

**Wpływ składników owoców *Viburnum opulus* na metabolizm  
lipidów – badania *in vitro***

mgr inż. Nina Pietrzyk

Promotor: dr hab. inż. Anna Podsędek

Promotor pomocniczy: dr inż. Małgorzata Zakłos-Szyda

## Streszczenie

Stale rosnąca zachorowalność na choroby metaboliczne, w tym niealkoholowe stłuszczenie wątroby, otyłość i cukrzycę typu 2, skłania naukowców do poszukiwania nowych terapeutyków wpływających na poprawę gospodarki lipidowej. Jednak farmakologiczne leczenie zaburzeń metabolicznych związanych z gospodarką lipidową jest trudne i niesie za sobą dużą liczbę efektów ubocznych. Dlatego też w ostatnich latach zaobserwowano zintensyfikowanie badań dotyczących naturalnych fitozwiązków i ich wykorzystania w prewencji chorób metabolicznych. Wśród bioaktywnych składników roślin na szczególną uwagę zasługują związki fenolowe. Mogą one wpływać na homeostazę lipidów poprzez hamowanie aktywności enzymów lipolitycznych, zmniejszenie akumulacji lipidów i wychwytu wolnych kwasów tłuszczowych, oddziaływanie na potencjał mitochondrialny i wytwarzanie ATP na skutek aktywności antyoksydacyjnej. Szczególnie ważna jest zdolność związków fenolowych do zmniejszenia procesów lipogenezy i glukoneogenezy, istotnie zaburzonych w stanie stłuszczenia komórek wątroby i tkanki tłuszczowej. Wysokie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych mogą działać lipotoksycznie wobec komórek tkanek obwodowych, jak mięśnie szkieletowe.

Do roślin bogatych w składniki bioaktywne należy kalina koralowa (*Viburnum opulus* L.). W Europie Wschodniej owoce kaliny wykorzystywane są do wytwarzania dżemów, konfitur i nalewek, zaś w Turcji produkowany jest z nich fermentowany niealkoholowy napój o właściwościach prozdrowotnych. Aktywność biologiczna owoców *V. opulus* wynika z jej bogatego składu, w ramach którego można wymienić związki fenolowe, w tym flawonoidy, antocyjany oraz proantocyjanidyny, a także witaminę C, karotenoidy oraz irydoidy. Dotychczas tylko nieliczne badania *in vitro* potwierdzają właściwości przeciwzapalne, przeciwootyłościowe oraz przeciwcukrzycowe owoców kaliny koralowej.

W niniejszej pracy określono właściwości cytoprotekcyjne preparatów uzyskanych z owoców *V. opulus* wobec ludzkich komórek hepatocytów linii HepG2 oraz szczurzych komórek mioblastów linii L6. Ocenie aktywności biologicznej poddano cztery wyjściowe preparaty z kaliny koralowej, a mianowicie sok uzyskany z owoców, związki fenolowe wyizolowane z soku w wyniku ekstrakcji do fazy stałej oraz preparaty uzyskane z wycieków po ekstrakcji metanolowo-acetonowej lub acetonowej. Badane preparaty charakteryzowały się wysoką zawartością związków fenolowych, zaś analiza profilu fenolowego metodą UPLC-PDA-Q/TOF-MS potwierdziła obecność flawanoli, flawonoli, antocyjanów oraz kwasów hydroksycynamonowych, a także kwas chlorogenowy jako dominujący związek fenolowy. Preparaty z owoców kaliny koralowej charakteryzowały się wysoką aktywnością antyoksydacyjną w badanym układzie komórkowym.

Wpływ preparatów z owoców *V. opulus* na metabolizm lipidów i ich cytoprotekcyjne działanie określono dla komórek hodowanych w warunkach standardowych oraz indukowanego stłuszczenia przy użyciu kwasów palmitynowego i oleinowego oraz ich mieszaniny. W przypadku komórek stłuszczonych preparaty zmniejszały stres oksydacyjny, redukowały akumulację lipidów, a także zwiększały pobieranie glukozy zarówno przez komórki hepatocytów, jak i mioblastów.

Celem wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania związków fenolowych owoców *V. opulus* w komórkach HepG2 przy użyciu metody Western blott poddano ocenie poziom białek istotnie zaangażowanych w metabolizm lipidów pod kątem procesu lipogenezy – procesu syntezy lipidów odgrywającego główną rolę w rozwoju niealkoholowego stłuszczenia wątroby, otyłości i insulinooporności, a mianowicie kinazę białkową AMPK regulującą aktywność lipogenicznych białek SREBP-1c, ACC oraz FAS. Podczas gdy kwasy tłuszczowe zwiększały poziom badanych białek, to preparaty z owoców *V. opulus* intensyfikowały poziom fosforylacji AMPK (zwiększony poziom pAMPK $\alpha$

Thr172) oraz zmniejszały poziom białek SREBP-1c, ACC oraz FAS. Podana tendencja zaobserwowana została również w warunkach ko-inkubacji komórek z kwasami tłuszczowymi i preparatami kaliny. W przypadku ko-inkubacji komórek HepG2 z preparatami i kwasami tłuszczowymi wysokie współczynniki korelacji Pearsona potwierdziły, że wzrost poziomu pSREBP-1c i pACC wynika ze zwiększonej aktywności AMPK. Dalsze badania wskazały, iż w komórkach HepG2 aktywacja AMPK jest wynikiem fosforylowania reszty Thr172 w obrębie jej podjednostki katalitycznej  $\alpha$  przeprowadzonej przez kinazę LKB-1. Co istotne, zaobserwowano również allosteryczną aktywację AMPK, która wynika ze zwiększenia wewnątrzkomórkowego stosunku AMP/ATP pod wpływem badanych ekstraktów. Pozwala to na przypuszczenie, że ten złożony mechanizm aktywacji AMPK jest odpowiedzialny za obniżenie akumulacji lipidów w komórkach hepatocytów inkubowanych z preparatami z owoców *V. opulus* w warunkach indukowanej steatozy.

