawiny i czeremchy późnej [Kuskoski i wsp. 2006, Seeram i wsp. 2008, Marcason 2009, Joven i wsp. 2014]. Marketingowo promowane informacje o odchudzającym działaniu acai nie są potwierdzone badaniami, a same owoce zawierają spore ilości cukrów [USDA].

Owoce acai mogą być stosowane jako kontrast w diagnostyce obrazowej metodą rezonansu magnetycznego przy badaniach przewodu pokarmowego. Ponadto olej z nasion i endokarpu euterpy (nie z „miąższu”, czyli mezokarpu owoców) jest używany jako składnik fazy olejowej kosmetyków. Natomiast liście euterpy są wciąż szeroko wykorzystywane w lokalnym rzemiośle i handlu [Córdova-Fraga i wsp. 2004, Pacheco-Palencia i wsp. 2008].

Mniej znane krzewinki z rodziny wrzosowatych jako źródło polifenoli

Rodzina wrzosowatych (*Ericaceae*) obejmuje niemal cztery tysiące gatunków krzewinek, rzadziej bylin, pnączy, okazałych krzewów lub niskich drzew, podzielonych na około 126 rodzajów. Kilkanaście z nich odgrywa ważną rolę w architekturze zieleni jako rośliny ozdobne, przede wszystkim rododendrony i azalie (*Rhododendron*) oraz wrzośce (*Erica*). Co najmniej siedem rodzajów (*Acrotriche*, *Arbutus/Arctostaphylos*, *Astroloma*, *Empetrum*, *Gaultheria*, *Gaylussacia*, *Vaccinium/Oxycoccus*) zawiera owoce jadalne dla ludzi. Jednak tylko dwa gatunki można uznać za rośliny uprawne o ponadlokalnym znaczeniu użytkowym: żurawinę wielkoowocową (*Oxycoccus/Vaccinium macrocarpon*) oraz borówkę wysoką (*Vaccinium corymbosum*) [Ruizheng i Stevens 2005, Christenhusz i wsp. 2017: 50].

Jagody wszystkich dotąd zbadanych gatunków borówek w sensie ścisłym (podrodzaj *Vaccinium*, sekcje: *Cyanococcus*, *Myrtilus*, *Vitis-idaea*, *Vaccinium* i *Hemimyrtillus*) okazały się być bogatsze w polifenole od acai, a stężenie polifenoli w owocach żurawiny było niemal identyczne jak u euterpy [Lee i wsp. 2004, Harris i wsp. 2007, Correa-Betanzo i wsp. 2014]. Pestkowce bażyn (*Empetrum*) zawierają tyle samo czynnych biologicznie związków fenolowych co jagody borówek. Zawartość polifenoli oraz ich właściwości biologiczne w owocach pozostałych rodzajów z rodziny wrzosowatych podlegają intensywnym badaniom *in vitro* oraz *in vivo* [Prencipe i wsp. 2014, Roberts i wsp. 2019, Gao i wsp. 2021, Juríková i wsp. 2021].

Borówka wąskolistna, niska
(*Vaccinium angustifolium* Aiton 1789 not Benth. 1840)

Borówka wąskolistna, niska (*Vaccinium angustifolium* Aiton 1789 not Benth. 1840) w stanie naturalnym występuje na północno-wschodnich wybrzeżach Ameryki Północnej. Najdalej na północ sięga do Manitoby i Nowej Fundlandii (Kanada), a na południu i zachodzie spotykana bywa wzdłuż Wielkich Jezior oraz w paśmie Great Smoky Mountains (zachodnie Appalachy). Jest owocem stanu Maine. Występuje w lasach i odgrywa ważką rolę biocenotyczną jako pokarm ssaków (od baribali i kojotów po szopy i ursy) oraz ptaków (od bielików po drobne ptaki śpiewające) [Vander Kloet 1988, 2009, Vander Kloet i Dickinson 2009].

Vaccinium angustifolium jest krzewinką bardzo podobną do borówki wysokiej, czernicy i łochyni. Od pierwszej z wymienionych różni się niższym wzrostem oraz występowaniem na stanowiskach suchszych, o mineralnej glebie [Vander Kloet 1998, 2009, Vander Kloet i Dickinson 2009, Correa-Betanzo i wsp. 2014].

Jagody *V. angustifolium* nadal są pozyskiwane przede wszystkim ze stanu dzikiego. To doskonały przykład gatunku połowicznie udomowionego. Już rdzenni Amerykanie prowadzili półprawy borówki wąskolistnej, protegując tę roślinę poprzez planowe wypalanie jej konkurentów i zabezpieczając plony przed niedźwiedziami. Obecnie właściciele borowczysk tego gatunku używają repelentów oraz nagrań głosów ptaków szponiastych celem odstraszenia roślinożerców. Na liściach *V. angustifolium* żeruje wiele gatunków motyli nocnych. W regionach, gdzie wypalanie byłoby niebezpieczne dla drzewostanów i budynków stosuje się rozmaite formy koszenia mechanicznego lub ręcznego, połączone z karczowaniem drzew i krzewów [Gibbons 1962].

Obecnie szereg krajów prowadzi prace hodowlane wykorzystując borówkę wąskolistną oraz jej mieszańce. Krzyżowanie tego gatunku z wcześniej udomowioną borówką wysoką dało kultywary, jak ‘Alvar’ i ‘North Blue’, rosnące na bardziej mineralnych, mniej kwaśnych podłożach [Riihinen i wsp. 2008]. Mieszańce te dziczeją w Europie Zachodniej od około 20 lat, wnikając na osuszone torfowiska wysokie i przejściowe [Essl 2004].

Oprócz owoców eksportowanych do Japonii i Niemiec w postaci soku i mrożonek, borówka wąskolistna dostarcza także miodu. W czasie kwitnienia bogatych populacji *V. angustifolium* (gdy tylko zakwitnie 10–20%

pędów generatywnych w danym miejscu) stawia się na nich obwoźne pasieki w zagęszczeniu 1–2 ule na 1 akr, po czym zostawia się pszczele rodziny na około 2 tygodnie. Niektórzy posiadacze borówczysk tego gatunku wykorzystują sprowadzone z Eurazji trzmiele jako zapylacze. Pozostają one bowiem nie tylko aktywne podczas zimniejszej i bardziej dżdżystej pogody niż pszczoła miodna, lecz także wydajniej zapylają kwiaty borówki, wykorzystując mechanizm zapylania wibracyjnego (ang. *buzz-pollination*). Wykorzystanie trzmieli rodzimych w Ameryce Północnej stało się trudne wskutek epidemii nosemozy, spowodowanej łamaniem przepisów kwarantannowych przy wypożyczaniu amerykańskich owadów do Eurazji [Cameron i wsp. 2011, Cordes i wsp. 2012]. Trwają prace nad udomowieniem szeregu gatunków pszczół samotnych (np.: *Andrena carlini* oraz *Colletes inaequalis*) jako jeszcze lepszych zapylaczy borówki niskiej [Javorek i wsp. 2002].

Czernica amerykańska – borówka kanadyjska, aksamitna
(*Vaccinium myrtilloides* Michx.)

Czernica amerykańska (*Vaccinium myrtilloides* Michx.) odznacza się bardzo rozległym, a przez to dość nietypowym rozmieszczeniem, występuje bowiem jednakowo często w całej Ameryce Północnej, tak na wybrzeżach atlantyckich, jak pacyficznych. Morfologicznie oraz ekologicznie bywa łądząco podobna do znanej nam z Eurazji, choć występującej dziko także na zachodnich, pacyficznych wybrzeżach Kanady i USA, borówki czernicy (*V. myrtillus* L.). Odbiega od niej m.in.: przeciętną wysokością (*V. myrtillus* do 0,3 m, *V. myrtilloides* do 0,5 m), barwą kwiatów (zielonkawo-różowe do różowo-białych u naszej czernicy, czysto białe u borówki kanadyjskiej), liczbą i ułożeniem kwiatów, a potem jagód na pędach (u *V. myrtillus* kwiaty, a następnie owoce wyrastają pojedynczo, u borówki amerykańskiej w skupieniach po 4–12), a przede wszystkim aksamitnym w dotyku owłosieniem spodniej strony liści oraz młodych gałązek [Vander Kloet 1998, 2009, Vander Kloet i Dickinson 2009] (rycina 47).

Wywar z pędów czernicy amerykańskiej działa silnie przeczyszczająco. Rdzenni Amerykanie używali go jako środka poronnego, ułatwiającego poród i wydalenie łożyska, a także przy nieregularnych miesiączkach [Strike 1994].



Rycina 47. *Vaccinium myrtilloides*.
Fot. Adam Kapler

Czernica amerykańska, oferowana jako: *brimbelle*, *pourriot*, *raisin des bois* czy *teint-vin et vaciet*, pozyskiwana jest głównie w Quebecu. Nadmierne pozyskanie z wolnej przyrody i utrata siedlisk sprawiły, że umieszczono ją na czerwonych listach gatunków ginących w amerykańskich stanach: Waszyngton, Indiana, Iowa, Ohio oraz Connecticut [Gibbons 1962].

Borówka cuchnąca, borówka kamczacka, klopówka (*Vaccinium praestans* Lamb.)

Borówka cuchnąca (*Vaccinium praestans* Lamb.) to subendemit Kamczatki, spotykany również na nielicznych, rozproszonych stanowiskach na Alasce, Sachalinie, Kurylach, wyspach Hokkaido i Honsiu oraz w Kraju Chabarowskim i Primorju. Zasiedla torfowiska i podmokłe lasy różnego typu – od liściastych po tajgę jodłową i sosnową, preferując drzewostany o puszczańskim charakterze, obfitujące w wielkogabarytowe martwe drewno. Najlepiej rozwija się na glebach piaszczystych lub gliniastych, o pH od 4,5 do 6,5. Po dodaniu wapnia do podłoża choruje i zamiera. Preferuje mocne, pełne słońce, choć wytrzyma półcień. Gleby na których występuje muszą być stale wilgotne, jednak dość przepuszczalne. Zbyt długo stagnująca w torfach woda niezbyt odpowiada temu gatunkowi borówki [Kawecki i Bieniek 2002, Kostrykina 2019].

Klopówka to wolno rosnąca krzewinka o liściach okazalszych niż u pokrewnych, borealnych borówek. W Japonii i Rosji ceni się ją przede wszystkim jako roślinę okrywową i dekoracyjną, o ślicznie przebarwiających się na fioletowo bądź amarantowo liściach [Fern 1997, Hummer i Durst 2007].

Jasnoczerwone jagody borówki kamczackiej mają 8–12 mm średnicy i cenione są za smak oraz dużą zawartość soku. Nie wszystkim jednak podoba się ich ostra woń, przypominająca pluskwy lub ludzkie odchody [Fern 1997, Kawecki i Bieniek 2002, Stepanov i wsp. 2016, Salikova i wsp. 2019, Gur'anova 2019].

Borówka azorska, *uva do mato*, *uva da serra*
(*Vaccinium cylindraceum* Sm.)

Borówka azorska (*Vaccinium cylindraceum* Sm.) to endemit Azorów (prócz Gracioso) należący do podrodzaju *Hemimyrtillus*, coraz chętniej uprawiany w Polsce, m.in. w Ogrodzie Botanicznym w Powsinie. Jest to wysoki krzew (w klimacie śródziemnomorskim uzyskujący do 3, a nawet 5 m wysokości) o warunkowo zimotrwałych liściach. Na Azorach zwykle przebarwia się i gubi listowie w grudniu. Występuje powyżej 300 m n.p.m., w zaroślach wrzosców i jałowców, w miejscach o wilgotnym i chłodnym mikroklimacie. Lubi podłoża kwaśne, ale gliniaste, nieco przepuszczalne [Pereira i wsp. 2016, Pereira 2006, 2008, Ehlenfeldt i Ballington 2012, Pliszka i wsp. 2009].

Borówka azorska znajduje wiele zastosowań na terenach pierwotnego występowania. Jej niezwykle twarde drewno o pięknym, pomarańczowym rysunku wykorzystuje się w stolarstwie i lutnictwie. Dawniej wypalano zeń węgiel drzewny. Ceni się ją również jako roślinę ozdobną. Wiosną zdobią ją okazałe, dzwonkowate, intensywnie różowe kwiaty. W grudniu efektownie przebarwia się na złoto i purpurowo. Także jednoroczne gałązki zyskują ciekawy, czerwony odcień jak u niektórych dereni. Granatowe bądź czarne jagody odznaczają się nietypowym dla borówek mocno wydłużonym (jajowatym) kształtem, przypominającym raczej owoce niespokrewnionej z wrzosowatymi, gdyż należącej do rodziny przewiertniowatych, „kamczackiej jagody”, właściwie wiciokrzewu sinego (*Lonicera kamtschatica* [Sevast.] Pojark.). Mogą być znakomitym źródłem polifenoli [Pereira i wsp. 2016, Ehlenfeldt i Ballington 2012, Spínola i wsp. 2018].

Bażyna czarna (*Empetrum nigrum* L.) i bażyna obupłciowa
(*E. hermaphroditum* Hagerup)

Bażyna czarna (*Empetrum nigrum* L.) to prastara roślina lecznicza i jadalna, dawniej także farbiarska, obecnie chętnie sadzona jako roślina okrywowa i ozdobna. Może być ujmowana wąsko lub szeroko od strony taksonomicznej. Występuje przede wszystkim na obszarach arktycznych i borealnych półkuli północnej, z reliktowymi stanowiskami bardziej na



Rycina 48. Bażyna czarna (*Empetrum nigrum*).
Fot. Małgorzata Kalemba-Drożdż

południe oraz z mocno izolowaną, aczkolwiek często uważaną za naturalną populacją na Falklandach. Prócz typowych form diploidalnych i dwupiennych zarazem, obserwuje się formy obupłciowe i tetraploidalne. Zależnie od ujęcia przyznaje im się rozmaite rangi: od odmian po osobne gatunki [Zarzycki 1963, Dostatny i Dajdok 2020].

Bażyny: czarna i obupłciowa (*E. hermapohroditum* Hagerup), to płożące się krzewinki formujące luźne kępki, ulistnione skrętoległe, o zimotrwałych, szpilkowatych liściach oraz trójdzielnych, jedno- lub obupłciowych kwiatach. Choć ich czarne, okrągłe owoce nazywa się jagodami, to zdaniem części botaników są one tak właściwie pestkowcami [Gibbons 1962, Zarzycki 1963, Dostatny i Dajdok 2020] (rycina 48).

Aktywność antyoksydacyjna owoców bażyny jest wysoka, porównywalna z aktywnością aronii, i wyższa niż u większości borówek i żurawin [Prencipe i wsp. 2014, Roberts i wsp. 2019, Gao i wsp. 2021, Juríková i wsp. 2021]. Choć bażyny odgrywały ważną rolę w życiu plemion dalekiej Północy, a także bywały czasem zbierane przez Kaszubów czy górali, to ich smak nie budził entuzjazmu ani pierwszych naturalistów, ani współczesnych konsumentów. Opisuje się go wielorako jako „mdły”, „mdło-kwaskowaty”, „gorzko-mdły” a same rośliny jako „wodniste” oraz „niemal pozbawione smaku”. Prócz wysokiego stężenia tanin, nawet po przemrożeniu, także liczne nasiona zniechęcały potencjalnych smakoszy [Zarzycki 1963, Dostatny i Dajdok 2020, Joven i wsp. 2014]. Pionier polskiej botaniki i naukowego rolnictwa, książdź Jan Krzysztof Kluk, ostrzegł, że „obfite ich zażycie głowę zawraca” [Kluk 1805: 199].

Golteria (starzęśla), salal (*Gaulteria shallon* Pursh.)

Golteria (*Gaulteria shallon* Pursh.) to wiecznie zielona krzewinka, która w stanie naturalnym występuje na pacyficznym wybrzeżu Ameryki Północnej od Kalifornii na południu (pasmo Santa Ynez w hrabstwie Santa Barbara) aż po Kolumbię Brytyjską, Alaskę i Wyspę Baranowa na północy [Barney 1999, Wilkin i wsp. 2005]. W Polsce golteria jest rzadkością, ozdobną rośliną kolekcjonerską, w ogrodach botanicznych prezentowaną rzadziej od golterii rozesełanej (*Gaulteria procumbens* L.) [Pliszka i wsp. 2009, Sorrie i wsp. 2009] (rycina 49). W nazwie rodzajowej odkrywca gatunku Pehr Kalm uhonorował francuskiego lekarza i przyrodnika,

działającego w ówczesnej Nowej Francji (dzisiejszej Kanadzie) Jeana François Gaultiera [Strike 1994, Wilkin i wsp. 2005, Zhao i Shamoun 2006, Osono i wsp. 2008, Liu i wsp. 2013]. Shallon/salal to indiańskie nazwy tego gatunku, a „starzęśla” była staropolskim synonimem jemioli, przeniesionym na golterię z uwagi na jej zimotrwały charakter i wykorzystanie jako noworocznej ozdoby.



Rycina 49. *Gaultheria shallon*.
Fot. Adam Kapler

Salal często występuje w borach iglastych i mieszanych, dąbrowach i olszynach, preferuje gleby kwaśne i jałowe, ale niekoniecznie torfiaste, rośnie także na podłożach piaszczystych, skalistych lub wilgotnych [Wilkin i wsp. 2005].

Starzęśla to okazały krzew, nie ustępujący wielkością niektórym azaliom (osiągając do 2 m wysokości, a wyjątkowo nawet 5 m). Jej kwiaty są chętnie odwiedzane przez kolibry, błonkówki i muchówki, jednak nasiona często powstają przez samozapylenie [Osono i wsp. 2008, Liu i wsp. 2013].

Owoce pozorne golterii to pięciokrotne, okrągłe torebki, trwale otoczone zmięśniałymi resztkami kielicha. Dojrzałe owoce są granatowe, rzadziej lilowe lub czerwone, o wielkości 0,6–1 cm. Każda torebka zawiera

20–80 brunatnych, gładkich lub siatkowatych nasion. Salal dojrzewa od lipca do października, jednak owoce nie mają przyjemnego smaku. Dopiero po przemrożeniu stają się smaczniejsze. Ich smak przypomina suszone borówki zmieszane z liśćmi mięty, z wyraźnym aromatem piżma. Indianie ze szczepu Kwakwala suszyli je razem z czernicami i owocami mahonii. Indianie Hajda (Khaida) natomiast zapiekali owoce salalu z ikrą łososi. Z kolei biali pionierzy robili z golterii dżemy i ciasta oraz fermentowali wino [Gibbons 1962, Fern 1997].

Golteria jest uprawiana przede wszystkim na paszę dla zwierząt łownych: jeleni i dużych kuraków – cietrzewi, głuszców, pardw, a także jako roślina ozdobna (okrywowa) oraz źródło olejków eterycznych (ang. *wintergreen oil*). Liście golterii salal miały wiele zastosowań w ziołolecznictwie. Świeże liście salalu żuto, by nie czuć głodu, a także używano ich jako opatrunków ran i na ukąszenia owadów. Suszem z liści leczono przeziębienia, gruźlicę, niestrawność, wreszcie zażywano go jako środek przeczyszczający. Indianie palili je zamiast tytoniu. Miały one również zastosowanie w kuchni, m.in. dodawano je do zup rybnych [Strike 1994].

Salal jest uprawiany i hodowany poza swoim pierwotnym miejscem występowania, przede wszystkim na terenie Federacji Rosyjskiej. Roślina ta była niezwykle modna we Francji i Wielkiej Brytanii XIX w., jednak obecnie zakazano tam jej uprawy uznając ją za gatunek inwazyjny. Zarówno w Ameryce, jak i w Europie Zachodniej golteria uważana jest za niebezpieczny chwast leśny. Uniemożliwia odnawianie się lasu blokując rozwój siewek, zarówno tych kiełkujących spontanicznie, jak i sadzonek wprowadzanych przez leśników. Nie tylko ocienia siewki mechanicznie, lecz jednocześnie truje je allelopatycznie [Barney 1999, Osono i wsp. 2008]. Uwagę zwraca niezwykła odporność golterii na nowoczesne herbicydy, jak również na wypalanie i usuwanie mechaniczne. Jej krzewinki charakteryzują się rozbudowanym systemem kłączy, rozłogów i właściwych korzeni, które zapewniają głębokie zakorzenienie w podłożu i odporność na okresowe pożary. Odporność rośliny może również wynikać z obecności grubej warstwy wosku na liściach i pędach. Właściwości golterii sprawiają, że tylko nieliczne gatunki grzybów są w stanie zaatakować i pasożytować na żywej golterii i/lub rozkładać jej uschnięte resztki. Salal bywa jednakże żywicielem boszniakii (*Boschniakia* C.A.Mey) – pasożytnej rośliny naczyniowej z rodziny zarazowatych [Wilkin i wsp. 2005, Zhao i Shamoun 2006].

Gajlusacja jagodowa (*Gaylussacia baccata* [Wangenh.] K. Koch)

Gajlusacja jagodowa (*Gaylussacia baccata* K.Koch) to gatunek szeroko rozpowszechniony na wschodnich, atlantyckich wybrzeżach Ameryki Północnej. Na północy sięga Kanady (a dokładniej Nowej Fundlandii i Labradoru) i regionu Wielkich Jezior, na południu dochodzi do Alabamy oraz Arkansas. Najdalej na zachód notowano ją w Manitobie i Minnesocie [Matlack 1997, Murrieta i wsp. 1999]. W Polsce dostępna tylko czasami, w nielicznych szkółkach, jako rarytas dla kolekcjonerów [Seneta i wsp. 2021].

Owoce gajlusacji pozyskuje się wyłącznie ze stanu dzikiego. Ceni się je za słodki smak i spożywa surowe, w postaci galaretek lub w ciastkach i naleśnikach [Gibbons 1962, Fern 1997].

Źródłem nieporozumień jest fakt, że identycznej nazwy potocznej *black huckleberry* używa się na podobną krzewinkę: shawiash (*Vaccinium membranaceum* Dougl. ex Torr.), nierzadko rosnącą w tych samych ekosystemach co gajlusacja. *V. membranaceum* różni się rozleglejszym zasięgiem geograficznym oraz szerszą skalą fitocenotyczną, występując od Alaski po Utah, a na zachodzie dochodząc do wschodnich stoków gór Kalifornii [Barney 1999].

W warunkach polowych, w stanie wegetatywnym obie krzewiny najłatwiej odróżnić po mnóstwie lśniących, żywicznych plamek na spodzie liści, charakterystycznych dla gajlusacji, a nieobecnych u borówek. *G. baccata* wytwarza dzwonekkształtne, jaskrawo ubarwione (pomarańczowe bądź czerwone) kwiaty, zwisające z pędów po 3–7. Jagody gajlusacji zwykle są granatowe, rzadko spotyka się okazy z owocami antracytowo-czarnymi, jeszcze rzadziej z białymi [Murrieta i wsp. 1999, Matlack 1997, Matlack i wsp. 1993]. Nazwa rodzajowa honoruje słynnego fizyka Josepha Louisa Gay-Lussaca [Matlack 1997].

Uprawa i hodowla mniej znanych wrzosowatych

Spośród omówionych wyżej gatunków najczęściej uprawia się *V. praestans* i *G. shalon*, przy czym sadi się je przede wszystkim jako rośliny dekoracyjne, a nie jadalne [Lobos i Hancock 2015]. Pozostałe gatunki bywają uprawiane i/lub hodowane (poddawane doborowi sztucznemu

celem stworzenia nowych, użyteczniejszych kultywarów) znacznie rzadziej, aczkolwiek dla bażyny otrzymano kilka odmian ozdobnych o liściach złocistych, jak 'Bernstein', 'Lucia' i 'Zitronella' [Czekalski (cop.) 2008].

Jakkolwiek w połowych bankach genów zgromadzono tysiące genotypów form dzikich borówki wysokiej i żurawiny wielkoowocowej, ich historycznych, niekiedy niedostępnych już komercyjnie kultywarów, wreszcie ich mieszańców z innymi gatunkami *Vaccinium/Oxycoccus*, to hodowcom coraz trudniej sprostać jednoczesnym zmianom klimatu oraz rosnącym obostrzeniom w eksploatacji torfu wysokiego. Szkółkarzom i konsumentom zależy na możliwości uprawy borówek lub innych, zdrowych oraz smacznych wrzosowatych także na glebach mineralnych, w miejscach o klimacie suchszym i gorętszym niż preferowany przez dotychczasowe odmiany *V. corymbosum* i *O. macrocarpon*. Dlatego z jednej strony palącym wyzwaniem staje się gromadzenie w ogrodach botanicznych oraz bankach genów zasobów plazmy zarodkowej pozostałych gatunków wrzosowatych, potencjalnie użytecznych dla światowego rolnictwa i przemysłu spożywczego [Barney 1999, Ballington 2001, Lobos i Hancock 2015].

Z drugiej strony rosnące zaludnienie Syberii, odradzanie się rosyjskiego rolnictwa, w tym ogrodnictwa, oraz ocieplanie się klimatu pozwala żywić nadzieję na komercyjną produkcję wielu mniej znanych gatunków i odmian borówek, żurawin, bażyn, golterii czy gajlusacji na północy Federacji Rosyjskiej [Gorbunov 1993, Stepanov i wsp. 2016, Salikova i wsp. 2019].

Możliwości zwiększenia produkcji owoców mniej znanych wrzosowatych są duże, zarówno w przypadku niewielkich, ekstensywnie użytkowanych, przydomowych sadów i ogródków działkowych, jak i na rozległych, uprawianych intensywnie plantacjach. Pod uprawę opisywanych w rozdziale owocodajnych *Ericaceae* można przeznaczać stanowiska słabo nadające się do uprawy innych roślin deserowych i leczniczych, np.: tundrę za kołem podbiegunowym, piętro turniowe w górach, wydmy śródlądowe i nadmorskie – o ile nie są chronione jako siedliska Natura2000 czy rezerwy (dla bażyn), grunty o najslabszych, piaszczystych i piaszczysto-murszowych glebach zbyt słabe dla tradycyjnego rolnictwa, przeznaczone wcześniej pod zalesienia lub zabudowę, oraz dawne torfowiska wysokie i przejściowe, bezpowrotnie zniszczone przez nieprzemysłane osuszenia.

Także możliwości selekcji nowych odmian są duże, gdyż banki genów oraz szkółki komercyjne dysponują rosnącymi zasobami genotypów w postaci kolekcji żywych roślin, nasion i/lub kultur *in vitro*. Dotychczas jednak mało znane *Ericaceae* traktowano niemal wyłącznie jako rośliny ozdobne (głównie okrywowe i do skalniaków), w przypadku golterii salal także jako rośliny paszowe, biocenotyczne i modelowe (do badań nad herbicydami). Tymczasem wysoka zawartość i aktywność biologiczna polifenoli w ich owocach czyni je potencjalnie ważnym źródłem pokarmu, suplementów oraz medykamentów dla ludzi i zwierząt domowych. Doskonalenie metody CRISPR/Cas, jak również stały postęp na polu sztucznej mikoryzacji sadzonek powinny dodatkowo ułatwiać prace nad gromadzeniem zasobów genowych oraz tworzeniem i testowaniem nowych odmian, a wreszcie masową produkcję i transport sadzonek.

Wyzwania towarzyszące selekcji nowych odmian mniej znanych wrzosowatych, zasobnych w fenolowe metabolity wtórne, są takie same jak dla pozostałych obupłciowych, rzadziej dwupiennych (niektóre bażyny) dwuliściennych roślin trwałych. Obserwacje i hodowla gatunków wieloletnich z natury będą bardziej czasochłonne niż dla roślin jednorocznych i dwuletnich. Zapewnienie okazom wystarczająco kwaśnej gleby może być coraz trudniejsze z uwagi na rosnące ceny torfu wysokiego i przyszłe ograniczenia prawne w obrocie tym surowcem. Tym niemniej podłoża można zakwaszać używając odpowiednich nawozów i kompostów, co pozwoli z czasem zrezygnować zupełnie z pozyskiwania torfów wysokich oraz kory drzew iglastych. Także hydroponika i aeroponika mogą okazać się pomocne w badaniach naukowych, a potem uprawie komercyjnej tychże roślin.

Podsumowanie

Omówione w rozdziale gatunki krzewinek nie wymagają tak mocno torfiastych i silnie uwodnionych (regularnie, a zarazem obficie podlewanych) podłoży, niezbędnych borówce wysokiej i żurawinie wielkoowocowej, co pozwoli zredukować ślad węglowy, zużycie wody oraz lepiej chronić ostatnie mokradła Europy i zachodniej Syberii. Z kolei posiadanie własnych, nowych źródeł polifenoli uczyni Europę mniej zależną od jagód acai, co jest istotne w dobie zrywania się łańcuchów dostaw podczas kolejnych fal pandemii i wojen.