W związku z tym, że zaburzona gospodarka glukozy przyczynia się do pogłębiania procesu stłuszczenia komórek i ich insulinooporności, poddano analizie poziomy białek uczestniczących w sygnalizacji szlaku receptora insulinowego – jego substratu IRS-1 oraz formy fosforylowanej (pIRS-1), transporterów glukozy GLUT4 oraz PTP-1B – negatywnego regulatora szlaku receptora insulinowego defosforylującego pIRS-1. Inkubacja komórek HepG2 z kwasem palmitynowym spowodowała zwiększony poziom PTP-1B z jednoczesnym zmniejszeniem poziomu pIRS-1. Ko-inkubacja komórek z badanymi preparatami skutkowała zwiększeniem fosforylacji IRS-1 (większy poziom pIRS-1) oraz zmniejszyła poziom PTP-1B. Nie obserwowano natomiast zmian w poziomie transportera GLUT4, a jedynie poprawę procesu pobierania glukozy, zwiększenie poziomu glikogenu oraz zmniejszenie poziomu glukozy uwalnianej przez komórki do podłoża. Wyniki sugerują, że oprócz pozytywnego wpływu na metabolizm lipidów, preparaty z owoców *V. opulus* zwiększają wrażliwość komórek na insulinę w warunkach ich stłuszczenia.

Biorąc pod uwagę fakt, że kwas chlorogenowy stanowił blisko 70% puli wszystkich zidentyfikowanych związków fenolowych owoców kaliny koralowej, postanowiono ocenić czy aktywność badanych preparatów jest wynikiem aktywności samego kwasu chlorogenowego. Inkubacja komórek HepG2 i L6 wraz ze stężeniami kwasu chlorogenowego odpowiadającymi zawartości tego związku w stosowanych niecytotoksycznych stężeniach preparatów wykazała jego dużo niższą aktywność biologiczną w porównaniu do wyjściowych preparatów (lub jej brak). Sugeruje to potencjalny synergizm działania związków fenolowych owoców kaliny koralowej. Potwierdziły to dalsze badania skupiające się na frakcjach uzyskanych z najbardziej aktywnego preparatu (oczyszczonego soku) po jego rozdziale na złożu Sephadex™ LH-20. Żadna z 5 uzyskanych frakcji (zawierających różne grupy związków fenolowych) nie wykazała zbliżonej lub wyższej aktywności biologicznej wobec komórek HepG2 i L6 od oczyszczonego soku.

Kluczowym aspektem niniejszej pracy doktorskiej było określenie aktywności świeżego soku (jako preparatu o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle spożywczym) oraz oczyszczonego soku (jako bioaktywnego składnika żywności funkcjonalnej lub suplementów diety) po procesie symulowanego trawienia *in vitro*. W wyniku oczyszczenia uzyskanych mieszanin pokarmowych metodą ekstrakcji do fazy stałej uzyskano frakcje związków fenolowych strawionych preparatów, dla których następnie określono aktywność biologiczną. Preparat świeżego soku utracił swoją cytoprotekcyjną aktywność, podczas gdy preparat oczyszczonego soku zmniejszał akumulację lipidów oraz wychwytywał wolne kwasy tłuszczowe, obniżał poziom reaktywnych form tlenu i zwiększał pobieranie analogu glukozy w warunkach „normalnych” i przy indukowanym stłuszczeniu. Jednakże proces trawienia oczyszczonego soku spowodował obniżenie jego aktywności o blisko 50%. Badania te pozwoliły na potwierdzenie zachowania aktywności cytoprotekcyjnej związków fenolowych soku kaliny koralowej

w warunkach indukowanego stłuszczenia po procesie trawienia i jednocześnie mogą sugerować ich funkcjonalność. Aktywną frakcję związków fenolowych oczyszczonego soku kaliny koralowej stanowiły w większości pochodne kwasów hydroksycynamonowych, w tym kwas chlorogenowy oraz jego izomery – kwas neochlorogenowy i kwas kryptochlorogenowy. Pozostałe związki fenolowe (flawanole, flawonole i antocyjany) zidentyfikowane w preparacie poddanym trawieniu uległy całkowitej lub częściowej degradacji podczas procesu trawienia *in vitro*.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki potwierdzają celowość stosowania preparatów z owoców kaliny koralowej (głównie oczyszczonego soku, zasobnego w związki fenolowe) w prewencji chorób metabolicznych związanych z zaburzoną gospodarką lipidową. Owoce kaliny mogą stanowić doskonały surowiec do wzbogacania żywności funkcjonalnej lub preparatów farmaceutycznych o charakterze suplementów diety.