PIŚMIENICTWO

- Abbaszadeh F, Fakhri S, Khan H (2020). Targeting apoptosis and autophagy following spinal cord injury: Therapeutic approaches to polyphenols and candidate phytochemicals. *Pharmacol Res.* 160: 105069. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105069.
- Abdel-Salam NA, Ghazy NM, Sallam SM, Radwan MM, Wanas AA, El-Sohly MA, El-Demellawy MA, Abdel-Rahman NM, Piacente S, Shenouda ML (2018). Flavonoids of *Alcea rosea* L. and their immune stimulant, antioxidant and cytotoxic activities on hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line. *Nat Prod Res.* 32(6): 702–706. doi: 10.1080/14786419.2017.1332602.
- Afrin S, Giampieri F, Gasparri M, Forbes-Hernandez TY, Varela-López A, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2016). Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment. *Molecules.* 21(2): 169. doi: 10.3390/molecules21020169.
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RStC, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM (2004). The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(14): 4954–4959. doi: 10.1073/pnas.0401141101.
- Akatsu H (2021). Exploring the Effect of Probiotics, Prebiotics, and Postbiotics in Strengthening Immune Activity in the Elderly. *Vaccines (Basel).* 9(2): 136. doi: 10.3390/vaccines9020136.
- Akbulut MB, Guneser MB, Eldeniz AU (2019). Effects of fruit vinegars on root dentin microhardness and roughness. *J Conserv Dent.* 22(1): 97–101. doi: 10.4103/JCD.JCD_394_18.
- Akhtar MS, Panwar J, Yun YS (2013). Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustain Chem Eng.* 1(6): 591–602. doi: 10.1021/sc300118u.
- Akram M, Riaz M, Munir N, Akhter N, Zafar S, Jabeen F, Ali Shariati M, Akhtar N, Riaz Z, Altaf SH, Daniyal M, Zahid R, Said Khan F (2020). Chemical constituents, experimental and clinical pharmacology of

- Rosa damascena*: a literature review. *J Pharm Pharmacol.* 72(2): 161–174. doi: 10.1111/jphp.13185.
- Aksay O, Selli S, Kelebek H (2021). LC-DAD-ESI-MS/MS-based assessment of the bioactive compounds in fresh and fermented caper (*Capparis spinosa*) buds and berries. *Food Chem.* 337: 127959. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127959.
- Alexandre JTM, Sousa LHT, Lisboa MRP, Furlaneto FAC, do Val DR, Marques M, Vasconcelos HC, de Melo IM, Leitão R, Castro Brito GA, Goes P (2018). Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. *Clin Oral Investig.* 22(6): 2175–2185. doi: 10.1007/s00784-017-2308-7.
- Ali H, Dixit S (2012). *In vitro* antimicrobial activity of flavanoids of *Ocimum sanctum* with synergistic effect of their combined form. *Asian Pac J Trop Dis.* 2(Suppl. 1): S396–S398. doi: 10.1016/S2222-1808(12)60189-3.
- Al-Oqail MM, Farshori NN, Al-Sheddi ES, Al-Massarani SM, Saquib Q, Siddiqui MA, Al-Khedhairi AA (2021). Oxidative stress mediated cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis induced by *Rosa damascena* in human cervical cancer HeLa Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2021: 6695634. doi: 10.1155/2021/6695634.
- Al-Sayed E, Michel HE, Khattab MA, El-Shazly M, Singab AN (2020). Protective Role of Casuarinin from *Melaleuca leucadendra* against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats. *Planta Med.* 86(1): 32–44. doi: 10.1055/a-1031-7328.
- Amudha K, Pari L (2011). Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel induced nephrotoxicity in rats. *Chem Biol Interact.* 193(1): 57–64. doi: 10.1016/j.cbi.2011.05.003.
- Aqil F, Jeyabalan J, Kausar H, Munagala R, Singh IP, Gupta R (2016). Lung cancer inhibitory activity of dietary berries and berry polyphenolics. *J Berry Res.* 6(2): 105–114. doi: 10.3233/JBR-160120.
- Avtanski D, Poretsky L (2018). Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. *Mol Med.* 24(1): 29. doi: 10.1186/s10020-018-0032-7.
- Ayoobi F, Shamsizadeh A, Fatemi I, Vakilian A, Allahtavakoli M, Hassan-shahi G, Moghadam-Ahmadi A (2017). Bio-effectiveness of the main flavonoids of *Achillea millefolium* in the pathophysiology of neurodegenerative disorders – a review. *Iran J Basic Med Sci.* 20(6): 604–612. doi: 10.22038/IJBMS.2017.8827.

- Baba AB, Kowshik J, Krishnaraj J, Sophia J, Dixit M, Nagini S (2016). Blueberry inhibits invasion and angiogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral squamous cell carcinogenesis in hamsters via suppression of TGF- β and NF- κ B signaling pathways. *J Nutr Biochem*. 35: 37–47. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.06.002.
- Bacchetta L, Visioli F, Cappelli G, Caruso E, Martin G, Nemeth E, Bacchetta G, Bedini G, Wezel A, van Asseldonk T, van Raamsdonk L, Mariani F, on Behalf Of The Eatwild Consortium (2016). A manifesto for the valorization of wild edible plants. *J Ethnopharmacol*. 191: 180–187. doi: 10.1016/j.jep.2016.05.061.
- Balakrishnan S, Mukherjee S, Das S, Bhat FA, Raja Singh P, Patra CR, Arunakaran J (2017). Gold nanoparticles-conjugated quercetin induces apoptosis via inhibition of EGFR/PI3K/Akt-mediated pathway in breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). *Cell Biochem Funct*. 35(4): 217–231. doi: 10.1002/cbf.3266.
- Ballington JR (2001). Collection, utilization, and preservation of genetic resources in *Vaccinium*. *HortSci*. 36(2): 206–213. doi: 10.21273/HORTSCI.36.2.206.
- Barney D (1999). *Growing Western Huckleberries*. University of Idaho, Cooperative Extension System, Moscow, ID.
- Barros L, Calhelha RC, Queiroz MJRP, Santos-Buelga C, Santos EA, Regis WCB, Ferreira ICFR (2015). The powerful *in vitro* bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. *Ind Crops Prod*. 76: 318–322. doi 10.1016/j.indcrop.2015.05.086.
- Batista CM, Alves AVF, Queiroz LA, Lima BS, Filho RNP, Araújo AAS, de Albuquerque Júnior RLC, Cardoso JC (2018). The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *J Photochem Photobiol B*. 180: 198–207. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.01.028.
- Begum NA, Mondal S, Basu S, Laskar RA, Mandal D (2009). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of black tea leaf extracts. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 71(1): 113–118. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.01.012.
- Behera SS, El Sheikha AF, Hammami R, Kumar A (2020). Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits?. *J Funct Foods*. 70: 103971. doi: 10.1016/j.jff.2020.103971.
- Belkaid Y, Hand TW (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 157(1): 121–141. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011.

- Benítez-Bribiesca L, Wong A, Utrera D, Castellanos E (2001). The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem.* 49(8): 1061–1062. doi: 10.1177/002215540104900816.
- Benvenuti C (2009). Onset of action of isoflavons associated or not to a natural anxiolytic agent in menopause. *Maturitas.* 63(Suppl. 1): S108. doi: 10.1016/S0378-5122(09)70434-7.
- Bhaskaran S, Dileep KV, Deepa SS, Sadasivan C, Klausner M, Krishnegowda NK, Tekmal RR, VandeBerg JL, Nair HB (2013). Gossypin as a Novel Selective Dual Inhibitor of v-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 and Cyclin-Dependent Kinase 4 for Melanoma. *Mol Cancer Ther.* 12(4): 361–372. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0965.
- Bhaumik J, Thakur NS, Aili PK, Ghanghoriya A, Mittal AK, Banerjee UC (2015). Bioinspired nanotheranostic agents: synthesis, surface functionalization, and antioxidant potential. *ACS Biomater Sci Eng.* 1(6): 382–392. doi: 10.1021/ab500171a.
- Bhave A, Schulzova V, Chmelarova H, Mrnka L, Hajslova J (2017). Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds. *J Food Drug Anal.* 25(3): 681–690. doi: 10.1016/j.jfda.2016.12.019.
- Bianchini Silva LS, Perasoli FB, Carvalho KV, Vieira KM, Paz Lopes MT, Bianco de Souza GH, Henrique Dos Santos OD, Freitas KM (2020). *Melaleuca leucadendron* (L.) L. flower extract exhibits antioxidant and photoprotective activities in human keratinocytes exposed to ultraviolet B radiation. *Free Radic Biol Med.* 159: 54–65. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.022.
- Bisakowski B, Atwal AS, Gardner N, Champagne CP (2007). Effect of lactic acid fermentation of onions (*Allium cepa*) on the composition of flavonol glucosides. *Int J Food Sci Technol.* 42(7): 783–789. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01268.x.
- Biscotti N, Pieroni A (2015). The hidden Mediterranean diet: wild vegetables traditionally gathered and consumed in the Gargano area, Apulia, SE Italy. *Acta Soc Bot Pol.* 84(3): 327–338. doi: 10.5586/asbp.2015.031.
- Brenner M, Hearing VJ (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 84(3): 539–549. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x.
- Brondízio ES, Safar CAM, Siqueira AD (2002). The urban market of Açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) and rural land use change: Ethnographic

- insights into the role of price and land tenure constraining agricultural choices in the Amazon estuary. *Urban Ecosyst.* 6(1–2): 67–97. doi: 10.1023/A:1025966613562.
- Budak NH, Aykin E, Seydim AC, Greene AK, Guzel-Seydim ZB (2014). Functional properties of vinegar. *J Food Sci.* 79(5): R757–R764. doi: 10.1111/1750-3841.12434.
- Budzowski A, Gil R (2018). Nowe substancje organiczne absorbujące ultrafiolet w recepturze kosmetyków promieniochronnych. *Pol J Cosmetol.* 21(3): 206–214.
- Bujor OC, Le Bourvellec C, Volf I, Popa VI, Dufour C (2016). Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chem.* 213: 58–68. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.042.
- Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF, Griswold TL (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS.* 108(2): 662–667. doi: 10.1073/pnas.1014743108.
- Camouse MM, Domingo DS, Swain FR, Conrad EP, Matsui MS, Maes D, Declercq L, Cooper KD, Stevens SR, Baron ED (2009). Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. *Exp Dermatol.* 18(6): 522–526. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00818.x.
- de Carvalho AM, Ferreira Carioca AA, Fisberg RM, Qi L, Marchioni DM (2016). Joint association of fruit, vegetable, and heterocyclic amine intake with DNA damage levels in a general population. *Nutrition.* 32(2): 260–264. doi: 10.1016/j.nut.2015.08.018.
- Cheng KW, Wu Q, Zheng ZP, Peng X, Simon JE, Chen F, Wang M (2007). Inhibitory effect of fruit extracts on the formation of heterocyclic amines. *J Agric Food Chem.* 55(25): 10359–10365. doi: 10.1021/jf071820z.
- Chevalier A, Marinova E, Peña-Chocarro L (eds.) (2014). *Plants and people: choices and diversity through time.* Oxbow Books, Oxford.
- Christenhusz MJM, Fay MF, Chase MW (2017). *Plants of the World.* Richmond UK – Chicago, Kew Publishing, Royal Botanic Gardens – The University of Chicago Press.
- Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B, Shah PK (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 109(20): 2448–2453. doi: 10.1161/01.CIR.0000128034.70732.C2.

- Cierniak A, Łabno A, Winiarski M, Dembiński M, Budzyński P, Kalemba-Drożdż M (2017). Wpływ kurkuminy na uszkodzenia DNA indukowane mutagenym składnikiem żywności (heterocykliczną aminą aromatyczną) w limfocytach pacjentów z nowotworem jelita grubego. *Państwo i Społeczeństwo. Medycyna i Zdrowie Publiczne*. 4: 23–40. doi: 10.31749/pismzp2017/19183.
- Cierniak A, Skubal M, Kalemba-Drożdż M (2018). Czy galusan epigalokatechiny może być skutecznym polifenolem w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej. *Państwo i Społeczeństwo. Medycyna i Zdrowie Publiczne*. 3: 9–28. doi: 10.31749/pismzp2018/20836.
- Ciska E, Karamać M, Kosińska A (2005). Antioxidant activity of extracts of white cabbage and sauerkraut. *Pol J Food Nutr Sci*. 55(4): 367–373.
- Cohen Z, Maimon Y, Yoeli-Lerner M, Yang P, Samuels N, Berger R (2015). Selective anticancer effects and protection from chemotherapy by the botanical compound LCS101: Implications for cancer treatment. *Int J Oncol*. 46(1): 308–316. doi: 10.3892/ijo.2014.2711.
- Cohen Z, Samuels N, Maimon Y, Berger R (2019). Effect of the botanical formula LCS101 on the anti-cancer effects of radiation therapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 145(3): 609–613. doi: 10.1007/s00432-018-2812-4.
- Cook NC, Samman S (1996). Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*. 7(2): 66–76. doi: 10.1016/S0955-2863(95)00168-9.
- Cordes N, Huang WF, Strange JP, Cameron SA, Griswold TL, Lozier JD, Solter LF (2012). Interspecific geographic distribution and variation of the pathogens *Nosema bombi* and *Crithidia* species in United States bumble bee populations. *J Invertebr Pathol*. 109(2): 209–216. doi: 10.1016/j.jip.2011.11.005.
- Córdova-Fraga T, de Araujo DB, Sanchez TA, Elias J Jr, Carneiro AAO, Brandt-Oliveira R, Sosa M, Baffa O (2004). *Euterpe oleracea* (Açaí) as an alternative oral contrast agent in MRI of the gastrointestinal system: preliminary results. *Magn Reson Imaging*. 22(3): 389–393. doi: 10.1016/j.mri.2004.01.018.
- Correa-Betanzo J, Allen-Vercocoe E, McDonald J, Schroeter K, Corredig M, Paliyath G (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem*. 165: 522–531. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.135.

- Costa SCC, Detoni CB, Branco CRC, Botura MB, Branco A (2015). *In vitro* photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Rev Bras Farmacogn.* 25(4): 413–418. doi: 10.1016/j.bjp.2015.07.013.
- De Crozals G, Bonnet R, Farre C, Chaix C (2016). Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: a strategic guide. *Nano Today.* 11(4): 435–463. doi: 10.1016/j.nantod.2016.07.002.
- Cucinotta F, Pieroni A (2018). “If you want to get married, you have to collect viridura”: the vanishing custom of gathering and cooking wild food plants on Vulcano, Aeolian Islands, Sicily. *Food Cult Soc.* 21(4): 539–567. doi: 10.1080/15528014.2018.1481263.
- Cunja V, Mikulic-Petkovsek M, Weber N, Jakopic J, Zupan A, Veberic R, Stampar F, Schmitzer V (2016). Fresh from the ornamental garden: hips of selected rose cultivars rich in phytonutrients. *J Food Sci.* 81(2): C369–C379. doi: 10.1111/1750-3841.13220.
- Cuzick J (2017). Preventive therapy for cancer. *Lancet Oncol.* 18(8): e472–e482. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30536-3.
- Cymerys M, Vogt N, Brondizio E ([cop.] 2011). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). W: P Shanley, M Cymerys, M Serra, G Medina (eds.). *Fruit trees and useful plants in Amazonian life*. Transl. by T MacDonald. Ill. by S. Cordeiro et al. Rev. and updated eng. edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations – the Center for International Forestry Research – People and Plants International, Rome: 157–168.
- Czaplińska M, Czepas J, Gwoździński K (2012). Budowa, właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe flawonoidów. *Postępy Biochem.* 58(3): 235–244.
- Czekalski M ([cop.] 2008). *Wrzosy, wrzośce i inne rośliny wrzosowate*. PWRiL. Oddział, Poznań.
- Czyżowska A, Siemianowska K, Śniadowska M, Nowak A (2020). Bioactive compounds and microbial quality of stored fermented red beetroots and red beetroot juice. *Pol J Food Nutr Sci.* 70(1): 35–44. doi: 10.31883/pjfn/116611.
- Daher CC, Fontes IS, Rodrigues RO, Damasceno GAB, Soares DS, Aragão CFS, Gomes APB, Ferrari M (2014). Development of O/W emulsions containing *Euterpe oleracea* extract and evaluation of photoprotective efficacy. *Braz J Pharm Sci.* 50(3): 639–652. doi: 10.1590/S1984-82502014000300024.
- Demasi S, Caser M, Donno D, Enri SR, Lonati M, Scariot V (2021). Exploring wild edible flowers as a source of bioactive compounds: New

- perspectives in horticulture. *Folia Hort.* 33(1): 27–48. doi: 10.2478/fhort-2021-0004.
- Deng Y, Li Y, Yang F, Zeng A, Yang S, Luo Y, Zhang Y, Xie Y, Ye T, Xia Y, Yin W (2017). The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. *Bio-med Pharmacother.* 93: 976–984. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.008.
- Dogan Y, Nedelcheva A, Łuczaj Ł, Drăgulescu C, Stefkov G, Maglajlić A, Ferrier J, Papp N, Hajdari A, Mustafa B, Dajić-Stevanović Z, Pieroni A (2015). Of the importance of a leaf: the ethnobotany of sarma in Turkey and the Balkans. *J Ethnobiol Ethnomed.* 11: 26. doi: 10.1186/s13002-015-0002-x.
- Dostatny DF, Dajdok Z (red.) (2020). *Dziki gatunki pokrewne roślinom uprawnym występujące w Polsce. Lista, zasoby i zagrożenia.* Wyd. Kontekst, Radzików – Poznań.
- Duan H, Wang D, Li Y (2015). Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev.* 44(16): 5778–5792. doi: 10.1039/C4CS00363B.
- Dubey SP, Lahtinen M, Sillanpää M (2010). Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp.* 364(1–3): 34–41. doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.04.023.
- Dudka K, Baran M, Karpik E (2016). Roślinne metabolity wtórne i ich zastosowanie w kosmetyce. W: B Zdunek, M Olszówka (red.). *Przegląd wybranych prac z zakresu enzymologii.* Fundacja na Rzecz Promocji Nauki i Rozwoju TYGIEL, Lublin: 99–124.
- Edison TJI, Sethuraman MG (2012). Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. *Process Biochem.* 47(9): 1351–1357. doi: 10.1016/j.procbio.2012.04.025
- Ehlenfeldt MK, Ballington JR (2012). *Vaccinium* species of section *Hemimyrtillus*: their value to cultivated blueberry and approaches to utilization. *Botany.* 90(5): 347–353. doi: 10.1139/b2012-010.
- Elmastaş M, Demir A, Genç N, Dölek Ü, Güneş M (2017). Changes in flavonoid and phenolic acid contents in some *Rosa* species during ripening. *Food Chem.* 235: 154–159. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.004.
- Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H (2001). Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol.* 44(3): 425–432. doi: 10.1067/mjd.2001.112919.

- El-Zein R, Etzel CJ, Lopez MS, Gu Y, Spitz MR, Strom SS (2006). Human sensitivity to PhIP: A novel marker for prostate cancer risk. *Mutat Res.* 601(1–2): 1–10. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.05.023.
- Enzler T, Gillissen S, Manis JP, Ferguson D, Fleming J, Alt FW, Mihm M, Dranoff G (2003). Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer. *J Exp Med.* 197(9): 1213–1219. doi: 10.1084/jem.20021258.
- Erdman JW Jr, Carson L, Kwik-Urbe C, Evans EM, Allen RR (2008). Effects of cocoa flavanols on risk factors for cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr.* 17(Suppl. 1): 284–287.
- Essl F (2004). Erstfund eines verwilderten Vorkommens der Kultur-Heidelbeere (*Vaccinium angustifolium x corymbosum*) in Österreich. *Linzer biol Beitr.* 36(2): 785–796.
- Estrela JM, Mena S, Obrador E, Benlloch M, Castellano G, Salvador R, Dellinger RW (2017). Polyphenolic phytochemicals in cancer prevention and therapy: bioavailability versus bioefficacy. *J Med Chem.* 60(23): 9413–9436. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01026.
- Fairlie-Jones L, Davison K, Fromentin E, Hill AM (2017). The effect of anthocyanin-rich foods or extracts on vascular function in adults: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrients.* 9(8): 908. doi: 10.3390/nu9080908.
- Falleh H, Jalleli I, Ksouri R, Boulaaba M, Guyot S, Magné C, Abdelly C (2012). Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physiol Biochem.* 52: 1–8. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.11.001.
- Fatima T, Kesari V, Watt I, Wishart D, Todd JF, Schroeder WR, Paliyath G, Krishna P (2015). Metabolite profiling and expression analysis of flavonoid, vitamin C and tocopherol biosynthesis genes in the antioxidant-rich sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Phytochemistry.* 118: 181–191. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.08.008.
- Fern K (1997). *Plants for a Future: Edible & Useful Plants for a Healthier World*. Permanent Publications, Clanfield.
- Fraga S, Faria H, Soares ME, Duarte JA, Soares L, Pereira E, Costa-Pereira C, Teixeira JP, de Lourdes Bastos M, Carmo H (2013). Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. *J Appl Toxicol.* 33(10): 1111–1119. doi: 10.1002/jat.2865.
- Gallori S, Bilia AR, Bergonzi MC, Barbosa WLR, Vincieri FF (2004). Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí

- palm). *Chromatographia*. 59(11–12): 739–743. doi: 10.1365/s10337-004-0305-x.
- Gao Y, Wang S, Dang S, Han S, Yun C, Wang W, Wang H (2021). Optimized ultrasound-assisted extraction of total polyphenols from *Empetrum nigrum* and its bioactivities. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1173: 122699. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122699.
- Garcia C, Guerin M, Souidi K, Remize F (2020). Lactic Fermented Fruit or Vegetable Juices: Past, Present and Future. *Beverages*. 6(1): 8. doi: 10.3390/beverages6010008.
- GBD 2017 Diet Collaborators (2019). Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 393(10184): 1958–1972. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30041-8.
- Geissmann TA (1962). *The chemistry of flavonoid compounds*. Pergamon Press, Oxford.
- Gharib M, Khalaf M, Afroz S, Feliu N, Parak WJ, Chakraborty I (2019). Sustainable synthesis and improved colloidal stability of popcorn-shaped gold nanoparticles. *ACS Sustain Chem Eng*. 7(11): 9834–9841. doi: 10.1021/acssuschemeng.9b00295.
- Ghoreishi SM, Behpour M, Khayat Kashani M (2011). Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Rosa damascena* and its primary application in electrochemistry. *Phys E: Low Dimens Syst Nanostruct*. 44(1): 97–104. doi: 10.1016/j.physe.2011.07.008
- Gibbons E (1962). *Stalking the Wild Asparagus*. Ill. by MF Schroeder. David McKay, New York.
- Gonzales-Castañeda C, Gonzales GF (2008). Hypocotyls of *Lepidium meyenii* (maca), a plant of the Peruvian highlands, prevent ultraviolet A-, B-, and C-induced skin damage in rats. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 24(1): 24–31. doi: 10.1111/j.1600-0781.2008.00330.x.
- González-Barrio R, Periago MJ, Luna-Recio C, Garcia-Alonso FJ, Navarro-González I (2018). Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. *Food Chem*. 252: 373–380. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.102.
- Gorbunov AB (1993). Introduction and breeding of *Vaccinium* and *Oxycoccus* species in Siberia. *J Small Fruit Vitic*. 1(2): 55–66. doi: 10.1300/J065v01n02_07.
- Gu D, Yang Y, Bakri M, Chen Q, Xin X, Aisa HA (2013). A LC/QTOF-MS/MS application to investigate chemical compositions in a fraction

- with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from *Rosa rugosa* flowers. *Phytochem Anal.* 24(6): 661–670. doi: 10.1002/pca.2451.
- Guo J, Suma T, Richardson JJ, Ejima (2019). Modular assembly of biomaterials using polyphenols as building blocks. *ACS Biomater Sci Eng.* 5(11): 5578–5596. doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b01507.
- Gur'anova AV (2019). Obosnovanie Vozmožnosti Primeneniâ Siropa Iz Plodov Krasniki (*Vaccinium praestans* Lamb) v Proizvodstve konditerskih Izdelij. W: SA Kostrykina (nauč. ruk.). *Molodež XXI veka: šag v buduše: materialy XH regional'noj naučno-praktičeskoj konferencii (23 maâ 2019 goda, g. Blagovešensk)*. T. 2: *Biologičeskie nauki. Veterinarnye nauki. Sel'skohozâjstvennye nauki. Medicinskie nauki. Himičeskie nauki. Nauki o Zemle*. Izd-vo Amurskogo gos. un-ta [Гурьянова АВ (2019). Обоснование возможности применения сиропа из плодов красники (*Vaccinium praestans* Lamb.) в производстве кондитерских изделий. W: СА Кострыкина (науч. рук.). *Молодежь XXI века: шаг в будущее: материалы XX региональной научно-практической конференции (23 мая 2019 года, г. Благовещенск)*. Т. 2: *Биологические науки. Ветеринарные науки. Сельскохозяйственные науки. Медицинские науки. Химические науки. Науки о Земле*. Изд-во Амурского гос. ун-та]: 67–69.
- Hafsa J, Hammi KM, Khedher MRB, Smach MA, Charfeddine B, Limmem K, Majdoub H (2016). Inhibition of protein glycation, antioxidant and antiproliferative activities of *Carpobrotus edulis* extracts. *Biomed Pharmacother.* 84: 1496–1503. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.046.
- Hajhashemi V, Ghannadi A, Hajiloo M (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Rosa damascena* hydroalcoholic extract and its essential oil in animal models. *Iran J Pharm Res.* 9(2): 163–168.
- Harris CS, Burt AJ, Saleem A, Le PM, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SAL, Arnason JT (2007). A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochem Anal.* 18(2): 161–169. doi: 10.1002/pca.970.
- Haywood R, Wardman P, Sanders R, Linge C (2003). Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-a-induced free radicals in skin: implications for skin aging and melanoma?. *J Invest Dermatol.* 121(4): 862–868. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12498.x.
- Heber D (2008). Plant Foods and PhyTOChemicals in Human Health. W: CD Berdanier, JT Dwyer, EB Feldman (eds.). *Handbook of*

- Nutrition and Food*. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton: 1175–1185. doi: 10.1201/9781420008890.ch70.
- Hegde ML, Bharathi P, Suram A, Venugopal C, Jagannathan R, Poddar P, Srinivas P, Sambamurti K, Rao KJ, Scancar J, Messori L, Zecca L, Zatta P (2009). Challenges associated with metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 17(3): 457–468. doi: 10.3233/JAD-2009-1068.
- Heinrich M, Dhanji T, Casselman I (2011). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) – a phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. *PhytochemLett*. 4(1): 10–21. doi: 10.1016/j.phytol.2010.11.005.
- Heldt HW, Piechulla B (2011). *Plant Biochemistry*. 4th edition. Academic Press, London [e-book]. doi: 10.1016/C2009-0-63188-3.
- Hidalgo GI, Almajano MP (2017). Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. *Antioxidants (Basel)*. 6(1): 7. doi: 10.3390/antiox6010007.
- Hoffman R (2017). Micronutrient deficiencies in the elderly – could ready meals be part of the solution?. *J Nutr Sci*. 6: e2. doi: 10.1017/jns.2016.42.
- Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB (1997). Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett*. 114(1–w2): 139–140. doi: 10.1016/s0304-3835(97)04644-2.
- Hu M, Chen J, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li X, Marquez M, Xia Y (2006). Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 35(11): 1084–1094. doi: 10.1039/b517615h.
- Hu Q, Wang T, Zhou M, Xue J, Luo Y (2016). *In vitro* antioxidant-activity evaluation of gallic-acid-grafted chitosan conjugate synthesized by free-radical-induced grafting method. *J Agric Food Chem*. 64(29): 5893–5900. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02255.
- Hummer K, Durst R (2007). Fruit Anthocyanins In *Vaccinium praestans* Lamb. *HortScience*. 42(4): 1008.
- Hunaefi D, Akumo DN, Smetanska I (2013). Effect of fermentation on antioxidant properties of red cabbages. *Food Biotechnol*. 27(1): 66–85. doi: 10.1080/08905436.2012.755694.
- Imada A, Shijubo N, Kojima H, Abe S (2000). Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *Eur Respir J*. 15(6): 1087–1093. doi: 10.1034/j.1399-3003.2000.01517.x.

- Islam T, Yu X, Badwal TS, Xu B (2017). Comparative studies on phenolic profiles, antioxidant capacities and carotenoid contents of red goji berry (*Lycium barbarum*) and black goji berry (*Lycium ruthenicum*). *Chem Cent J*. 11(1): 59. doi: 10.1186/s13065-017-0287-z.
- Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, SánchezGutiérrez M, Betanzos-Cabrera G, Sosa-Delgado SM, Sumaya-Martínez MT, Morales-González Á, Paniagua-Pérez R, Madrigal-Bujaidar E, Madrigal-Santillán E (2017). Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 1: Fruits and Polysaccharides. *Nutrients*. 9(2): 102. doi: 10.3390/nu9020102.
- Jain A, Samyikutty A, Jackson C, Browning D, Bollag WB, Thangaraju M, Takahashi S, Singh SR (2015). Curcumin inhibits PhIP induced cytotoxicity in breast epithelial cells through multiple molecular targets. *Cancer Lett*. 365(1): 122–131. doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.017.
- Jakubczyk K, Janda K, Styburski D, Łukomska A (2020). Goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) – botanical characteristics and prohealthy properties. *Postepy Hig Med Dosw*. 74: 28–35. doi: 10.5604/01.3001.0013.8551.
- Jamali MA, Zhang Y, Teng H, Li S, Wang F, Peng Z (2016). Inhibitory Effect of *Rosa rugosa* Tea Extract on the Formation of Heterocyclic Amines in Meat Patties at Different Temperatures. *Molecules*. 21(2): 173. doi: 10.3390/molecules21020173.
- Jaramillo Flores ME (2019). Cocoa Flavanols: Natural Agents with Attenuating Effects on Metabolic Syndrome Risk Factors. *Nutrients*. 11(4): 751. doi: 10.3390/nu11040751.
- Javorek SK, Mackenzie KE, Vander Kloet SP (2002). Comparative pollination effectiveness among bees (Hymenoptera: Apoidea) on low-bush blueberry (Ericaceae: *Vaccinium angustifolium*). *Ann Entomol Soc*. 95(3): 345–351. doi: 10.1603/0013-8746(2002)095[0345:CPEA-BH]2.0.CO;2.
- Jeong EH, Jung G, Hong CA, Lee H (2014). Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications. *Arch Pharm Res*. 37(1): 53–59. doi: 10.1007/s12272-013-0273-5.
- Jovanovic-Malinovska R, Kuzmanova S, Winkelhausen E (2014). Oligosaccharide Profile in Fruits and Vegetables as Sources of Prebiotics and Functional Foods. *Int J Food Prop*. 17(5): 949–965. doi: 10.1080/10942912.2012.680221.
- Joven J, Micol V, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menéndez JA, Bioactive Food Components Platform (2014). Polyphenols and

- the modulation of gene expression pathways: can we eat our way out of the danger of chronic disease?. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 54(8): 985–1001. doi: 10.1080/10408398.2011.621772.
- Juriková T, Mlček J, Balla Š, Ondrášová M, Dokoupil L, Sochor J, Ďurišová L, Eliáš P Jr., Adámková A, Baroň M, Ercisli S (2021). The Elucidation of Total Polyphenols, Individual Phenolic Compounds, Antioxidant Activity of Three Underutilized Fruit Species – Black Crowberry, Honeyberry, European Cranberry with Their Accumulation. *Agronomy.* 11(1): 73. doi: 10.3390/agronomy11010073.
- Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopek L, Orsavova J (2017). Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules.* 22(6): 944. doi: 10.3390/molecules22060944.
- Kalemba-Drożdż M (2010). Niedobory folianów w diecie i ich wpływ na stabilność genetyczną. W: G Dębska, J Jaśkiewicz (red.). *Interdyscyplinarne aspekty nauk o zdrowiu.* Krakowskie Towarzystwo Edukacyjne – Oficyna Wydawnicza AFM, Kraków: 21–32.
- Kalemba-Drożdż M (2019a). Comment on article “Are wild and cultivated flowers served in restaurants or sold by local producers in Denmark safe for the consumer?” *Food and Chemical Toxicology* 120 (2018) 129–142. Doi: 10.1016/j.fct.2018.07.007. *Food Chem Toxicol.* 125: 629–630. doi: 10.1016/j.fct.2018.12.055.
- Kalemba-Drożdż M (2019b). Jadalne kwiaty nie takie straszne. Komentarz do artykułu: “Are wild and cultivated flowers served in restaurants or sold by local producers in Denmark safe for the consumer?” w *Food and Chemical Toxicology.* *Etnobiologia Polska.* 9: 7–16.
- Kalemba-Drożdż M (2021a). *Jadalne kwiaty.* Wydanie rozszerzone. Wydawnictwo Pascal, Bielsko Biała.
- Kalemba-Drożdż M (2021b). *Pyszne chwasty.* Wydanie rozszerzone. Wydawnictwo Pascal, Bielsko Biała.
- Kalemba-Drożdż M, Cierniak A (2013). Wpływ róż na zdrowie – farmakologiczne i biochemiczne działanie ekstraktów z płatków *Rosa rugosa* i *Rosa damascena*. W: A Goździalska, J Jaśkiewicz (red.). *Współczesne kierunki w medycynie prewencyjnej.* Krakowskie Towarzystwo Edukacyjne – Oficyna Wydawnicza AFM, Kraków: 127–138.
- Kalemba-Drożdż M, Cierniak A (2019). Antioxidant and genoprotective properties of extracts from edible flowers. *J Food Nutr Res.* (58)1: 42–50. doi: 10.13140/RG.2.2.17195.49442/1.

- Kalemba-Drożdż M, Cierniak A, Cichoń I (2020). Berry fruit juices protect lymphocytes against DNA damage and ROS formation induced with heterocyclic aromatic amine PhIP. *J Berry Res.* 10(1): 95–113. doi: 10.3233/JBR-190429.
- Kalemba-Drożdż M, Kwiecień I, Szewczyk A, Cierniak A, Grzywacz-Kisielewska A (2020). Fermented Vinegars from Apple Peels, Raspberries, Rosehips, Lavender, Mint, and Rose Petals: The Composition, Antioxidant Power, and Genoprotective Abilities in Comparison to Acetic Macerates, Decoctions, and Tinctures. *Antioxidants (Basel)*. 9(11): 1121. doi: 10.3390/antiox9111121.
- Kalim MD, Bhattacharyya D, Banerjee A, Chattopadhyay S (2010). Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. *BMC Complement Altern Med.* 10: 77. doi: 10.1186/1472-6882-10-77.
- Karthika C, Sureshkumar R (2021). Incorporation of natural assumption to deal with cancer. *Environ Sci Pollut Res Int.* 28(5): 4902–4917. doi: 10.1007/s11356-020-11479-4.
- Kasthuri J, Veerapandian S, Rajendiran N (2009). Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 68(1): 55–60. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.021.
- Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M (2003). Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 51(1): 68–75. doi: 10.1021/jf025781x.
- Kawecki Z, Bieniek A (2002). *Vaccinium praestans* Lamb.– mniej znana roślina owocodajna z rodziny borówkowatych. *Biuletyn Naukowy UWM.* 16: 139–140.
- Khan T, Ullah N, Khan MA, Mashwani ZR, Nadhman A (2019). Plant-based gold nanoparticles; a comprehensive review of the decade-long research on synthesis, mechanistic aspects and diverse applications. *Adv Colloid Interf Sci.* 272: 102017. doi: 10.1016/j.cis.2019.102017.
- Kluk K (1805). *Dykcyonarz roślinny, w którym podług układu Linneusza są opisane rośliny nietylko krajowe dzikie, pożyteczne, albo szkodliwe [...] i cudzoziemskie [...], albo z których mamy lekarstwa, korzenie, farby, [...] albo ktore jakowąż nadzwyczajnosc w sobie maia [...] z poprzedzającym wykładem słów botanicznych, i kilkokrotnym na końcu reiestrem.* Tom I: A–E. Drukarnia XX Pijarów, Warszawa.
- Kohlmünzer S ([cop.] 1998). *Farmakognozja.* Wydanie 5 unowocześnień. Wydawnictwa Lekarskie PZWL, Warszawa.

- Koike A, Barreira JCM, Barros L, Santos-Buelga C, Villavicencio ALCH, Ferreira ICFR (2015). Edible flowers of *Viola tricolor* L. as a new functional food: antioxidant activity, individual phenolics and effects of gamma and electron-beam irradiation. *Food Chem.* 179: 6–14. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.123.
- Kosiorek A, Oszmiański J, Golański J (2013). Podstawy do zastosowania polifenoli roślinnych jako nutraceutyków o właściwościach przeciwplytkowych. *Postępy Fitoterapii.* 2: 108–117.
- Kostrzykina SA (2019). Ispol'zovanie krasniki (*Vaccinium praestans* lamb.) v proizvodstve mučnyh konditerskih izdelij. W: *Tehnologii proizvodstva i pererabotki sel'skohozjajstvennoj produkcii: sbornik naučnyh trudov.* Izdatel'stvo Dal'nevostočnogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, Blagovešensk [Кострыкина, СА (2019). Использование красники (*Vaccinium praestans* lamb.) в производстве мучных кондитерских изделий. W: *Технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции: сборник научных трудов.* Издательство Дальневосточного государственного аграрного университета, Благовещенск]: 77–81.
- Koszowska A, Dittfeld A, Puzoń-Brończyk A, Nowak J, Zubelewicz-Szkodzińska B (2013). Polifenole w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. *Postępy Fitoterapii.* 4: 263–266.
- Kucekova Z, Mlcek J, Humpolicek P, Rop O (2013). Edible flowers – antioxidant activity and impact on cell viability. *Cent Eur J Biol.* 8(10): 1023–1031. doi: 10.2478/s11535-013-0212-y.
- Kujawska M, Kant P, Mayoral IH, Ignatowicz E, Sikora J, Oszmianski J, Czapski J, Jodynis-Liebert J (2016). Effect of Chokeberry Juice on N-Nitrosodiethylamine-Induced Rat Liver Carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 35(4): 317–331. doi: 10.1615/JEnvironPathol-ToxicolOncol.2016014030.
- Kurzawa-Zegota M, Najafzadeh M, Baumgartner A, Anderson D (2012). The protective effect of the flavonoids on food-mutagen-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes from colon cancer patients. *Food Chem Toxicol.* 50(2): 124–129. doi: 10.1016/j.fct.2011.08.020.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas [Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins]. *Ciencia Rural.* 36(4): 1283–1287.

- Kwon EK, Lee DY, Lee H, Kim DO, Baek NI, Kim YE, Kim HY (2010). Flavonoids from the buds of *Rosa damascena* inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and angiotensin I-converting enzyme. *J Agric Food Chem.* 58(2): 882– 886. doi: 10.1021/jf903515f.
- Kyzioł A, Łukasiewicz S, Sebastian V, Kuśtrowski P, Kozieł M, Majda D, Cierniak A (2021). Towards plant-mediated chemistry – Au nanoparticles obtained using aqueous extract of *Rosa damascena* and their biological activity *in vitro*. *J Inorg Biochem.* 214: 111300. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111300.
- Lachat C, Raneri JE, Smith KW, Kolsteren P, Van Damme P, Verzelen K, Penafiel D, Vanhove W, Kennedy G, Hunter D, Odhiambo FO, Ntandou-Bouzitou G, De Baets B, Ratnasekera D, Ky HT, Remans R, Termotte C (2018). Dietary species richness as a measure of food biodiversity and nutritional quality of diets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 115(1): 127–132. doi: 10.1073/pnas.1709194115.
- Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drugs.* 2(2): 121–122. doi: 10.1007/s10637-005-5856-7.
- Lassoued MA, Ben Fatma NEH, Haj Romdhane M, Faidi A, Majdoub H, Sfar S (2021). Photoprotective potential of a Tunisian halophyte plant *Carpobrotus edulis* L. *Eur J Integr Med.* 42: 101286. doi: 10.1016/j.eujim.2021.101286.
- Lavefve L, Marasini D, Carbonero F (2019). Microbial Ecology of Fermented Vegetables and Non-Alcoholic Drinks and Current Knowledge on Their Impact on Human Health. *Adv Food Nutr Res.* 87: 147–185. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.09.001.
- Lee J, Finn CE, Wrolstad RE (2004). Comparison of anthocyanin pigment and other phenolic compounds of *Vaccinium membranaceum* and *Vaccinium ovatum* native to the Pacific Northwest of North America. *J Agric Food Chem.* 52(23): 7039–7044. doi: 10.1021/jf049108e.
- Lee Y, Park TG (2011). Facile fabrication of branched gold nanoparticles by reductive hydroxyphenol derivatives. *Langmuir.* 27(6): 2965–2971. doi: 10.1021/la1044078.
- Liang H, Zhou B, Li J, Liu X, Deng Z, Li B (2018). Engineering multifunctional coatings on nanoparticles based on oxidative coupling assembly of polyphenols for stimuli-responsive drug delivery. *J Agric Food Chem.* 66(26): 6897–6905. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01208.

- Liu WR, Qiao WL, Liu ZZ, Wang XH, Jiang R, Li SY, Shi RB, She GM (2013). Gaultheria: Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules*. 18(10): 12071–12108. doi: 10.3390/molecules181012071.
- Lobos GA, Hancock JF (2015). Breeding blueberries for a changing global environment: a review. *Front Plant Sci*. 6: 782. doi: 10.3389/fpls.2015.00782.
- Lofton C, Sigmund W (2005). Mechanisms controlling crystal habits of gold and silver colloids. *Adv Funct Mater*. 15(7): 1197–1208. doi: 10.1002/adfm.200400091.
- Loizzo MR, Pugliese A, Bonesi M, Tenuta MC, Menichini F, Xiao J, Tundis R (2016). Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties. *J Agric Food Chem*. 64(12): 2467–74. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03092.
- López-Romero D, Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, Madrigal-Bujaidar E, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M, Betanzos-Cabrera G, Alvarez-Gonzalez I, Morales-González Á, Madrigal-Santillán E (2018). Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 2: Plants, Vegetables, and Natural Resin. *Nutrients*. 10(12): 1954. doi: 10.3390/nu10121954.
- Lovecka P, Lipov J, Thumova K, Macurkova A (2017). Characterization of biologically active substances from *Calendula officinalis*. *Curr Pharm Biotechnol*. 18(14): 1167–1174. doi: 10.2174/1389201019666180226151910.
- Łuczaj Ł (2011). Dziko rosnące rośliny jadalne użytkowane w Polsce od połowy XIX w. do czasów współczesnych. *Etnobiologia Polska*. 1: 57–125.
- Łuczaj Ł, Szymański W (2007). Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review. *J Ethnobot Ethnomed*. 3: 17. doi: 10.1186/1746-4269-3-17.
- Ma X, Hartmann R, Jimenez de Aberasturi D, Yang F, Soenen SJH, Manshian BB, Franz J, Valdeperez D, Pelaz B, Feliu N, Hampf N, Riethmüller C, Vieker H, Frese N, Götzhäuser A, Simonich M, Tanguay RL, Liang XJ, Parak WJ (2017). Colloidal Gold Nanoparticles Induce Changes in Cellular and Subcellular Morphology. *ACS Nano*. 11(8): 7807–7820. doi: 10.1021/acsnano.7b01760.
- Mahboubi M (2015). *Rosa damascena* as holy ancient herb with novel applications. *J Tradit Complement Med*. 6(1): 10–16. doi: 10.1016/j.jtcme.2015.09.005.

- Mahlangeni NT, Moodley R, Jonnalagadda SB (2020). Nutritional value, antioxidant and antidiabetic properties of nettles (*Laportea alatifipes* and *Obetia tenax*). *Sci Rep.* 10(1): 9762. doi: 10.1038/s41598-020-67055-w.
- Mahmood N, Pizza C, Aquino R, De Tommasi N, Piacente S, Colman S, Burke A, Hay AJ (1993). Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antiviral Res.* 22(2–3): 189–199. doi: 10.1016/0166-3542(93)90095-z.
- Maimon Y, Karaush V, Yaal-Hahoshen N, Ben-Yosef R, Ron I, Vexler A, Lev-Ari S (2010). Effect of Chinese herbal therapy on breast cancer adenocarcinoma cell lines. *J Int Med Res.* 38(6): 2033–2039. doi: 10.1177/147323001003800617.
- Maimon Y, Samuels N, Cohen Z, Berger R, Rosenthal DS (2018). Botanical Formula LCS101: A Multi-Targeted Approach to Cancer Care. *Integr Cancer Ther.* 17(4): 1020–1026. doi: 10.1177/1534735418801528.
- Makowska-Wąs J, Janeczko Z (2004). Biodostępność polifenoli roślinnych. *Postępy Fitoterapii.* 3: 126–137.
- Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD. Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD (1986). Determinação Do Fator De Proteção Solar Por Espectrofotometria. *An Bras Dermatol.* 61: 121–124.
- Marcason W (2009). What is the Açai Berry and Are There Health Benefits?. *J Am Diet Assoc.* 109(11): 1968. doi: 10.1016/j.jada.2009.09.017.
- Marsilio V, Lanza B, Pozzi N (1996). Progress in table olive debittering: degradation *in vitro* of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *J Am Oil Chem Soc.* 73(5): 593–597. doi: 10.1007/BF02518113.
- Mata R, Nakkala JR, Sadras SR (2016). Polyphenol stabilized colloidal gold nanoparticles from *Abutilon indicum* leaf extract induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 143: 499–510. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.069.
- Matlack GR (1997). Resource allocation among clonal shoots of the fire-tolerant shrub *Gaylussacia baccata*. *Oikos.* 80(3): 509–518. doi: 10.2307/3546624.
- Matlack GR, Gibson DJ, Good RE (1993). Regeneration of the shrub *Gaylussacia baccata* and associated species after low-intensity fire in an Atlantic coastal plain forest. *Am J Bot.* 80(2): 119–126. doi: 10.2307/2445029.
- Matyjaszyk E, Śmiechowska M (2019). Edible flowers. Benefits and risks pertaining to their consumption. *Trends Food Sci Technol.* 91: 670–674. doi: 10.1016/j.tifs.2019.07.017.

- Meganathan P, Fu JY (2016). Biological properties of tocotrienols: evidence in human studies. *Int J Mol Sci.* 17(11): 1–11. doi: 10.3390/ijms17111682.
- Mileva M, Ilieva Y, Jovtchev G, Gateva S, Zaharieva MM, Georgieva A, Dimitrova L, Dobрева A, Angelova T, Vilhelmova-Ilieva N, Valcheva V, Najdenski H (2021). Rose Flowers – A Delicate Perfume or a Natural Healer?. *Biomolecules.* 11(1): 127. doi: 10.3390/biom11010127.
- Miller V, Mente A, Dehghan M, Rangarajan S, Zhang X, Swaminathan S, Dagenais G, Gupta R, Mohan V, Lear S, Bangdiwala SI, Schutte AE, Wentzel-Viljoen E, Avezum A, Altuntas Y, Yusoff K, Ismail N, Peer N, Chifamba J, Diaz R, Rahman O, Mohammadifard N, Lana F, Zatonska K, Wielgosz A, Yusufali A, Iqbal R, Lopez-Jaramillo P, Khatib R, Rosengren A, Kutty VR, Li W, Liu J, Liu X, Yin L, Teo K, Anand S, Yusuf S; Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study investigators (2017). Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. *Lancet.* 390(10107): 2037–2049. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32253-5.
- Mittal A, Pate MS, Wylie RC, Tollefsbol TO, Katiyar SK (2004). EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *Int J Oncol.* 24(3): 703–710.
- Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv.* 31(2): 346–356. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.
- Moein S, Moein M, Khoshnoud MJ, Kalanteri T (2012). *In vitro* antioxidant properties evaluation of 10 Iranian medicinal plants by different methods. *Iran Red Crescent Med J.* 14(12): 771–775. doi: 10.5812/ircmj.1408.
- Molina M, Tardío J, Aceituno-Mata L, Morales R, Reyes-García V, Pardo-de-Santayana M (2014). Weeds and Food Diversity: Natural Yield Assessment and Future Alternatives for Traditionally Consumed Wild Vegetables. *J of Ethnobiology.* 34(1): 44–67. doi: 10.2993/0278-0771-34.1.44.
- Montenegro-Landívar MF, Tapia-Quirós P, Vecino X, Reig M, Valderrama C, Granados M, Cortina JL, Saurina J (2021). Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Sci Total Environ.* 801: 149719. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149719.

- Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HMA (2006). Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. *Int J Aromather.* 16(1): 9–14. doi: 10.1016/j.ijat.2006.01.007.
- Mubashar Sabir S, Khan MF, Rocha JBT, Boligon AA, Athayde ML (2015). Phenolic profile, antioxidant activities and genotoxic evaluations of *Calendula officinalis*. *J Food Biochem.* 39(3): 316–324. doi: 10.1111/jfbc.12132.
- Muhamad M, Lee YK, Rahman NA, Yusof R (2017). Synthesized flavanoid-derived ligand reduced dengue virus type-2 replication *in vitro*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 7(2): 91–95. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.10.013.
- Murathan ZT, Zarifikhosroshahi M, Kafkas E, Sevindik E (2016). Characterization of bioactive compounds in rosehip species from East Anatolia region of Turkey. *Ital J Food Sci.* 28(2): 314–325. doi: 10.14674/1120-1770/ijfs.v198.
- Murrieta RSS, Dufour DL, Siqueira AD (1999). Food consumption and subsistence in three Caboclo populations on Marajo Island, Amazonia, Brazil. *Hum Ecol.* 27(3): 455–475.
- Nadagouda MN, Iyanna N, Lalley J, Han C, Dionysiou DD, Varma RS (2014). Synthesis of silver and gold nanoparticles using antioxidants from blackberry, blueberry, pomegranate, and turmeric extracts. *ACS Sustain Chem Eng.* 2(7): 1717–1723. doi: 10.1021/sc500237k.
- Nakagama H, Nakanishi M, Ochiai M (2005). Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci.* 96(10): 627–636. doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00107.x.
- Napagoda MT, Malkanthi BMASM, Abayawardana SAK, Qader MM, Jayasinghe L (2016). Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. *BMC Complement Altern Med.* 16(1): 479. doi: 10.1186/s12906-016-1455-8.
- Nardini M, Cirillo E, Natella F, Mencarelli D, Comisso A, Scaccini C (2002). Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chem.* 79(1): 119–124. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00213-3.
- Navarro-González I, González-Barrío R, García-Valverde V, Bautista-Ortín AB, Periago MJ (2014). Nutritional composition and antioxidant capacity in edible flowers: characterisation of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Int J Mol Sci.* 16(1): 805–822. doi: 10.3390/ijms16010805.

- Nguyen V, Tang J, Oroudjev E, Lee CJ, Marasigan C, Wilson L, Ayoub G (2010). Cytotoxic effects of bilberry extract on MCF7-GFP-tubulin breast cancer cells. *J Med Food*. 13(2): 278–285. doi: 10.1089/jmf.2009.0053.
- NIK (2018). Żywnienie pacjentów w szpitalach. Lata 2015–2017. Najwyższa Izba Kontroli, Warszawa, kwiecień; <https://www.nik.gov.pl/plik/id,16459,vp,18989.pdf> [dostęp: 3.03.2022].
- Oalđe M, Kolarević S, Živković J, Alimpić Aradski A, Jovanović Marić J, Kračun Kolarević M, Đorđević J, Marin PD, Šavikin K, Vuković-Gačić B, Duletić-Laušević S (2021). A comprehensive assessment of the chemical composition, antioxidant, genoprotective and antigenotoxic activities of Lamiaceae species using different experimental models *in vitro*. *Food Funct*. 12(7): 3233–3245. doi: 10.1039/D1FO00447F.
- Olech M, Nowak R, Pecio Ł, Łoś R, Malm A, Rzymowska J, Oleszek W (2017). Multidirectional characterisation of chemical composition and health-promoting potential of *Rosa rugosa* hips. *Nat Prod Res*. 31(6): 667–671. doi: 10.1080/14786419.2016.1180601.
- Oliveira AS, Weinberg ZG, Ogunade IM, Cervantes AAP, Arriola KG, Jiang Y, Kim D, Li X, Gonçalves MCM, Vyas D, Adesogan AT (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *J Dairy Sci*. 100(6): 4587–4603. doi: 10.3168/jds.2016-11815.
- de Oliveira DM, Markowicz-Bastos DH (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos [Phenolic acids bioavailability]. *Quim Nova*. 34(6): 1051–1056. doi: 10.1590/S0100-40422011000600023.
- de Oliveira PRB, da Costa CA, de Bem GF, Cordeiro VSC, Santos IB, de Carvalho LCRM, da Conceição EPS, Lisboa PC, Ognibene DT, Sousa PJC, Martins GR, da Silva AJR, de Moura RS, Resende AC (2015). Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. *PLoS One*. 10(12): e0143721. doi: 10.1371/journal.pone.0143721.
- Osono T, Iwamoto S, Trofymow JA (2008). Colonization and decomposition of salal (*Gaultheria shallon*) leaf litter by saprobic fungi in successional forests on coastal British Columbia. *Can J Microbiol*. 54(6): 427–434. doi: 10.1139/W08-023.
- Oz F, Kaban G, Kaya M (2010). Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with

- Oasis extraction method. *LWT*. 43(9): 1345–1350. doi: 10.1016/j.lwt.2010.04.014.
- Pacheco-Palencia LA, Mertens-Talcott S, Talcott ST (2008). Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 56(12): 4631–4636. doi: 10.1021/jf800161u.
- Pacholczyk M, Czernicki J, Ferenc T (2016). Wpływ słonecznego promieniowania ultrafioletowego (UV) na powstawanie raków skóry [The effect of solar ultraviolet radiation (UVR) on induction of skin cancers]. *Med Pr*. 67(2): 255–266. doi: 10.13075/mp.5893.00342.
- Park YJ, Park SY, Valan Arasu M, Al-Dhabi NA, Ahn HG, Kim JK, Park SU (2017). Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of Tagetes flowers. *Molecules*. 22(2): 313. doi: 10.3390/molecules22020313.
- Pasta S, La Rosa A, Garfi G, Marcenò C, Gristina AS, Carimi F, Guarino R (2020). An Updated Checklist of the Sicilian Native Edible Plants: Preserving the Traditional Ecological Knowledge of Century-Old Agro-Pastoral Landscapes. *Front Plant Sci*. 11: 388. doi: 10.3389/fpls.2020.00388.
- Patra S, Pradhan B, Nayak R, Behera C, Das S, Patra SK, Efferth T, Jena M, Bhutia SK (2021). Dietary polyphenols in chemoprevention and synergistic effect in cancer: Clinical evidences and molecular mechanisms of action. *Phytomedicine*. 90: 153554. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153554.
- Perde-Schrepler M, Chereches G, Brie I, Tatomir C, Postescu ID, Soran L, Filip A (2013). Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 118: 16–21. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.10.008.
- Pereira MJ (2006). Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 42(1): 65–68. doi: 10.1079/IVP2005720.
- Pereira MJ (2008). Reproductive biology of *Vaccinium cylindraceum* (Ericaceae), an endemic species of the Azores archipelago. *Botany*. 86(4): 359–366. doi: 10.1139/B07-136.
- Pereira MJ, Martins F, Costa T, Lima E, Baptista J (2016). *Vaccinium cylindraceum*: Desenvolvimento, produtividade e qualidade dos frutos produzidos, em exemplares plantados numa faixa tampão na bacia hidrográfica das Furnas (Ilha de São Miguel, Açores). W: *V Colóquio*

- National da Produção de Pequenos Frutos*. Associação Portuguesa de Horticultura, Lisboa: 61–70.
- Peres DA, de Oliveira CA, da Costa MS, Tokunaga VK, Mota JP, Rosado C, Consiglieri VO, Kaneko TM, Velasco MVR, Baby AR (2016). Rutin increases critical wavelength of systems containing a single UV filter and with good skin compatibility. *Skin Res Technol*. 22(3): 325–333. doi: 10.1111/srt.12265.
- Peres DD, Sarruf FD, de Oliveira CA, Velasco MVR, Baby AR (2018). Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PE. *J Photochem Photobiol B*. 185: 46–49. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.026.
- Peynshaert K, Manshian BB, Joris F, Braeckmans K, De Smedt SC, De-meester J, Soenen SJ (2014). Exploiting intrinsic nanoparticle toxicity: the pros and cons of nanoparticle-induced autophagy in biomedical research. *Chem Rev*. 114(15): 7581–7609. doi: 10.1021/cr400372p.
- Pezdiric M, Žegura B, Filipič M (2013). Genotoxicity and induction of DNA damage responsive by food-borne heterocyclic aromatic amines in human hepatoma HepG2 cells. *Food Chem Toxicol*. 59: 386–394. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.030.
- Pieroni A, Sôukand R (2018). Forest as Stronghold of Local Ecological Practice: Currently Used Wild Food Plants in Polesia, Northern Ukraine. *Econ Bot*. 72(3): 311–331. doi: 10.1007/s12231-018-9425-3.
- Pinela J, Carvalho AM, Ferreira ICFR (2017). Wild edible plants: Nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. *Food Chem Toxicol*. 110: 165–188. doi: 10.1016/j.fct.2017.10.020.
- Pires TCSP, Dias MI, Barros L, Calhelha RC, Alves MJ, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Res Int*. 105: 580–588. doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.014.
- Platt KL, Edenharder R, Aderhold S, Muckel E, Glatt H (2010). Fruits and vegetables protect against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines activated by human xenobiotic-metabolizing enzymes expressed in immortal mammalian cells. *Mutat Res*. 703(2): 90–98. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.007.
- Pliszka B, Ważbińska J, Huszcza-Ciołkowska G (2009). Polyphenolic compounds and bioelements in fruits of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) harvested in different fruit maturity phases. *J Elem*. 14(2): 341–348. doi: 10.5601/jelem.2009.14.2.14.

- Platosz N, Sawicki T, Wiczkowski W (2020). Profile of Phenolic Acids and Flavonoids of Red Beet and Its Fermentation Products. Does Long-Term Consumption of Fermented Beetroot Juice Affect Phenolics Profile in Human Blood Plasma and Urine?. *Pol J Food Nutr Sci.* 70(1): 55–65. doi: 10.31883/pjfn/116613.
- Podbielkowski Z (1989). *Słownik roślin użytkowych*. Wydanie 6. PWRiL, Warszawa.
- Ponder A, Hallmann E (2019). The effects of organic and conventional farm management and harvest time on the polyphenol content in different raspberry cultivars. *Food Chem.* 301: 125295. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125295.
- Potshangbam AM, Rathore RS, Nongdam P (2020). Discovery of sulfone-resistant dihydropteroate synthase (DHPS) as a target enzyme for kaempferol, a natural flavanoid. *Heliyon.* 6(2): e03378. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03378.
- Prencipe FP, Bruni R, Guerrini A, Rossi D, Benvenuti S, Pellati F (2014). Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive properties. *J Pharm Biomed Ana.* 89: 257–267. doi: 10.1016/j.jpba.2013.11.016.
- Rachkeeree A, Kantadoung K, Suksathan R, Puangpradab R, Page PA, Sommano SR (2018). Nutritional compositions and phytochemical properties of the edible flowers from selected zingiberaceae found in Thailand. *Front Nutr.* 5: 3. doi: 10.3389/fnut.2018.00003.
- Rachmut IH, Samuels N, Melnick SJ, Ramachandran C, Sharabi Y, Pavlovsky A, Maimon Y, Shoham J (2013). Immunomodulatory effects of the botanical compound LCS101: implications for cancer treatment. *Onco Targets Ther.* 24: 437–445. doi: 10.2147/OTT.S42038.
- Rao KJ, Paria S (2015). Aegle marmelos leaf extract and plant surfactants mediated green synthesis of Au and Ag nanoparticles by optimizing process parameters using Taguchi method. *ACS Sustain Chem Eng.* 3(3): 483–491. doi: 10.1021/acssuschemeng.5b00022.
- Ratajczak K, Piotrowska-Cyplik A (2017). Metabolity bakterii kwasu mlekowego i ich zastosowanie w przemyśle. *Post Mikrobiol.* 56(4): 416–421.
- Resich-Kozieł L, Niemyska K (2020). Rodzaje oraz przyczyny starzenia się skóry. *Kosmetologia Estetyczna.* 9(1): 17–22.
- Riaz G, Chopra R (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomed Pharmacother.* 102: 575–586. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.023.

- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20(7): 933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- Richling E, Häring D, Herderich M, Schreier P (1998). Determination of heterocyclic aromatic amines (HAA) in commercially available meat products and fish by high performance liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). *Chromatographia.* 48(3–4): 258–262. doi: 10.1007/BF02467680.
- Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A (2008). Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and ‘northblue’ blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem.* 110(1): 156–160. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.01.057.
- Rivas-García L, Navarro-Hortal MD, Romero-Márquez JM, Forbes-Hernández TY, Varela-López A, Llopis J, Sánchez-González C, Quiles JL (2021). Edible flowers as a health promoter: An evidence-based review. *Trends Food Sci Technol.* 117: 46–59. doi: 10.1016/j.tifs.2020.12.007.
- Roberts K, Diop A, St.-Pierre A, Tardif M, Vialle A, Barnabé S (2019). Comparing polyphenolic yields from the crowberry *Empetrum nigrum* L. on the Basse-Cote-Nord du Québec via solvent and microwave-assisted extractions. *Ind Biotechnol.* 15(3): 202–211. doi: 10.1089/ind.2019.0009.
- Rodrigues H, Cielo DP, Gómez-Corona C, Silveira AAS, Marchesan TA, Galmarini MV, Richards NSPS (2017). Eating flowers? Exploring attitudes and consumers’ representation of edible flowers. *Food Res Int.* 100(Pt2): 227–234. doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.018.
- Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, López de Felipe F, Gómez-Cordovés C, Mancheño JM, Muñoz R (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 132(2–3): 79–90. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025.
- Rodriguez-Casado A (2016). The health potential of fruits and vegetables phytochemicals: Notable examples. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56(7): 1097–1107. doi: 10.1080/10408398.2012.755149.
- Rohrmann S, Hermann S, Linseisen J (2009). Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study. *Am J Clin Nutr.* 89(5): 1418–1424. doi: 10.3945/ajcn.2008.26658.
- Ruan JQ, Nie LY, Qian LN, Zhao K (2021). Efficacy and Safety of Polyphenols for Osteoarthritis Treatment: A Meta-Analysis. *Clin Ther.* 43(8): e241–e253.e2. doi: 10.1016/j.clinthera.2021.06.005.

- Ruizheng F, Stevens P (2005). *Vaccinium*. W: ZY Wu, PH Raven, D Hong (eds.). *Flora of China*. Vol. 14: *Apiaceae through Ericaceae*. Science Press – Missouri Botanical Garden Press, Beijing – St. Louis: 476–489.
- Rutto LK, Xu Y, Ramirez E, Brandt M (2013). Mineral Properties and Dietary Value of Raw and Processed Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Int J Food Sci*. 2013: 857120. doi: 10.1155/2013/857120.
- Sabel MS, Arora A, Su G, Mathiowitz E, Reineke JJ, Chang AE (2007). Synergistic effect of intratumoral IL-12 and TNF-alpha microspheres: systemic anti-tumor immunity is mediated by both CD8+ CTL and NK cells. *Surgery*. 142(5): 749–760. doi: 10.1016/j.surg.2007.05.008.
- Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, Janes SM, Bakr OM, Cingolani R, Stellacci F, Pompa PP (2014). A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*. 6(12): 7052–7061. doi: 10.1039/C4NR01234H.
- Saewan N, Jimtaisong A (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *J App Pharm Sci*. 3(9): 129–141. doi: 10.7324/JAPS.2013.3923.
- Saidis (2021). *Fruit Berries of an Acai Palm Tree*. Pexels; <https://www.pexels.com/photo/fruit-berries-of-an-acai-palm-tree-6741479/> [dostęp: 10.01.2022].
- Salehi B, Machin L, Monzote L, Sharifi-Rad J, Ezzat SM, Salem MA, Mergahany RM, El Mahdy NM, Kılıç CS, Sytar O, Sharifi-Rad M, Sharopov F, Martins N, Martorell M, Cho WC (2020). Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*. 5(20): 11849–11872. doi: 10.1021/acsomega.0c01818.
- Salikova AA, Ustinova LV, Plaksen NV, Stepanov SV (2019). Vliânie me-teouslovij na nakoplenie antioksidanto v plodah *Vaccinium praestans*. *Problemy regional'noj êkologii* [Саликова АА, Устинова ЛВ, Плаксен НВ, Степанов СВ (2019). Влияние метеоусловий на накопле-ние антиоксидантов в плодах *Vaccinium praestans*. *Проблемы реги-ональной экологии*]. 5: 6–10. doi: 10.24411/1728-323X-2019-17006.
- Samuels N, Maimon Y, Zisk-Rony RY (2013). Effect of the Botanical Compound LCS101 on Chemotherapy-Induced Symptoms in Patients with Breast Cancer: A Case Series Report. *Integr Med Insights*. 8: 1–8. doi: 10.4137/IMI.S10841.
- Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Hernández-Carlos B, Villanueva-Cañongo C (2019). Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. W: M Soto-Hernández, R García-Mateos M Palma-Tenango (eds.). *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen, London. doi: 10.5772/intechopen.83815.

- Sasidharan S, Poojari R, Bahadur D, Srivastava R (2018). Embelin-mediated green synthesis of quasi-spherical and star-shaped Plasmonic nanostructures for antibacterial activity, photothermal therapy, and computed tomographic imaging. *ACS Sustain Chem Eng.* 6(8): 10562–10577. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b01894.
- Saxena M, Shakya AK, Sharma N, Shrivastava S, Shukla S (2012). Therapeutic efficacy of *Rosa damascena* Mill. on acetaminophen-induced oxidative stress in albino rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 31(3): 193–201. doi: 10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.v31.i3.10.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl): 215S–217S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.215S.
- Schiber A, Mihalev K, Berardini N, Mollov P, Carle R (2005). Flavonol glycosides from distilled petals of *Rosa damascena* Mill. *Z Naturforsch C J Biosci.* 60(5–6): 379–384. doi: 10.1515/znc-2005-5-602.
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D (2005). *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem.* 16(6): 360–367. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.006.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem.* 56(4): 1415–1422. doi: 10.1021/jf073035s.
- Seneta W, Dolatowski J, Zieliński J (2021). *Dendrologia*. Wydanie 5. WN PWN, Warszawa.
- Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M (2017). The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes. *J Sci Food Agric.* 97(8): 2623–2632, doi: 10.1002/jsfa.8085.
- Seok JK, Kwak JY, Choi GW, An SM, Kwak JH, Seo HH, Suh HJ, Boo YC (2016). Scutellaria radix Extract as a Natural UV Protectant for Human Skin. *Phytother Res.* 30(3): 374–379. doi: 10.1002/ptr.5534.
- Shah M, Badwaik VD, Dakshinamurthy R (2014). Biological applications of gold nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 14(1): 344–362. doi: 10.1166/jnn.2014.8900.
- Shahidi F, Naczki M (2005). *Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications*. Technomic Publ., Lancaster.

- Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev.* 41(6): 2323–2343. doi: 10.1039/c1cs15188f.
- Sharma A, Kaur M, Katnoria JK, Nagpal AK (2018). Polyphenols in food: cancer prevention and apoptosis induction. *Curr Med Chem.* 25(36): 4740–4757. doi: 10.2174/0929867324666171006144208.
- da Silva ACP, Paiva JP, Diniz RR, Dos Anjos VM, Silva ABSM, Pinto AV, Dos Santos EP, Leitão AC, Cabral LM, Rodrigues CR, de Pádula M, Santos BAMC (2019). Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: *In vitro* and *in silico* approach for improved sunscreens. *J Photochem Photobiol B.* 193: 162–171. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.03.003.
- Smith DA, Banks SW (1986). Formation and biological properties of iso-flavonoid phytoalexins. *Prog Clin Biol Res.* 213: 113–124.
- Sorrie B, Weakley A, Tucker G (2009). *Gaylussacia baccata*. W: Flora of North America Editorial Committee (ed.). *Flora of North America: North of Mexico*. Vol. 8: *Magnoliophyta: Paeoniaceae to Ericaceae*. Oxford University Press, New York – Oxford: 372, 374, 496, 515, 530, 531.
- Spínola V, Pinto J, Castilho PC (2018). Hypoglycemic, anti-glycation and antioxidant *in vitro* properties of two *Vaccinium* species from Macaronesia: A relation to their phenolic composition. *J Funct Foods.* 40: 595–605. doi: 10.1016/j.jff.2017.12.002.
- Stanisavljević N, Samardžić J, Janković T, Šavikin K, Mojsin M, Topalović V, Stevanović M (2015). Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chem.* 175: 516–522. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.009.
- Steinkraus KH (1998). Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods. W: BJB Wood (ed.). *Microbiology of fermented foods*. Springer, Boston, MA: 603–621. doi: 10.1007/978-1-4613-0309-1_19.
- Stepanov SV, Ustinova LV, Plaksen NV, Vinnik LA, Trofimova AA (2016). Polučenie i standartizaciâ soka i sir *Vaccinium Praestans*. *Aktual'nye problemy mediciny v Rossii i za rubežom* [Степанов СВ, Устинова ЛВ, Плаксен НВ, Винник ЛА. Трофимова АА (2016). Получение и стандартизация сока и сиропа плодов *Vaccinium Praestans*. *Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом*]. 3: 228–232.
- Štornik A, Skok B, Trček J (2016). Comparison of cultivable acetic acid bacterial microbiota in organic and conventional Apple

- Cider vinegar. *Food Technol Biotechnol*. 54(1): 113–119. doi: 10.17113/ftb.54.01.16.4082.
- Strike SS (1994). *Ethnobotany of the California Indians*. Vol. 2: *Aboriginal Uses of California's Indigenous Plants*. Koeltz Scientific Books USA/Germany, Champaign.
- Suksathan R, Rachkeeree A, Puangpradab R, Kantadoung K, Sommano SR (2021). Phytochemical and nutritional compositions and antioxidants properties of wild edible flowers as sources of new tea formulations. *NFS J*. 24: 15–25. doi: 10.1016/j.nfs.2021.06.001.
- Sułkowska-Ziaja K, Maślanka A, Szewczyk A, Muszyńska B (2017). Physiologically active compounds in four species of Phellinus. *Nat Prod Commun*. 12(3): 363–366.
- Sun H, Jia J, Jiang C, Zhai S (2018). Gold nanoparticle-induced cell death and potential applications in nanomedicine. *Int J Mol Sci*. 19(3): 754. doi: 10.3390/ijms19030754.
- Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in Cancer therapy, *Angew Chem Int Ed Engl*. 53(46): 12320–12364. doi: 10.1002/anie.201403036.
- Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B (2019). Gold nanoparticles in cancer treatment. *Mol Pharm*. 16(1): 1–23. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810.
- Szymanowska U, Baraniak B, Bogucka-Kocka A (2018). Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Postulated Cytotoxic Activity of Phenolic and Anthocyanin-Rich Fractions from Polana Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Fruit and Juice-*In Vitro* Study. *Molecules*. 23(7): 1812. doi: 10.3390/molecules23071812.
- Takanami I, Takeuchi K, Naruke M (2000). Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*. 88(12): 2686–2692.
- Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*. 5(4): e1373208. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.
- Tian Y, Liimatainen J, Alanne AL, Lindstedt A, Liu P, Sinkkonen J, Kallio H, Yang B (2017). Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chem*. 220: 266–281. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.145.
- Timberlake CF, Henry BS (1986). Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*. 10(1): 31–36. doi: 10.1016/0160-9327(86)90048-7.

- Tomonen M, Taipale M, Viander B, Pihlava JM, Korhonen H, Ryhänen EL (2002). Plant-derived biomolecules in fermented cabbage. *J Agric Food Chem.* 50(23): 6798–6803. doi: 10.1021/jf0109017.
- Tomazelli LC, de Assis Ramos MM, Sauce R, Cândido TM, Sarruf FD, de Oliveira Pinto CAS, de Oliveira CA, Rosado C, Velasco MVR, Baby AR (2018). SPF enhancement provided by rutin in a multifunctional sunscreen. *Int J Pharm.* 552(1–2): 401–406. doi: 10.1016/j.ij-pharm.2018.10.015.
- USDA. Food Data Central; <https://fdc.nal.usda.gov/> [dostęp: 21.11.2021].
- Valsalam S, Agastian P, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Ghilan AKM, Kaviyarasu K, Ravindran B, Chang SW, Arokiyaraj S (2019). Rapid biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Tropaeolum majus* L. and its enhanced *in-vitro* antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer properties. *J Photochem Photobiol B.* 191: 65–74. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.12.010.
- Vanamala J (2015). Food systems approach to cancer prevention. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(12): 2573–2588. doi: 10.1080/10408398.2015.1028023.
- Vander Kloet SP (1988). *The Genus Vaccinium in North America*. Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa.
- Vander Kloet SP (2009). *Vaccinium*. W: Flora of North America Editorial Committee (eds.). *Flora of North America: North of Mexico*. Vol. 8: *Magnoliophyta: Paeoniaceae to Ericaceae*. Oxford University Press, New York – Oxford: 515.
- Vander Kloet SP, Dickinson TA (2009). A subgeneric classification of the genus *Vaccinium* and the metamorphosis of *V.* section *Bracteata* Nakai: more terrestrial and less epiphytic in habit, more continental and less insular in distribution. *J Plant Res.* 122(3): 253–268. doi: 10.1007/s10265-008-0211-7.
- Viapiana A, Wesolowski M (2017). The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Foods Hum Nutr.* 72(1): 82–87. doi: 10.1007/s11130-016-0594-x.
- Vijayakumar R, Abd Gani SS, Zaidan UH, Halmi MIE, Karunakaran T, Hamdan MR (2020). Exploring the Potential Use of *Hylocereus polyrhizus* Peels as a Source of Cosmeceutical Sunscreen Agent for Its Antioxidant and Photoprotective Properties. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020: 7520736. doi: 10.1155/2020/7520736.
- Villanueva-Bermejo D, Vázquez E, Villalva M, Santoyo S, Fornari T, Reglero G, Rodríguez García-Risco M (2019). Simultaneous supercritical

- fluid extraction of heather (*Calluna vulgaris* L.) and marigold (*Calendula officinalis* L.) and anti-inflammatory activity of the extracts. *Appl Sci*. 9(11): 2245. doi: 10.3390/app9112245.
- Vorstenbosch T, de Zwarte I, Duistermaat L, van Anandel T (2017). Famine food of vegetal origin consumed in the Netherlands during World War II. *J Ethnobiol Ethnomed*. 13(1): 63 doi: 10.1186/s13002-017-0190-7.
- Vu KD, Carlettini H, Bouvet J, Côté J, Doyon G, Sylvain JF, Lacroix M (2012). Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. *Food Chem*. 132(2): 959–967. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.078.
- W.M (1655). *The Queen's Closet Opened. Incomparable secrets in physick, chirurgery, preserving, candying, and cookery; as they were presented to the queen by the most experienced persons of our times when the pleased to descent to these more private recreations*. Printed for Nathaniel Brook, London.
- Wang E, Liu Y, Xu C, Liu J (2017). Antiproliferative and proapoptotic activities of anthocyanin and anthocyanidin extracts from blueberry fruits on B16-F10 melanoma cells. *Food Nutr Res*. 61(1): 1325308. doi: 10.1080/16546628.2017.1325308.
- Wang F, Miao M, Xia H, Yang LG, Wang SK, Sun GJ (2016). Antioxidant activities of aqueous extracts from 12 Chinese edible flowers *in vitro* and *in vivo*. *Food Nutr Res*. 61(1): 1265324. doi: 10.1080/16546628.2017.1265324.
- Wang W, Ding X, Xu Q, Wang J, Wang L, Lou X (2016). Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 148(1): 541–548. doi: 10.1016/j.col-surf.2016.09.021.
- Webb AR, Slaper H, Koepke P, Schmalwieser AW (2011). Know Your Standard: Clarifying the CIE Erythema Action Spectrum. *Photochem Photobiol*. 87(2): 483–486. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00871.x.
- Wen A, Delaquis P, Stanich K, Toivonen P (2003). Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol*. 20(3): 305–311. doi: 10.1016/S0740-0020(02)00135-1.
- White WS, Zhou Y, Crane A, Dixon P, Quadt F, Flendrig LM (2017). Modeling the dose effects of soybean oil in salad dressing on carotenoid and fat-soluble vitamin bioavailability in salad vegetables. *Am J Clin Nutr*. 106(4): 1041–1051. doi: 10.3945/ajcn.117.153635.

- Whiting CG (1975). Some biochemical and flavour aspects of lactic acid bacteria in ciders and other alcoholic beverages. W: JG Carr, CV Cutting, GC Whiting (eds.). *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Proceedings of a symposium held at Long Ashton Research Station, University of Bristol, 19–21 September, 1973*. Academic Press, London: 69–85.
- WHO (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, Geneva, 28 January – 1 February 2002*. World Health Organization, Geneva.
- WHO (2020). *WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*. World Health Organization, Geneva; <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330745/9789240001299-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [dostęp: 30.03.2022].
- Wilkin JE, Shamoun SF, Ritland C, Ritland K, El-Kassaby YA (2005). Population genetics of *Gaultheria shallon* in British Columbia and the implications for management using biocontrol. *Can J Bot.* 83: 501–509. doi: 10.1139/b05-039.
- Woźniak A, Malankowska A, Nowaczyk G, Grześkowiak BF, Tuśnio K, Słomski R, Zaleska-Medynska A, Jurga S (2017). Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 28(6): 92. doi: 10.1007/s10856-017-5902-y.
- Wu S, Tian L (2017). Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (*Punica granatum*). *Molecules.* 22(10): 1606. doi: 10.3390/molecules22101606.
- Xia Y, Xiong Y, Lim B, Skrabalak SE (2009). Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics?. *Angew Chem Int Ed Engl.* 48(1): 60–103. doi: 10.1002/anie.200802248.
- Xu YJ, Kaur M, Dhillon RS, Tappia PS, Dhalla NS (2011). Health benefits of sea buckthorn for the prevention of cardiovascular diseases. *J Funct Foods.* 3(1): 2–12. doi: 10.1016/j.jff.2011.01.001.
- Yaal-Hahoshen N, Maimon Y, Siegelmann-Danieli N, Lev-Ari S, Ron IG, Sperber F, Samuels N, Shoham J, Merimsky O (2011). A prospective, controlled study of the botanical compound mixture LCS101 for chemotherapy-induced hematological complications in breast cancer. *Oncologist.* 16(9): 1197–1202. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0150.
- Zarzycki K (1963). Rodzina: *Empetraceae*, Bażynowate. W: B Pawłowski (red.). *Flora Polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych*.

- Tom X: *Dwuliścienne wolnopłatkowe: dwuokwiatowe. Cz. 8: Zrosłopłatkowe. Cz. 1.* Oprac. H Błaszyk i wsp. PWN, Warszawa – Kraków: 88.
- Zhang B, Xia T, Duan W, Zhang Z, Li Y, Fang B, Xia M, Wang M (2019). Effects of organic acids, amino acids and phenolic compounds on antioxidant characteristic of Zhenjiang aromatic vinegar. *Molecules*. 24(20): 3799. doi: 10.3390/molecules24203799.
- Zhang D, Zhang J, Zeng J, Li Z, Zuo H, Huang C, Zhao X (2019). Nano-Gold Loaded with resveratrol enhance the anti-hepatoma effect of resveratrol *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Nanotechnol*. 15(2): 288–300. doi: 10.1166/jbn.2019.2682.
- Zhao G, Yin Z, Dong J (2009). Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *J Ethnopharmacol*. 125(2): 265–268. doi: 10.1016/j.jep.2009.06.030.
- Zhao M, Wang P, Li D, Shang J, Hu X, Chen F (2017). Protection against neo-formed contaminants (NFCs)-induced toxicity by phytochemicals. *Food Chem Toxicol*. 108(Pt B): 392–406. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.023.
- Zhao S, Shamoun S (2006). Effects of culture media, temperature, pH, and light on growth, sporulation, germination, and bioherbicidal efficacy of *Phoma exigua*, a potential biological control agent for salal (*Gaultheria shallon*). *Biocontrol Sci Technol*. 16(10): 1043–1055. doi: 10.1080/09583150600828643.
- Zhao Y, He Z, Hao W, Zhu H, Liang N, Liu J, Zhang C, Ma KY, He WS, Yang Y, Chen ZY (2020). Vinegars but not acetic acid are effective in reducing plasma cholesterol in hamsters fed a high-cholesterol diet. *Food Funct*. 11(3): 2163–2172. doi: 10.1039/c9fo02630d.

SPIS RYCIN I TABEL

Ryciny

Rycina 1. Róża pomarszczona (<i>Rosa rugosa</i>)	9
Rycina 2. Róża damasceńska (<i>Rosa damascena</i>)	15
Rycina 3. Obraz z mikroskopu TEM przedstawiający nanocząstki złota uzyskane z użyciem wodnego ekstraktu z róży damasceńskiej w różnej skali	21
Rycina 4. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml na żywotność limfocytów pobranych od zdrowych dawców	26
Rycina 5. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml na żywotność komórek A549 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji....	27
Rycina 6. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml na żywotność komórek HL60 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji...	27
Rycina 7. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w limfocytach izolowanych od zdrowych dawców.....	28
Rycina 8. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (8a) uszkodzenia DNA w limfocytach kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (8b) po 48 godzinach inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml.....	29
Rycina 9. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach linii A549 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml	30
Rycina 10. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (10a) uszkodzenia DNA w komórkach A549 kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (10b) po 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml.....	30
Rycina 11. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach linii HL60 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml	31
Rycina 12. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (12a) uszkodzenia DNA w komórkach HL60 kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (12b) po 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml.....	31

Rycina 13. Wpływ Au@RD NPs na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach linii A549 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml	32
Rycina 14. Wpływ Au@RD NPs na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach linii HL60 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml	32
Rycina 15. Przykładowe zdjęcie (15a) komórek A549 oraz (15b) komórek HL60 wybarwionych Hoechst 33342	33
Rycina 16. Piwonia chińska (<i>Paeonia lactiflora</i>)	39
Rycina 17. Wybrane kwiaty jadalne jako przykłady surowców polifenolowych	49
Rycina 18. Obraz mikroskopowy badania żywotności limfocytów w metodzie fluorescencyjnego barwienia różnicowego	65
Rycina 19. Redukcja MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu) do formazanu ((E,Z)-5-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-1,3-difenyloformazan)	66
Rycina 20. Wizualizacja uszkodzeń DNA w metodzie kometowej	68
Rycina 21. Zależność między siłą redukcyjną (FRAP) a całkowitym stężeniem polifenoli w sokach tłoczonych z owoców	71
Rycina 22. Zależność między siłą redukcyjną (FRAP) a stężeniem witaminy C w sokach wyciskanych z owoców	71
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	74
Rycina 24. Zależność pomiędzy siłą redukcyjną mierzoną metodą FRAP a stężeniem polifenoli oznaczonych Fast Blue BB w ekstraktach z jadalnych kwiatów	77
Rycina 25. Zależność pomiędzy siłą redukcyjną (FRAP) a stężeniem polifenoli (Fast Blue BB) w ekstraktach z liści jadalnych dzikich roślin	78
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	83
Rycina 27. Uszkodzenia DNA w limfocytach poddanych działaniu soków owocowych (słupki pomarańczowe) i PhIP oraz soków owocowych (słupki niebieskie)	84
Rycina 28. Uszkodzenia DNA w limfocytach mierzone testem kometowym po ekspozycji na analizowane ekstrakty przez 1 godzinę (słupki niebieskie)	85

Rycina 29. Zależność między zdolnościami genoprotekcyjnymi ekstraktów zielonych i owocowych a stężeniem związków polifenolowych.....	86
Rycina 30. Poziom uszkodzeń DNA w limfocytach mierzony metodą kometową.....	87
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 μ M nadtlakiem wodoru.....	88
Rycina 32. Liście kapusty właściwej (<i>Brassica rapa</i>) poddane fermentacji mlekowej.....	99
Rycina 33. Szlak Embdena-Meyerhofa-Parnasa – schemat uproszczony.....	103
Rycina 34. Redukcja pirogronianu do kwasu mlekowego.....	103
Rycina 35. Szlak pentozofosforanowy – faza I oksydacyjna, schemat uproszczony.....	104
Rycina 36. Szlak pentozofosforanowy – faza II nieoksydacyjna, schemat uproszczony.....	104
Rycina 37. Poglądowy mechanizm transformacji pochodnych kwasu benzoowego.....	110
Rycina 38. Poglądowy mechanizm powstawania pochodnych kwasu cynamonowego.....	111
Rycina 39. Karpobrot jadalny (<i>Carpobrotus edulis</i>).....	115
Rycina 40. Struktura flawanu.....	123
Rycina 41. Struktura rutyny.....	125
Rycina 42. Struktura kwercetyny.....	129
Rycina 43. Struktura oleuropeiny.....	130
Rycina 44. Wzór strukturalny bajkaliny.....	132
Rycina 45. Jagody borówki bagiennnej (<i>Vaccinium uliginosum</i>).....	141
Rycina 46. Jagody acai – owoce euterpy warzywnej (<i>Euterpe oleracea</i>).....	146
Rycina 47. <i>Vaccinium myrtilloides</i>	150
Rycina 48. Bażyna czarna (<i>Empetrum nigrum</i>).....	153
Rycina 49. <i>Gaultheria shallon</i>	155

Tabele

Tabela 1. Siła przeciwutleniająca oraz zawartość polifenoli, antocyjanów, flawonoidów i witaminy C w sokach owocowych	70
Tabela 2. Zawartość polifenoli, antocyjanów, witaminy C i karotenoidów oraz FRAP w tradycyjnych ekstraktach z ziół i owoców	72
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	75
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	77
Tabela 5a. Identyfikacja kwasów fenolowych w ekstraktach z ziół i owoców przy pomocy wysokosprawnej chromatografii ciekowej	80
Tabela 5b. Identyfikacja flawonoidów w ekstraktach z ziół i owoców przy pomocy wysokosprawnej chromatografii ciekowej.....	81
Tabela 6. Żywotność limfocytów od zdrowych dawców po inkubacji z sokami owocowymi przez 1 i 24 godziny	82
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% CO ₂	82
Tabela 8. Żywotność limfocytów inkubowanych z 1-procentowym wyciągiem z liści dzikich roślin jadalnych przez 1 i 24 godziny	83
Tabela 9. Zestawienie kwasów fenolowych występujących w kiszonkach warzywnych	109
Tabela 10. Zestawienie flawonoidów występujących w kiszonkach warzywnych	112

Monografia jest zbiorem interesujących i aktualnych artykułów naukowych, o charakterze zarówno oryginalnych prac badawczych (rozdziały 1 i 3), jak również prac poglądowych (rozdziały 2, 4, 5 i 6). (...)

Podjęta w monografii problematyka jest z pewnością aktualna i obejmuje zarówno zagadnienia związane z potencjałem leczniczym polifenolowych ekstraktów roślinnych i mieszanek ziołowych w kierunku wspomagania leczenia chorób nowotworowych, z którymi borykają się społeczeństwa na całym świecie, jak również zwraca uwagę na wyzwania związane ze zrównoważoną gospodarką i ochroną klimatu. (...)

Tematyka podjęta w monografii i zawarte w niej treści powinny zainteresować szerokie grono czytelników zajmujących się zarówno badaniami biomedycznymi, jak też dietetyką, technologią przetwórstwa surowców roślinnych do celów spożywczych oraz botaniką czy też chemią.

dr hab. Maja Grabacka, prof. Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie