



**Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie**

mgr Natalia Płatosz

**Przenikanie antocyjanów aronii i kapusty czerwonej
oraz ich metabolitów przez barierę krew-płyn mózgowordzeniowy
w badaniach modelowych na owcach**

Praca doktorska wykonana

w Zakładzie Chemii i Biodynamiki Żywności

Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

pod kierunkiem

dr hab. inż. Wiesława Wiczковского, prof. Instytutu

Olsztyn 2022

Badania wykonano w ramach projektu badawczego nr 2015/17/B/NZ9/01733 (OPUS 9)
finansowanego z Narodowego Centrum Nauki.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

PI. Platosz N., Bączek N., Topolska J., Szawara-Nowak D., Skipor J., Milewski S., Wiczowski W. 2021. Chokeberry anthocyanins and their metabolites ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Food Chemistry*, 346, 128730. DOI: [10.1016/j.foodchem.2020.128730](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128730)
IF: 9.231, MEiN: 200 pkt

PII. Platosz N., Bączek N., Topolska J., Szawara-Nowak D., Misztal T., Wiczowski W. 2020. The blood-cerebrospinal fluid barrier is selective for red cabbage anthocyanins and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(31): 8274-8285. DOI: [10.1021/acs.jafc.0c03170](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03170)
IF: 5.895, MEiN: 140 pkt

PIII. Platosz N., Bączek N., Topolska J., Szawara-Nowak D., Wiczowski W. 2022. The blood–cerebrospinal fluid barrier features different permeability to cyanidin 3-galactoside and cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside and their metabolites circulating in blood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(40): 12852-12864. DOI: [10.1021/acs.jafc.2c03778](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03778)
IF: 5.895, MEiN: 140 pkt

Artykuły przedstawiono w kolejności omawiania. Punktację i wskaźnik Impact Factor (IF) podano wg danych obowiązujących w roku opublikowania.

Spis treści

STRESZCZENIE	6
SUMMARY.....	8
Wykaz skrótów	10
1. WSTĘP.....	12
2. CEL I ZAKRES BADAŃ	16
3. MATERIAŁY I METODY	17
3.1. Materiał badawczy.....	17
3.2. Eksperymenty i metody	17
3.2.1. Przygotowanie liofilizatu kapusty czerwonej	17
3.2.2. Ekstrakcja antocyjanów z materiału roślinnego.....	17
3.2.3. Izolacja 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny	18
3.2.4. Przygotowanie preparatów antocyjanowych	18
3.2.5. Doświadczenie z udziałem zwierząt laboratoryjnych	19
3.2.6. Ekstrakcja antocyjanów i ich metabolitów II fazy z płynów fizjologicznych	20
3.2.7. Analiza antocyjanów i ich metabolitów II fazy	20
3.2.8. Analiza statystyczna.....	21
4. WYNIKI I DYSKUSJA.....	22
4.1. Określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z aronii [publikacja: PI; Płatosz i in., 2021]	22
4.1.1. Charakterystyka profilu i zawartości antocyjanów aronii.....	22
4.1.2. Badanie profilu i zawartości antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec	23
4.1.2.1. Profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w osoczu krwi	25
4.1.2.2. Profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w moczu.....	28
4.1.2.3. Profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w płynie mózgowo-rdzeniowym.....	29
4.2. Określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z kapusty czerwonej [publikacja: PII; Płatosz i in., 2020].....	32
4.2.1. Charakterystyka profilu i zawartości antocyjanów kapusty czerwonej	32
4.2.1. Badanie profilu i zawartości antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec	33

4.2.1.1. Badanie profilu i stężenie antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w osoczu krwi owiec	33
4.2.1.2. Badanie profilu i stężenie antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w moczu owiec	34
4.2.1.3. Badanie profilu i stężenie antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w płynie mózgowo-rdzeniowym owiec.....	35
4.3. Określenie zdolności pochodnych cyjanidyny i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy po dożylnym podaniu owcom preparatu 3-galaktozydu cyjanidyny oraz 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny [publikacja: PIII; Płatosz i in., 2022]	37
4.3.1. Badanie profilu i zawartości 3-galaktozydu cyjanidyny oraz 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec.....	37
4.3.1.1. Zmiany profilu i stężenia 3-galaktozydu cyjanidyny oraz 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny i ich metabolitów II fazy w osoczu krwi, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym.....	38
4.3.1.2. Porównanie zdolności 3-galaktozydu cyjanidyny i 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny oraz ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy.....	40
5. WNIOSKI	44
6. PIŚMIENNICTWO.....	45
OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI	51
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	55

STRESZCZENIE

Przenikanie antocyjanów kapusty czerwonej i aronii oraz ich metabolitów przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy w badaniach modelowych na owcach

Celem podjętych badań było określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (barierę krew-PMR) w badaniach modelowych na owcach, a także zmiany profilu i stężenia tych związków w płynach fizjologicznych owiec (osocze krwi, mocz i płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR)) po dożwaczowym podaniu aronii i kapusty czerwonej oraz po dożylnym podaniu mieszaniny 3-galaktozydu cyjanidyny (Cy3gal, głównego związku antocyjanowego aronii) i 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny (Cy3diG5G, podstawowego związku antocyjanowego kapusty czerwonej) umożliwiającym pominięcie wpływu procesów wchłaniania.

W pierwszym etapie przeprowadzono analizę antocyjanów i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec (n = 16) po dożwaczowym podaniu preparatu z aronii w dawce 10 mg cyjanidyny/kg masy ciała. W analizowanych metodą mikro-HPLC-MS/MS płynach fizjologicznych owiec oprócz czterech natywnych antocyjanów, zidentyfikowano 17 metabolitów tych związków, w tym formy metylowane, glukuronowane i siarczanowane. Wśród zidentyfikowanych związków w osoczu krwi, moczu i PMR owiec głównym związkiem natywnym był Cy3gal, natomiast wśród metabolitów II fazy dominowała metylowana pochodna Cy3gal. Uzyskane wyniki wskazują, że antocyjany aronii mają zdolność przenikania przez barierę krew-PMR, a chwilowe stężenie i profil antocyjanów i ich metabolitów II fazy w PMR może kształtować się w wyniku zmian stężenia tych związków w osoczu krwi, procesów napływu i wypływu przez barierę krew-PMR oraz intensywności i kierunku metabolizmu w komórkach barierowych.

W drugim etapie przeprowadzono analizę antocyjanów i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec (n = 16) po dożwaczowym podaniu preparatu z kapusty czerwonej w dawce 10 mg cyjanidyny/kg masy ciała. Analizę antocyjanów i ich metabolitów II fazy przeprowadzono metodą mikro-HPLC-MS/MS. Wykazano, że po podaniu preparatu z kapusty czerwonej w osoczu krwi i moczu owiec były obecne nieacylowane i acylowane antocyjany oraz ich metabolity II fazy w postaci pochodnych metylowanych, glukuronowanych i siarczanowanych (łącznie zidentyfikowano 34 pochodne cyjanidyny). Spośród 17 natywnych antocyjanów kapusty czerwonej występujących w osoczu krwi owiec, tylko jeden związek

(Cy3G5G) wykryto w PMR tych zwierząt. W pobranym PMR nie znaleziono Cy3diG5G i acylowanych pochodnych cyjanidyny. W przypadku metabolitów II fazy, wśród 17 pochodnych cyjanidyny zidentyfikowanych w osoczu krwi, aż 11 stwierdzono również w PMR. Uzyskane wyniki wskazują, że bariera krew-PMR jest selektywna dla nieacylowanych i acylowanych antocyjanów.

W trzecim etapie przeprowadzono analizę antocyjanów i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec ($n = 16$) po pojedynczym, dożylnym podaniu mieszaniny Cy3gal i Cy3diG5G w dawce 1 mg każdego związku/kg masy ciała. Analiza mikro-HPLC-MS/MS wykazała, że po dożylnym podaniu antocyjany przenikały przez barierę krew-PMR, a potencjał przenikania pochodnych Cy3gal był wyższy niż pochodnych Cy3diG5G. Uzyskane wyniki wskazują, że antocyjany mogą konkurować o nośnik odpowiedzialny za ich transport przez barierę krew-PMR, a różnice w przenikaniu tych związków zależą od rodzaju i liczby podstawników, a także wielkości cząsteczki.

Podsumowując, rezultaty uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej dostarczają nowej, istotnej wiedzy wskazującej, że antocyjany aronii i kapusty czerwonej (poza pochodnymi acylowanymi) oraz ich metabolity II fazy przenikają przez barierę krew-PMR. Tym samym uzyskane wyniki wskazują, że gromadzące się w PMR antocyjany w formach natywnych i ich metabolitów II fazy dzięki swoim właściwościom, między innymi silnym właściwościom przeciwutleniającym, mogą korzystnie oddziaływać na procesy zachodzące w szczególnie podatnym na uszkodzenia oksydacyjne środowisku centralnego układu nerwowego. Śledzenie biologicznego losu antocyjanów po ich przyjęciu (od wchłonięcia do krwi, do przenikania do PMR) może ułatwić zaprojektowanie dalszych procedur eksperymentalnych w celu określenia właściwości biologicznych tych barwnych związków fenolowych, w tym właściwości neuroprotekcyjnych. Jednakże, potrzebne są dalsze badania, aby w pełni wyjaśnić mechanizm, dzięki któremu antocyjany przechodzą przez barierę mózgową i czy stężenie antocyjanów wykryte w PMR, maksymalnie kilkuset nmol/L, może korzystnie oddziaływać na procesy zachodzące w otoczeniu komórek nerwowych. Ma to szczególne istotne znaczenie gdy uwzględnimy, że choroby centralnego układu nerwowego są istotnym problem współczesnych społeczeństw, a wskazanie profilaktycznych zachowań, w tym żywieniowych, umożliwiających ograniczenie ich występowania lub złagodzenie ich przebiegu, może być jednym z możliwych i ważnych rozwiązań.

SUMMARY

Penetration of red cabbage and chokeberry anthocyanins and their metabolites through the blood-cerebrospinal fluid barrier in a model study with sheep

The aim of this PhD Thesis was to identify the ability of anthocyanins and their phase II metabolites to penetrate the blood-cerebrospinal fluid barrier (blood-CSF barrier) in a model study with sheep as well as to determine changes in the profile and concentration of these compounds in physiological fluids of sheep (blood plasma, urine, and cerebrospinal fluid (CSF)) after intraruminal administration of chokeberry and red cabbage and after intravenous administration of a mixture of cyanidin 3-galactoside (Cy3gal, the main anthocyanin compound of chokeberry) and cyanidin 3-diglucoside 5-glucoside (Cy3diG5G, the main anthocyanin compound of red cabbage) enabling to neglect the influence of absorption processes.

The first stage of the study involved the analysis of anthocyanins and their phase II metabolites in the physiological fluids of sheep (n = 16), performed after intraruminal administration of a chokeberry preparation at a dose of 10 mg of cyanidin/kg of body weight. In addition to four native anthocyanins, their 17 metabolites, including methylated, glucuronated and sulfated forms, were identified in the physiological fluids of sheep based on the micro-HPLC-MS/MS. Among the compounds identified in the blood plasma, urine, and CSF of sheep, Cy3gal was the major native compound, whereas methylated Cy3gal derivative turned out to predominate among phase II metabolites. The obtained results indicate that chokeberry anthocyanins have the ability to penetrate the blood-CSF barrier, and that the temporary concentration and profile of anthocyanins and their phase II metabolites in the CSF may be affected by changes in their concentrations in the blood plasma, processes of inflow and outflow through the blood-CSF barrier as well as the intensity and direction of metabolic processes in barrier cells.

In the second stage of the study, anthocyanins and their phase II metabolites were analyzed in physiological fluids of sheep (n = 16) after intraruminal administration of a red cabbage preparation at a dose of 10 mg of cyanidin/kg of body weight. Anthocyanins and their phase II metabolites were identified by means of the micro-HPLC-MS/MS. After the sheep were administered the red cabbage preparation, non-acylated and acylated anthocyanins and their phase II metabolites in the form of methylated, glucuronated and sulfated derivatives were identified in their blood plasma and urine (a total of 34 cyanidin derivatives were identified). Of the 17 native red cabbage anthocyanins found in the blood plasma of sheep, only one compound (Cy3G5G) was detected in their CSF. Neither Cy3diG5G nor acylated cyanidin

derivatives were detected in the collected CSF. In the case of phase II metabolites, among 17 cyanidin derivatives identified in blood plasma, as many as 11 were also found in CSF. The obtained results indicate that the blood-CSF barrier is selective to acylated and acylated anthocyanins.

The third stage of the study involved the analysis of anthocyanins and their phase II metabolites in physiological fluids of sheep ($n = 16$), performed after a single intravenous administration of a mixture of Cy3gal and Cy3diG5G at a dose of 1 mg of each compound/kg of body weight. The micro-HPLC MS/MS analysis demonstrated that the anthocyanins did penetrate the blood-CSF barrier after intravenous administration, and that the permeation potential of Cy3gal derivatives was higher than that of Cy3diG5G derivatives. The obtained results indicate that anthocyanins may compete for the same carrier responsible for their transport through the blood-CSF barrier, and that the differences in the penetration of these compounds are due to the type and number of substituents, as well as the molecule size.

In conclusion, the results obtained in this doctoral thesis provide novel, important knowledge indicating that chokeberry and red cabbage anthocyanins (except acylated derivatives) and their phase II metabolites cross the blood-CSF barrier. Thus, the obtained results indicate that anthocyanins accumulating in the CSF in their native and conjugated forms may beneficially affect the processes occurring in the environment of the central nervous system that is particularly susceptible to oxidative damage, due to their multiple properties, including a strong antioxidant potential. Tracking the biological fate of anthocyanins after their intake (from absorption into the blood to penetration into the CSF) may facilitate the design of further experimental procedures allowing to determine the biological properties of these color phenolic compounds, including their neuroprotective efficacy. However, further research is needed to fully elucidate the mechanism by which anthocyanins cross the brain barrier and to determine whether the concentration of anthocyanins detected in CSF, up to several hundred nmol/L, may beneficially influence the processes occurring around nerve cells. This is of particular importance considering that diseases of the central nervous system pose a severe problem in the contemporary population, and that the identification of preventive behaviors, including the nutritional ones, that can minimize their incidence or mitigate their course may be one of the possible and important solutions.

Wykaz skrótów

[M]⁺ – jon pseudomolekularny

[M-X]⁺ – jon fragmentacyjny

bariera krew-PMR – bariera krew–płyn mózgowo-rdzeniowy

COMT, EC 2.1.1.6 – *catechol O-methyltransferase* - katecholo-O-metylotransferaza

Cy3(fer)diG5G – 3-(feruloilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny

Cy3(*p*-cum)diG5G – 3-(*p*-kumaroilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny

Cy3(sin)(sin)diG5G – 3-(synapoilo)(synapoilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny

Cy3(sin)diG5G – 3-(synapoilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny

Cy3ara – 3-arabinozyd cyjanidyny

Cy3diG5G – 3-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny

Cy3G – 3-glukozyd cyjanidyny

Cy3G5G – 3-glukozyd-5-glukozyd cyjanidyny

Cy3gal – 3-galaktozyd cyjanidyny

Cy3xyl – 3-ksylozyd cyjanidyny

CydiG – diglukozyd cyjanidyny

Cydiglc – diglukuronid cyjanidyny

Cyglc – monoglukuronid cyjanidyny

Cysulf – siarczan cyjanidyny

G – g-force - względna siła odśrodkowa

HPLC-DAD – *high-performance liquid chromatography with diode-array detection* - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją z matrycą diodową

HPLC-MS/MS – *high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry* - wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas

HPLC-UV/Vis – *High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet-visible* - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją światła widzialnego i ultrafioletu

mCy – metylowana cyjanidyna

mCyara – metylowany arabinozyd cyjanidyny

mCydiG – diglukozyd metylowanej cyjanidyny

mCydiglc – diglukuronid metylowanej cyjanidyny

mCyG – glukozyd metylowanej cyjanidyny

mCygal – metylowany galaktozyd cyjanidyny

mCyGgclsulf – siarczano-glukuronido-glukozyd metylowanej cyjanidyny

mCyglc – metylowany glukuronid cyjanidyny

mCyglc – monoglukuronid metylowanej cyjanidyny

mCyglcsulf – metylowany siarczan glukuronidu cyjanidyny

mCysulf – metylowany siarczan cyjanidyny

mCytriG – triglukozyd metylowanej cyjanidyny

MRM – *Multiple-Reaction Monitoring* - Monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy

sm - sucha masa

SULT, EC 2.8.2 – *sulfotransferases* – sulfotransferaza

TFA – *trifluoroacetic acid* – kwas trifluorooctowy

UGT, EC 2.4.1.17 – *UDP-glucuronosyltransferase* - UDP-glukuronozylotransferaza

unm-Cy3ara – nieokreślony metabolit arabinozydu cyjanidyny

unm-Cy3gal – nieokreślony metabolit galaktozydu cyjanidyny

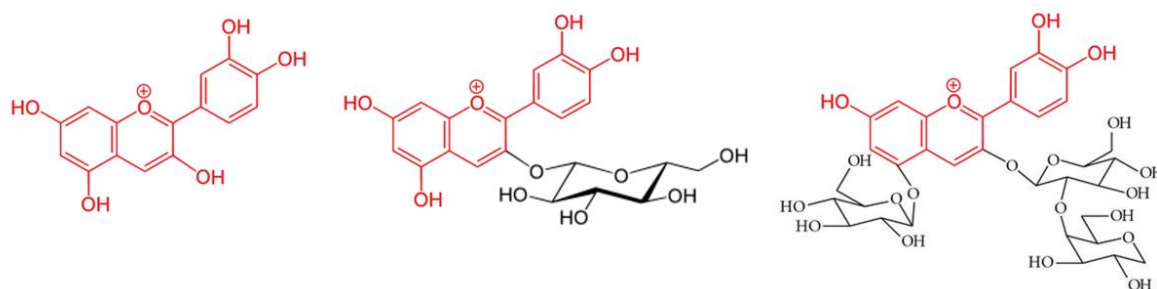
1. WSTĘP

Antocyjany są substancjami naturalnymi, rozpuszczalnymi w wodzie, należącymi do polifenolowych związków organicznych – flawonoidów. Związki te są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin, nadając ich poszczególnym częściom (liściom, łodygom, kwiatom, owocom i nasionom) atrakcyjne barwy, od pomarańczowej poprzez różne odcienie czerwieni i fioletu, aż po czerń (de Pascual-Teresa i Sanchez-Ballesta, 2008). Barwy, które antocyjany nadają roślinom, zależą przede wszystkim od formy chemicznej występującego związku oraz pH płynu komórkowego. Zależą również od połączeń antocyjanów z metalami, a także obecności innych substancji roślinnych, np. flawanoli, flawonoli, kwasów fenolowych, alkaloidów, amin oraz innych antocyjanów. (Lightbourn i in., 2008, Fenger i in., 2019). Ze względu na atrakcyjną gamę barw antocyjany są często wykorzystywane jako dodatki do żywności oraz w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym (Khoo i in., 2017).

Podstawową strukturą antocyjanów jest kation flawyliowy (2-fenylobenzopiryliowy). Poszczególne antocyjany różnią się między sobą zarówno liczbą, rodzajem, jak i miejscem występowania grup hydroksylowych oraz metoksyłowych, a także występowaniem glikozytacji, czy acylacji. Do tej pory zostało poznanych kilkaset barwników antocyjanowych, z czego w żywności pochodzenia roślinnego najczęściej znajdują się pochodne: cyjanidyny (50%), pelargonidyny (12%), peonidyny (12%), delfinidyny (12%), malwidyny (7%), oraz petunidyny (7%) (Giuliani i in., 2016). Antocyjany występują naturalnie w postaci pochodnych β -O-glikozydowych, tj. połączeń z cukrami prostymi (głównie glukozą, lub rzadziej, galaktozą, ramnozą, ksylozą czy arabinozą), przy czym cząsteczka cukru jest najczęściej przyłączona do aglikonu w pozycji C3, rzadziej C5. Dodatkowo reszty glikozydowe antocyjanów mogą być acylowane kwasami alifatycznymi (główne malonowym i octowym, rzadziej, bursztynowym, jabłkowym, oraz szczawiowym) lub kwasami fenolowymi (synapinowym, ferulowym, kawowym, *p*-kumarowym, oraz galusowym) (Khoo i in., 2017).

Spośród spożywanych w Polsce owoców i warzyw, bogatym i cennym źródłem antocyjanów jest aronia i kapusta czerwona. W owocach aronii oraz w główkach kapusty czerwonej podstawową strukturą antocyjanów jest cyjanidyna (kation 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawyliowy), występująca w różnych formach glikozydowych (Rys. 1). W aronii antocyjany występują w postaci monoglikozydów (galaktozydu, glukozydu, arabinozydu i ksylozydu cyjanidyny). Dominującym związkiem w aronii jest 3-galaktozyd cyjanidyny (Cy3gal, 70% całkowitej zawartości antocyjanów)

(Wiczowski i in., 2010). Z kolei w kapuście czerwonej antocyjany występują w postaci triglikozydów cyjanidyny, dodatkowo mono- lub diacylowanych kwasem sinapinowym, ferulowym, kawowym i/lub *p*-kumarowym. Dominującym związkiem jest forma nieacylowana - 3-diglukozyd-5-glikozyd cyjanidyny (Cy3diG5G, 15% całkowitej zawartości antocyjanów) (Wiczowski i in., 2014).



Rysunek 1. A. Kation flawyliowy. B. 3-galaktozyd cyjanidyny. C. 3-diglukozyd-5-glikozyd cyjanidyny.

W ostatnich latach wzrasta liczba doniesień naukowych poświęconych spożyciu produktów bogatych w antocyjany w kontekście ich potencjalnych właściwości prozdrowotnych. Dotychczasowe badania wskazują, że antocyjany obecne w spożywanej żywności, zwłaszcza w produktach pochodzenia roślinnego, są absorbowane i występują w płynach fizjologicznych ludzi oraz zwierząt w postaci natywnych związków oraz metylowanych, glukuronowych i siarczanowanych pochodnych (Vitaglione i in., 2007, McGhi i Walton, 2007; Fernandes i in., 2014a). Co więcej, Wiczowski i in. (2010, 2016) wykazali obecność antocyjanów aronii i kapusty czerwonej w osoczu krwi ochotników nawet 24 godz. po pojedynczym spożyciu obu tych roślin, przy czym głównymi związkami znalezionymi w osoczu krwi i moczu ochotników był Cy3gal i Cy3diG5G, odpowiednio po spożyciu aronii i kapusty czerwonej. Dostępna literatura naukowa nie dostarcza jednoznacznych informacji dotyczących miejsc oraz mechanizmów wchłaniania, a także potencjalnych szlaków metabolicznych antocyjanów. Sugeruje się, że proces wchłaniania tych związków może odbywać się na dwa sposoby: bierny oraz aktywny (Wiczowski i Piskula 2004; Passamonti i in., 2002). Antocyjany są zdolne do swobodnego przenikania drogą przestrzeni międzykomórkowych ze względu na występowanie w postaci kationu flawyliowego oraz hydrofilowy charakter (Passamonti, 2019). Ponadto, formy glikozydowe antocyjanów mogą być absorbowane przy użyciu specyficznego transportera

glukozy zależnego od jonów Na^+ (Oliveira i in., 2019). Inny sugerowany mechanizm absorpcji antocyjanów opiera się na organicznym transporterze anionów (tj. bilitranslokazie, TC 2.A.65.1.1) obecnym w komórkach błon śluzowych żołądka i jelita cienkiego (Passamonti i in., 2002).

Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania naturalnymi fitozwiązkami jako środkami profilaktycznymi o potencjalnie korzystnym działaniu na organizm człowieka, w tym działaniu przeciwneurodegeneracyjnym. Pomimo obszernych badań prowadzonych od początku ubiegłego wieku, etiologia zaburzeń neurodegeneracyjnych nie została w pełni wyjaśniona, a w ich rozwój zaangażowanych jest wiele czynników. Wiadomo, że stres oksydacyjny oraz nitrozacyjny, ekscytotoksyczność, stres retikulum endoplazmatycznego, agregacja białek i/lub zapalenie układu nerwowego powodują śmierć wrażliwej populacji neuronów w określonych obszarach mózgu lub rdzenia kręgowego, powodując w ten sposób upośledzenie funkcji poznawczych i/lub motorycznych. Liczne badania pokazują, że antocyjany, oprócz właściwości barwiących, posiadają szereg właściwości biologicznych, takich jak właściwości przeciwutleniające, które powodują inne potencjalne korzystne działanie, w tym przeciwzapalne i przeciwneurodegeneracyjne (Lee i in., 2017; Martín i in., 2017; Ullah i in., 2019; Winter i Bickford, 2019). W tym kontekście regularne spożywanie antocyjanów, powszechnie występujących w roślinach i pokarmach roślinnych oraz wykorzystywanych jako naturalne barwniki żywności, może wywierać działanie prewencyjne przeciwko chorobom neurodegeneracyjnym wywołanym stresem oksydacyjnym pod warunkiem, że substancje te dotrą do środowiska neuronów. Jak do tej pory, pomimo szerokiego spektrum korzystnych właściwości antocyjanów obserwowanych w warunkach *in vitro*, wciąż niewiele wiadomo na temat przenikania tych związków do mózgu i ich rzeczywistych korzyści farmakologicznych w tkance mózgowej. Nie mniej jednak, sugeruje się, że mechanizm działania antocyjanów związany z właściwościami przeciwneurodegeneracyjnymi, poza ich bezpośrednim udziałem w reakcjach redoks, może również obejmować indukcję enzymów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych oraz stymulację syntezy egzogennych antyoksydantów (Young, 1999; Shimoi, 2000; 2001). Aby jednak antocyjany charakteryzujące się wyżej wymienionymi właściwościami mogły chronić neurony przed uszkodzeniami spowodowanymi m.in. niekontrolowanymi procesami utleniania, związki te muszą najpierw przekroczyć barierę krew-mózg oraz barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy.

Bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (bariera krew-PMR, Hladky i in., 2016; Banks i in., 2009), obok bariery krew-mózg, jest drugą ważną barierą występującą w mózgu,

stanowiącą kompilację cech anatomicznych i fizjologicznych, utworzoną w celu ochrony układu nerwowego (Veening i Barendregt, 2010). Zadaniem tych barier jest zapewnienie stabilności środowiska w ośrodkowym układzie nerwowym oraz ochrona przed substancjami szkodliwymi i gwałtownymi zmianami stężenia różnych substancji obecnych we krwi (Veening i Barendregt, 2010; Spector i in., 2015). Dostępne dane wskazują, że nienaładowane, lipofilowe substancje o małych rozmiarach (≤ 600 Da) mogą bez większych przeszkód przenikać przez bariery mózgowe dzięki dyfuzji (Pardridge, 2012). Jednocześnie należy zauważyć, że szybkość przenikania substancji do tkanki mózgowej jest wprost proporcjonalna do ich rozpuszczalności w lipidach i odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząstek (Pan i Kastin, 2004). Dotychczasowe badania nad związkami z grupy flawonoidów wskazują, że charakteryzująca się właściwościami lipofilnymi kwercetyna, przechodzi do PMR prawdopodobnie w wyniku prostej dyfuzji (Wiczowski i in., 2015). Co więcej, badania Youdim i in., (2004) wykazały, że transporter, glikoproteina P, może odgrywać ważną rolę w transporcie flawonoidów do mózgu. Dodatkowo w przypadku izoflawonów, wykazano, że związki te mogą wiązać się z transtyretyną, białkiem transportującym hormon tarczycy do PMR (Radović i in., 2006). Natomiast, prawdopodobnie z powodu wysokiej polarności ograniczone jest przenikanie katechiny przez barierę krew-PMR (Zini i in., 2006). Biorąc pod uwagę powyższe, pomimo, że badania dotyczące związków z grupy flawonoidów, w szczególności antocyjanów, są coraz bardziej poszerzane i rozwijane to jednak wiedza na ich temat w omawianym zakresie jest nadal niewielka. Nie przeprowadzono badań określających czy antocyjany i ich metabolity II fazy przenikają przez barierę krew-PMR, a także nie opisano przemian tych bioaktywnych związków w środowisku tej bariery. Nie jest jasne w jaki sposób struktura chemiczna natywnych antocyjanów wpływa na ich zdolność do przekraczania bariery. Czy liczba i/lub rodzaj ugrupowania cukrowego związanego z tym samym aglikonem (np. cyjanidyną), jak również podstawniki przyłączone w trakcie metabolizmu wpływają na przenikanie antocyjanów przez barierę? Czy antocyjany o najwyższym potencjale biologicznym (np. pochodne cyjanidyny (Galvano i in., 2004)) charakteryzują się również największą biodostępnością do środowiska układu nerwowego? Ponadto, brak jest danych wskazujących, czy bariera krew-PMR jest selektywna dla antocyjanów nieacylowanych i acylowanych kwasami fenolowymi (np. synapinowym, ferulowym, kawowym czy *p*-kumarowym).

2. CEL I ZAKRES BADAŃ

Celem podjętych badań było określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-PMR po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z aronii (cel 1) i kapusty czerwonej (cel 2), określenie zdolności przenikania pochodnych cyjanidyny i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR po dożylnym podaniu owcom preparatu zawierającego mieszaninę Cy3gal i Cy3diG5G (cel 3) oraz ustalenie, czy struktura chemiczna antocyjanów może wpływać na przenikanie tych związków przez badaną barierę (cel 4).

Weryfikacji poddano następujące hipotezy:

1. Po dożwaczowym podaniu preparatów z aronii i kapusty czerwonej profil natywnych antocyjanów oraz ich metabolitów II fazy w osoczu krwi i moczu owiec jest zbliżony do profilu tych związków u ludzi.
2. Antocyjany aronii i kapusty czerwonej oraz ich metabolity II fazy mają zdolność przenikania przez barierę krew-PMR.
3. Struktura chemiczna i właściwości fizykochemiczne antocyjanów oraz ich metabolitów II fazy wpływają na przenikanie tych substancji do PMR.

Realizacji wyżej wymienionych celów podporządkowano cztery zadania badawcze:

1. Przygotowanie preparatów aronii i kapusty czerwonej oraz mieszaniny zawierającej Cy3gal i Cy3diG5G. Analiza profilu i zawartości badanych związków w uzyskanych preparatach.
2. Badanie przenikania antocyjanów i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z aronii. Określenie profilu i zawartości antocyjanów i ich metabolitów II fazy w zebranych próbkach osocza krwi, moczu i PMR owiec.
3. Badanie przenikania antocyjanów i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z kapusty czerwonej. Określenie profilu i zawartości antocyjanów i ich metabolitów II fazy w zebranych próbkach osocza krwi, moczu i PMR owiec.
4. Badanie przenikania pochodnych cyjanidyny i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR po dożylnym podaniu owcom preparatu zawierającego mieszaninę Cy3gal i Cy3diG5G. Określenie profilu i zawartości antocyjanów i ich metabolitów II fazy w zebranych próbkach osocza krwi, moczu i PMR.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał badawczy

1. Sproszkowany liofilizat owoców aronii (*Aronia melanocarpa*) zakupiony w firmie PPHU FROSTER, Kielce, Polska (publikacja: **PI**).
2. Kapusta czerwona zakupiona na lokalnym rynku (Olsztyn, Polska) (publikacje: **PII, PIII**)
3. Preparat antocyjanowy zawierający mieszaninę standardu Cy3gal pozyskanego z firmy Extrasynthese (Genay, France) oraz Cy3diG5G wyizolowanego z kapusty czerwonej według metody Wiczковского i in. (2013) (publikacja: **PIII**).
4. Osocze krwi, mocz i PMR owiec zebrane po dożwaczowym podaniu preparatu z aronii (publikacja: **PI**).
5. Osocze krwi, mocz i PMR owiec zebrane po dożwaczowym podaniu preparatu z kapusty czerwonej (publikacja: **PII**).
6. Osocze krwi, mocz i PMR owiec zebrane po dożylnym podaniu preparatu zawierającego mieszaninę Cy3gal i Cy3diG5G (publikacja: **PIII**).

3.2. Eksperymenty i metody

3.2.1. Przygotowanie liofilizatu kapusty czerwonej

Zakupioną na lokalnym rynku (Olsztyn, Polska) kapustę czerwoną (8 kg) bez śladów uszkodzeń mechanicznych, oczyszczono, pokrojono na mniejsze kawałki i zamrożono w temperaturze ciekłego azotu. Następnie, po przeprowadzonym procesie liofilizacji, otrzymane próbki zmielono i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych badań i analiz (publikacje: **PII, PIII**).

3.2.2. Ekstrakcja antocyjanów z materiału roślinnego

Ekstrakcję antocyjanów z liofilizatów aronii oraz kapusty czerwonej przeprowadzono za pomocą 58% wodnego roztworu metanolu z 4% dodatkiem kwasu mrówkowego (v/v) przy użyciu dezintegratora ultradźwiękowego (VC 750, Sonics & Materials, USA). Po przeprowadzeniu wielokrotnej ekstrakcji, roztwory odwirowano (10 min, 13200×g, 4°C, 5415R, Eppendorf, Niemcy), a supernatanty zbierano do 5 mL kolby miarowej. Następnie, po przefiltrowaniu i rozcieńczeniu, ekstrakty analizowano metodą mikro-HPLC-MS/MS w celu określenia profilu i zawartości antocyjanów w materiale roślinnym (publikacje: **PI, PII**).

3.2.3. Izolacja 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny

Ponieważ wzorzec Cy3diG5G, główny związek antocyjanowy kapusty czerwonej, planowany do dożylnego podania owcom był niedostępny w handlu, dlatego niezbędne było pozyskanie tego związku z materiału roślinnego (wg. metody Wiczковского i in., 2013). W tym celu otrzymany liofilizat kapusty czerwonej (punkt 3.2.1) poddano wielokrotnej ekstrakcji 80% wodnym roztworem metanolu z 6% dodatkiem kwasu mrówkowego przy użyciu homogenizatora (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Niemcy). Następnie, po odwirowaniu (4000×g, 10 min, 4°C, MPW-351R, MPW-Med. Instruments, Polska) zebrane supernatanty (ok. 120 mL) zagęszczono w wyparce próżniowej (37°C, R-200, Büchi, Szwajcaria) do około 50 mL, zamrożono (-80°C) oraz liofilizowano. W kolejnym etapie antocyjany rozdzielono i wstępnie oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu jonowymiennym Amberlite XAD-16 (Rohm & Hass, Francja). W tym działaniu, rozpuszczony w wodzie z dodatkiem siarczanu sodu liofilizat kapusty (5 mL) naniesiono na złożę uprzednio kondycjonowane metanolem, 0,02 M kwasem solnym i wodą z dodatkiem siarczanu sodu. Po przemyciu złoża 5% metanolem z dodatkiem siarczanu sodu oraz octanem etylu, antocyjany wymywano 5% roztworem kwasu mrówkowego w metanolu. Następnie, kolumnę zregenerowano i przygotowano do kolejnego oczyszczania wg. powyższej procedury. W celu sprawdzenia profilu antocyjanów, otrzymane frakcje poddano analizie jakościowej przy użyciu HPLC-DAD (Shimadzu, Japonia). Analizę jakościową antocyjanów przeprowadzono przez porównanie ich widm UV/Vis i czasów retencji z wcześniej opublikowanymi danymi (Wiczkowski i in., 2013). Frakcje zawierające Cy3diG5G połączono i poddano dalszej izolacji i oczyszczaniu na kolumnie półpreparatywnej (Xbridge™ C18, 250 x 1 mm, 5µm, Waters, USA) w układzie HPLC-UV/Vis przy długości fali ustawionej na 520 nm (Shimadzu, Kioto, Japonia). W wyniku przeprowadzonych procedur zebrano około 1 g Cy3diG5G o 95% czystości HPLC (publikacja: **PIII**).

3.2.4. Przygotowanie preparatów antocyjanowych

Preparaty antocyjanowe przygotowano z liofilizatu aronii (publikacja: **PI**), kapusty czerwonej (publikacja: **PII**) oraz standardu Cy3gal i Cy3diG5G (publikacja: **PIII**), które zakupiono bądź otrzymano w ramach procesów opisanych w podrozdziale 3.2.1. *Przygotowanie liofilizatu kapusty czerwonej* oraz 3.2.2. *Izolacja 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny*. W celu określenia zdolności antocyjanów do przenikania przez barierę krew-PMR po ich dożwaczowym podaniu sporządzono po 1 L zawiesiny w 5% wodnym roztworze etanolu zawierającej sproszkowany liofilizat aronii

oraz kapusty czerwonej w dawce 10 mg cyjanidyny/kg masy ciała owcy. Dodatek 5% etanolu zastosowano w celu poprawy dyspersji liofilizatu aronii oraz kapusty czerwonej w wodzie oraz zwiększenia biodostępności tych fitozwiązków (Faria i in., 2009). W przypadku mieszaniny standardów Cy3gal i Cy3diG5G przeznaczonych do podania dożylnego, przygotowano 50 mL preparatu, w którym oba antocyjany rozpuszczono w soli fizjologicznej w dawce po 1 mg każdego/kg masy ciała owcy.

3.2.5. Doświadczenie z udziałem zwierząt laboratoryjnych

Wszystkie przeprowadzone procedury i eksperymenty były zgodne z obowiązującymi wytycznymi w zakresie badań na zwierzętach oraz zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (uchwała nr 31/2015).

Badania przeprowadzono na szesnastu dorosłych maciorkach rasy Polska owca nizinna (9-miesięczne, o masie ciała 36,5–55,5 kg). Miesiąc przed eksperymentem, wszystkie zwierzęta zostały poddane zabiegowi chirurgicznemu w celu wprowadzania kaniuli do trzeciej komory mózgu. Na 24 godziny przed operacją zwierzęta miały ograniczony dostęp do paszy oraz stały dostęp do wody. Przed rozpoczęciem operacji, zwierzęta zostały znieczone i wprowadzone w stan głębokiej narkozy (pentobarbital sodu: 8-12 mg/kg masy ciała; ketamina: 6-10 mg/kg masy ciała). Następnie głowę owcy umieszczono w aparacie stereotaktycznym w celu implantowania stalowej kaniuli do III komory mózgu (Wiczowski i in., 2015). Po zakończeniu zabiegu, zwierzętom podane zostały antybiotyki w celu ochrony przed endogennymi zakażeniami. Po miesięcznym okresie rekonwalescencji, przeprowadzone zostały trzy 10-godzinne eksperymenty, rozdzielone okresami przeznaczonymi na wypłukanie metabolitów antocyjanów. Każdy z eksperymentów rozpoczynał się trzydniową dietą składającą się z siana i swobodnego dostępu do wody. Na 24 godziny przed eksperymentem owce zostały przeniesione do specjalnych, pojedynczych klatek, w których mogły się położyć i miały swobodny dostęp do siana i wody. Aby uniknąć stresu związanego z izolacją społeczną, wszystkie owce były trzymane w tym samym pomieszczeniu i miały kontakt wzrokowy podczas eksperymentu. W dniu eksperymentu, do wcześniej wszczepionej kaniuli implantowanej w III komorze mózgu wprowadzono cewnik ze stali nierdzewnej i połączono z systemem kaniula-probówka Eppendorf sprzężonym z pompą infuzyjną/pobierającą PHD 2000 (Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus, Niemcy). Ponadto, owcom założona została kaniula do żyły szyjnej zewnętrznej oraz cewnik do pęcherza moczowego. Następnie, pobrano próbki kontrolne krwi (ok. 3 mL), moczu (ok. 10 mL) oraz PMR (ok. 0,5 mL). W pierwszym i drugim eksperymencie, owcom podano do żwacza,

odpowiednio sproszkowany liofilizat aronii (publikacja: **PI**) oraz kapusty czerwonej (publikacja: **PII**) (dawka: 10 mg cyjanidyny/kg masy ciała owcy) w 5% wodnym roztworze etanolu. W trzecim eksperymencie do żyły szyjnej wstrzyknięto 50 mL preparatu antocyjanowego zawierającego mieszaninę Cy3gal/Cy3diG5G rozpuszczoną w soli fizjologicznej w dawce 1 mg cyjanidyny/kg masy ciała każdego ze związków. W ciągu 10 godz. od momentu podania preparatu, co 30 minut z żyły szyjnej do heparynizowanych próbek (BD Vacutainer® LH 68 I.U., BD Polska, Polska) pobierano próbki krwi (około 3 mL), również co 30 minut z trzeciej komory mózgu pobierano próbki PMR (około 0,5 mL), natomiast co 60 minut za pomocą cewnika moczowego pobierano próbki moczu (około 10 mL). Po pobraniu, próbki krwi odwirowano ($1000 \times g$, 15 min, 4°C, MPW-351R, MPW-Med. Instrument, Polska), a otrzymane osocze krwi, mocz, oraz PMR zakwaszono za pomocą 0,44 molowego TFA, zamrożono i przechowywano w -80°C do czasu analizy.

3.2.6. Ekstrakcja antocyjanów i ich metabolitów II fazy z płynów fizjologicznych

Ekstrakcję antocyjanów z próbek płynów fizjologicznych owcy przeprowadzono w oparciu o metodę ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Przed ekstrakcją, do materiału biologicznego dodawano standard wewnętrzny - 3-glukozyd delfinidyny, w celu kontroli skuteczności metody. Następnie, próbki płynów fizjologicznych naniesiono na złożę kolumnienek StrataTM-X (200 mg/3 mL, Phenomenex, USA) kondycjonowane metanolem i wodą z 0,4% dodatkiem kwasu trifluorooctowego (TFA). Po naniesieniu próbki, kolumnienki przemyto 0,4% wodnym roztworem TFA. Antocyjany i ich metabolity II fazy wymyto metanolem zawierającym 0,4% TFA, a otrzymany eluent odparowano do sucha w atmosferze azotu w temperaturze 35°C. Przed analizą metodą mikro-HPLC-MS/MS, powstały osad rozpuszczono w 100 µL metanolu zawierającego 0,95% kwasu mrówkowego, wirowano (30 s) i poddawano działaniu ultradźwięków (30 s), a następnie oczyszczano przy użyciu filtrów membranowych Micro-Spin PES (Ciro Manufacturing Corporation, USA) i odwirowano (20 min, $13\,200 \times g$, 4°C) (publikacje: **PI**, **PII**, **PIII**).

3.2.7. Analiza antocyjanów i ich metabolitów II fazy

Próbki materiału roślinnego oraz płynów fizjologicznych owiec analizowano za pomocą systemu LC-200 Eksigent HPLC sprzężonego ze spektrometrem masowym QTRAP 5500 (AB Sciex, Kanada) składającym się z potrójnego kwadrupola, pułapki jonowej i źródła jonizacji typu elektrorozpylanie (ESI). Rozdział związków przeprowadzono metodą elucji

w gradiencie dwufazowym na kolumnie C18 (HALO, 0.5 mm x 100 mm x 2.7 μ m, Eksigent, Kanada) (publikacje: **PI**, **PII**, **PIII**). Identyfikację i oznaczenie ilościowe antocyjanów i ich metabolitów II fazy oparto na porównaniu czasu ich retencji oraz widm MS/MS (jonów pseudomolekularnych: $[M]^+$ oraz jonów fragmentacyjnych: $[M-X]^+$) (metoda Multiple Reaction Monitoring, MRM) z danymi uzyskanymi po analizie autentycznych standardów, i/lub poprzez interpretację otrzymanych widm fragmentacyjnych (Wiczowski i in., 2016). Oznaczenie ilościowe przeprowadzono na podstawie krzywych kalibracyjnych wzorców zewnętrznych.

3.2.8. Analiza statystyczna

Opracowanie statystyczne wyników przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA (wersja 13.0; StatSoft Corp., USA). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test *post hoc* Tukeya (publikacje: **PI**, **PII**, **PIII**).

4. WYNIKI I DYSKUSJA

Aby móc zweryfikować czy korzystne działanie przeciwneurodegeneracyjne antocyjanów obserwowane w warunkach *in vitro* (Ullah i in., 2019) zachodzi również w warunkach *in vivo*, konieczne jest zbadanie, czy związki te oraz ich metabolity II fazy przenikają przez bariery ośrodkowego układu nerwowego. Ponieważ przeprowadzenie takich badań z udziałem ochotników jest bardzo ograniczone, uzasadnionym jest wykorzystanie odpowiedniego modelu zwierzęcego. Natomiast, po opracowaniu/znalezieniu takiego modelu należało ustalić, czy po podaniu preparatów bogatych w antocyjany związki te są wchłaniane przez zastosowany organizm modelowy, w jaki sposób są w nim metabolizowane oraz w jakich formach występują w jego płynach fizjologicznych (głównie we krwi). Dlatego, w celu określenia przenikania antocyjanów i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR z wykorzystaniem modelu *in vivo* dojrziałych samic owiec (publikacje: **PI**, **PII**, **PIII**) w pierwszej kolejności przeprowadzono analizy jakościowe i ilościowe antocyjanów w podanych preparatach. Po drugie, przeprowadzono identyfikację antocyjanów i ich metabolitów II fazy w pobranych płynach fizjologicznych (osocze krwi, mocz i PMR) owiec po podaniu preparatów bogatych w antocyjany. Po trzecie, określono profil i stężenie antocyjanów i ich metabolitów II fazy w osoczu krwi, moczu i PMR po dożwaczowym i dożylnym podaniu preparatów.

Ponieważ w poszczególnych płynach fizjologicznych całkowite stężenie antocyjanów jest istotnie różne (tj. całkowite stężenie antocyjanów w moczu jest ~10 razy wyższe niż w osoczu krwi, a w PMR ~10 razy mniejsze niż w osoczu), dlatego porównanie profilu i stężenia antocyjanów oraz ich metabolitów II fazy przeprowadzono w oparciu o procentowy udział poszczególnych związków lub grup związków w stosunku do całkowitej zawartości antocyjanów.

4.1. Określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z aronii [publikacja: **PI**; Płatosz i in., 2021]

4.1.1. Charakterystyka profilu i zawartości antocyjanów aronii

Analiza użytego w doświadczeniu preparatu liofilizowanej aronii metodą mikro-HPLC-MS/MS wykazała obecność czterech pochodnych cyjanidyny tj. Cy3gal, 3-glukozydu cyjanidyny (Cy3G), 3-arabinozydu cyjanidyny (Cy3ara) oraz 3-ksylozydu cyjanidyny (Cy3xyl) (**Tabela 1**, publikacja: **PI**). Głównym glikozydem znajdującym się w preparacie antocyjanowym był Cy3gal ($1,48 \pm 0,15$ mg/g suchej masy (sm)), który stanowił 68,52% wszystkich antocyjanów występujących w preparacie. Całkowita zawartość

pochodnych cyjanidyny w analizowanym preparacie wynosiła $2,16 \pm 0,23$ mg cyjanidyny/g sm. Podobny profil i zawartość antocyjanów w aronii przedstawiono również we wcześniejszych badaniach (Taheri i in., 2013).

Z uzyskanych wyników wynika, że aronia, poza tym że jest bogatym źródłem antocyjanów, jest jednocześnie unikalną, naturalną matrycą umożliwiającą zbadanie zależności między występowaniem różnych podstawników glikozydowych w cząsteczce cyjanidyny, a procesami zachodzącymi w organizmie po ich przyjęciu. Dlatego w badaniach, oprócz analizy przenikania antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR, oceniono również wpływ podstawnika glikozydowego (glukozy, galaktozy, ksylozy, oraz arabinozy) w cząsteczce cyjanidyny na przenikanie przez tę barierę.

4.1.2. Badanie profilu i zawartości antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec

W analizowanych metodą mikro-HPLC-MS/MS płynach fizjologicznych owiec (osocze krwi, mocz i PMR) po dożwaczowym podaniu preparatu z aronii, oprócz czterech natywnych antocyjanów, zidentyfikowano 17 metabolitów tych związków, w tym formy metylowane, glukuronowane i siarczanowane (metylowana cyjanidyna (mCy), glukuronid cyjanidyny (Cyglc), dwa metylowane glukuronidy cyjanidyny (mCyglc), siarczan cyjanidyny (Cysulf), metylowany siarczan cyjanidyny (mCysulf), trzy metylowane siarczany glukuronidu cyjanidyny (mCyglcsulf), dwa metylowane galaktozydy cyjanidyny (mCygal), dwa metylowane arabinozydy cyjanidyny (mCyara), dwa nieokreślone metabolity galaktozydu cyjanidyny (unm-Cy3gal) i dwa nieokreślone metabolity arabinozydu cyjanidyny (unm-Cy3ara)) (**Tabela 1**, publikacja: **PI**). Spośród metabolitów II fazy zidentyfikowanych w badaniu, Cysulf, mCysulf oraz trzy różne formy mCyglcsulf zostały znalezione po raz pierwszy w płynach fizjologicznych po podaniu preparatu z aronii. Biorąc pod uwagę wyniki tego i poprzednich badań (Kay i in., 2005; Wu i in., 2005; Wiczowski i in., 2010; Xie i in., 2016), można stwierdzić, że występują istotne różnice w ilości i rodzaju metabolitów cyjanidyny znalezionych w badanych płynach fizjologicznych po spożyciu antocyjanów aronii. Poszukując przyczyn tego zjawiska należy wziąć pod uwagę dwa czynniki: zastosowany w doświadczeniu model zwierzęcy (owce, świnie, człowiek) oraz zastosowaną dawkę (od 0,8 do 100 mg antocyjanów/kg mc). Wcześniejsze badania wykazały, że różnice we wchłanianiu, metabolizmie, dystrybucji i wydalaniu fitozwiązków między poszczególnymi grupami zwierząt (Sakakibara i in., 2009; Chen i in., 2015) mogą wpływać na różne profile związków natywnych i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych. Również

różnorodne dawki antocyjanów mogą aktywować odmienne ścieżki wchłaniania i metabolizmu (Charron i in., 2007; Kirakosyan i in., 2015). Ponadto, innym wyjaśnieniem tego zjawiska może być wpływ zastosowanych odmiennych matryc, w których badane związki były rozproszone (Wiczowski i in., 2016). Na tej podstawie można wskazać, że gdy podobna doustna dawka antocyjanów jest stosowana, główny wpływ na procesy absorpcji, a tym samym na poziom biodostępności antocyjanów, ma matryca żywności i wysycenie mechanizmu wchłaniania antocyjanów tych związków.

Niniejsze badanie wskazuje, że po dożwaczowym podaniu preparatu z aronii, w PMR owiec obecnych było 14 pochodnych cyjanidyny, w tym 4 formy natywne (Cy3G, Cy3gal, Cy3ara oraz Cy3xyl) oraz 10 metabolitów II fazy (mCygal, mCyglc, mCy, Cysulf, mCyara, Cyglc, unm-Cy3gal, mCyglc, mCygal, unm-Cy3gal). Dla porównania Milbury i Kalt (2010) wskazali w swoich badaniach na obecność wyłącznie natywnych antocyjanów w tkankach mózgu świni po długotrwałym stosowaniu preparatu z jagód. Natomiast, Fornasaro i in. (2016) wykazali obecność w tkance mózgowej szczurów jedynie dwóch metabolitów po dożylnym podaniu Cy3G. Z drugiej strony, w badaniach Del Bò i in. (2010) i Chen i in. (2017) antocyjany nie zostały zidentyfikowane w tkance mózgowej szczurów i myszy po podaniu antocyjanów winogron, jagód i borówek.

Mechanizm leżący u podstaw przenikania antocyjanów przez bariery mózgowe nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Niemniej jednak, w oparciu o wiedzę na temat przenikania fitozwiązków przez inne bariery biologiczne znajdujące się w organizmie człowieka i zwierząt (np. barierę jelitową), a także niniejsze badania i wcześniejsze doniesienia dotyczące przepuszczalności bariery mózgowej, można zaproponować pewne wytłumaczenie wypełniające istniejącą lukę w stanie wiedzy.

Komórki nabłonkowe spłotu naczyńkowego będące składnikami bariery krew-PMR są połączone ze sobą charakterystycznymi ścisłymi połączeniami międzykomórkowymi, uniemożliwiającymi swobodne przenikanie różnych cząsteczek do PMR przez przestrzeń międzykomórkową. Ze względu na tę strukturalną właściwość, różne substancje (w tym fitozwiązki) muszą przejść przez system błon cytoplazmatycznych tych komórek, aby dotrzeć do PMR i środowiska otaczającego komórki nerwowe. Ponieważ pinocytoza jest praktycznie nieobecna w komórkach tworzących tę barierę, transport substancji przez błonę zależy od właściwości fizykochemicznych tych substancji. Przypuszcza się, że polarność związku jest głównym czynnikiem ograniczającym przenikanie przez barierę mózgową (Zini i in., 2006). Substancje lipofilowe przenikają przez błonę cytoplazmatyczną na drodze dyfuzji, natomiast substancje hydrofilowe na ogół wymagają obecności specjalnych

nośników. Antocyjany są substancjami hydrofilowymi i dlatego do przejścia przez barierę krew-PMR wymagają specjalnych nośników. Ponieważ antocyjany występują naturalnie w postaci kationu flawyliowego, mogą przechodzić przez błony lipidowe w postaci niezmienionej przy udziale bilitranslokazy - nośnika, który występuje w ścianach komórkowych błon żołądka i jelita cienkiego (Passamonti i in., 2002). Transporter ten występuje również w komórkach bariery krew-PMR (Skipor i Thiery, 2005), co wskazuje na możliwość przenikania antocyjanów przez tę barierę (Maestro i in., 2010). Ponadto Youdim i in. (2004) wykazali, że glikoproteina P może odgrywać ważną rolę w transporcie flawonoidów do mózgu. Przy czym, selektywność mechanizmu tego transportu zależna jest od wiązań wodorowych, a zdolność antocyjanów do wiązania się z transporterem jest odwrotnie proporcjonalna do liczby grup hydroksylowych obecnych w cząsteczkach. Ponadto obecność ugrupowań lipofilowych, takich jak grupa metylowa, w pierścieniu B antocyjanów, zwiększa transport antocyjanów przez błony biologiczne (Yi i in., 2006). Nie można jednak wykluczyć innych niezidentyfikowanych mechanizmów przekraczania tej bariery przez antocyjany.

4.1.2.1. Profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w osoczu krwi

Zmiany profilu i stężenia antocyjanów oraz ich metabolitów II fazy wykrywanych w osoczu krwi owiec przedstawiono w **Tabeli 2** i na **Wykresie 1A** (publikacja: **PI**). Po dożwaczowym podaniu aronii, antocyjany były wchłaniane i występowały w osoczu krwi w postaci natywnej oraz w formie ich metabolitów II fazy (pochodne metylowane, glukuronowane i siarczanowane). Pochodne cyjanidyny zidentyfikowano w osoczu krwi już w ciągu pierwszych 30 min ($1,41 \pm 0,60 \mu\text{mol/L}$) od momentu podania preparatu z aronii. Wskazuje to, że u owiec, podobnie jak u ludzi (Wiczowski i in., 2016) i świń (Wu i in., 2005), wchłanianie antocyjanów zaczyna się już w górnych odcinkach przewodu pokarmowego. Również wcześniejsze badania sugerują, że żołądek może być pierwszym ważnym organem odpowiedzialnym za wchłanianie antocyjanów (Talavèra i in., 2003; Fernandes i in., 2014b).

W niniejszym badaniu w osoczu krwi owiec zaobserwowano dwa okresy maksymalnego całkowitego stężenia antocyjanów (1–2 godz. i 6–7 godz.), przy czym najwyższe stężenie antocyjanów w tym płynie fizjologicznych ($3,25 \pm 1,54 \mu\text{mol/L}$) wystąpiło po 6,5 godzinach od momentu podania preparatu. Natomiast eksperymenty z udziałem ludzi (Wiczowski i in., 2010) i świń (Wu i in., 2005) wykazały tylko jeden okres maksymalnej zawartości antocyjanów w osoczu krwi po spożyciu tych związków fenolowych, a ich najwyższe wartości był zwykle obserwowany 1–2 godziny po spożyciu preparatu bogatego w antocyjany. Obserwowana różnica w liczbie okresów z maksymalną zawartością

antocyjanów po ich spożyciu może wynikać z różnic w strukturze żołądkowo-jelitowej oraz procesów wchłaniania u ludzi i świń w porównaniu z owcami. Ludzie i świnie to ssaki monogastryczne, natomiast owce są przeżuwaczami charakteryzującym się odmienną budową przewodu pokarmowego, co może powodować różną intensywność i zakres wchłaniania antocyjanów. Niewykluczone jednak, że obserwowane różnice pomiędzy opisanymi gatunkami wynikają również z różnic w mechanizmie wchłaniania, w tym aktywności enzymów i transporterów, specyficznych właściwości błon śluzowych przewodu pokarmowego obu grup zwierząt, a także obecności specyficznej mikroflory (Chesworth i in., 1998). Biorąc pod uwagę te rozważania oraz kształt zmian zawartości antocyjanów w osoczu krwi owiec po podaniu aronii można przypuszczać, że drugi szczyt maksymalnej zawartości antocyjanów w osoczu krwi wynika z wchłaniania antocyjanów z jelita cienkiego tych zwierząt. Faktem przemawiającym za słusznością tego założenia może być średni czas przebywania treści pokarmowej w żołądku przeżuwaczy po spożyciu paszy określony na ~8 godz. (Haenlein i Caccese, 1984). Ponieważ w niniejszym badaniu, podawany preparat był w postaci półpłynnej, dlatego możliwe było nieco szybsze przejście antocyjanów do jelita cienkiego i uzyskanie drugiego maksymalnego stężenia po wchłonięciu do krwi już po około 6,5 godz. od podania antocyjanów. Ponadto w okresie wystąpienia drugiego maksimum całkowitej zawartości antocyjanów w osoczu krwi zaobserwowano istotnie wyższy procent metabolitów II fazy niż form natywnych, co wskazuje na inne pochodzenie tych antocyjanów niż z żołądka gdzie dominują formy natywne. Biorąc powyższe pod uwagę można przypuszczać, że w okresie wystąpienia drugiego maksimum antocyjany zostały wchłonięte z jelita cienkiego. Zjawisko to może być możliwe, ponieważ, jak sugerują Wiczkowski i Piskula (2004), poza wątrobą, narządami które odgrywają ważną rolę w biotransformacji fitozwiązków są błony śluzowe jelita cienkiego. W komórkach nabłonka jelita cienkiego może zachodzić koniugacja antocyjanów z kwasem glukuronowym za pośrednictwem transferazy UDP-glukuronowej (UGT, EC 2.4.1.17), natomiast katecholo-O-metylotransferaza (COMT, EC 2.1.1.6) może być odpowiedzialna za metylację grupy hydroksylowej pierścienia C antocyjanów. Ponadto antocyjany i ich metabolity po wchłonięciu i dotarciu do wątroby mogą podlegać dalszej biotransformacji, co prowadzi do powstania innych pochodnych glukuronowanych i metylowanych. Ponadto obecne w hepatocytach enzymy z grupy sulfotransferaz (SULT, EC 2.8.2) mogą kierować sprzęganiem antocyjanów z kwasem siarkowym, tworząc siarczanowe pochodne antocyjanów. Należy podkreślić, że enzymy uczestniczące w metabolizmie antocyjanów mogą jednocześnie modyfikować kilka grup hydroksylowych występujących w cząsteczce tych

związków. Następnie, metabolity wytwarzane w wątrobie mogą być wydalone z żółcią i powracać do jelita cienkiego i tam mogą być ponownie wchłonięte, tworząc w ten sposób krążenie jelitowo-wątrobowe metabolitów antocyjanów (Wiczowski i Piskula, 2004). W związku z tym, alternatywnym wyjaśnieniem drugiego maksimum zawartości antocyjanów w osoczu krwi owiec (tj. 6,5 godz.), nie wykluczającym wyjaśnienia wcześniejszych, może być zjawisko krążenia jelitowo-wątrobowego metabolitów antocyjanów. Należy również wskazać, że po drugim szczycie maksymalnej zawartości antocyjanów w osoczu krwi owiec, w wyniku intensywnego metabolizmu, stężenie tych związków zmniejszało się stopniowo, by ostatecznie, 10 godz. po podaniu aronii ukształtować się na poziomie tylko $0,28 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$.

W niniejszym badaniu szczegółowo zbadano również zmiany profilu antocyjanów w osoczu krwi po dożwaczowym podaniu aronii. Wyniki (**Wykres 1A, Tabela 2, publikacja: PI**) wskazują, że pochodne cyjanidyny znalezione w osoczu krwi podczas eksperymentu były głównie reprezentowane przez metabolity II fazy. Średni udział tych metabolitów wyniósł prawie 72%, natomiast związki natywne stanowiły nieco ponad 28%. Co więcej, uzyskane dane wskazują na istotne różnice w stosunku związków natywnych do metabolitów II fazy wykrytych w osoczu krwi w poszczególnych punktach obserwacyjnych. Generalnie można wyróżnić dwa główne okresy charakteryzujące się różnym udziałem form natywnych i metabolitów II fazy. W pierwszym okresie (0,5–2 godz.) dominującymi związki były formy natywne (ponad 64%), a wykrycie antocyjanów w osoczu krwi owcy już krótko po podaniu (tj. 0,5 godz.) wskazuje, że część tych związków była wchłaniana z żołądka. W tym przypadku bilitranslokaza mogła być jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za wchłanianie antocyjanów na poziomie żołądka (Passamonti i in., 2002). Natomiast, zaobserwowany tak wysoki procent związków natywnych w całkowitej zawartości antocyjanów w tym okresie (ponad 64%) mógł wynikać ze specyfiki procesów metabolicznych zachodzących na poziomie tego odcinka przewodu pokarmowego. Uzyskane dane sugerują, że metabolizm antocyjanów dominujący na poziomie żołądka owiec nie uwzględnia mechanizmów biotransformacji (tj. metylacji, glukuronidacji) tych związków polifenolowych, co skutkuje obecnością głównie natywnych form glikozydowych w osoczu krwi po wchłonięciu z żołądka. Również inne badania pokazują, że sprzężone z kwasem glukuronowym i grupą metylową pochodne antocyjanów nie występują w osoczu krwi szczurów w eksperymentach badających wchłanianie tych związków z żołądka (Talavèra i in., 2003). Natomiast, metabolity II fazy obecne w osoczu krwi owiec w pierwszym okresie eksperymentu mogą wynikać z metabolizmu zachodzącego w komórkach wątroby. Zupełnie inny profil antocyjanów odkryto w drugim przedziale czasowym, od 2,5 do 10 godzin po podania preparatu

z aronii. W porównaniu z pierwszym etapem, ponad 81% całkowitej zawartości antocyjanów stanowiły metabolity II fazy. W tym okresie, obserwowane zjawisko może wynikać ze zwiększonego udziału antocyjanów, które zostały wchłonięte z poziomu jelita cienkiego oraz mechanizmów związanych z istotną rolą błon śluzowych tego odcinka przewodu pokarmowego w biotransformacji antocyjanów poprzez procesy metylacji i glukuronidacji. Należy również zauważyć, że wraz z upływem czasu od podania aronii, w osoczu krwi owiec odsetek metabolitów II fazy w całkowitej zawartości antocyjanów sukcesywnie wzrastał, osiągając wartość maksymalną 7,5 godz. po podaniu preparatu z tych jagód (96,10%, **Wykres 1A**, publikacja: **PI**). Po osiągnięciu tej maksymalnej wartości rozpoczął się proces stopniowego zmniejszania się udziału metabolitów II fazy w całkowitej zawartości antocyjanów. Zaobserwowany wzrost udziału natywnych form antocyjanów w osoczu krwi w tym czasie mógł być spowodowany absorpcją tych substancji z puli zebranej w jelicie grubym. Puli natywnych form antocyjanów, które nie zostały wchłonięte w górnym odcinku przewodu pokarmowego i po dotarciu do jelita grubego nie uległy jeszcze degradacji w wyniku warunków panujących (np. pH i aktywność mikroflory) w tej części przewodu pokarmowego.

Należy podkreślić, że dwie formy monoglukuronidu metylowanej cyjanidyny (mCyglc) oraz monoglukuronid cyjanidyny (Cyglc) były dominującymi pochodnymi cyjanidyny spośród metabolitów antocyjanów zidentyfikowanych w osoczu krwi. Zawartość tych trzech głównych metabolitów II fazy stanowiła ponad 62% całkowitej zawartości antocyjanów, podczas gdy pozostałe 10 zidentyfikowanych metabolitów II fazy stanowiło <9% całkowitej zawartości antocyjanów wykrytych w osoczu krwi. W przypadku związków natywnych dominującym związkiem był Cy3gal, który stanowił ponad 24% całkowitej zawartości antocyjanów, a jego najwyższe stężenie zaobserwowano 1 godz. po podaniu preparatu ($1,64 \pm 0,52 \mu\text{mol/L}$).

4.1.2.2. Profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w moczu

Profil i stężenie antocyjanów i ich metabolitów II fazy wykrytych w moczu owiec po podaniu aronii przedstawiono w **Tabeli 3** i na **Wykresie 1B** (publikacja: **PI**). Podobnie jak w przypadku osocza krwi, w moczu wystąpiły dwa szczyty maksymalnej zawartości antocyjanów (tj. 1-2 godz. i 7-8 godz.). Pierwsze pojawienie się tych związków w moczu stwierdzono w przedziale 0-1 h, przy czym 74,24% całkowitego stężenia znalezionych antocyjanów stanowiły związki natywne. W tym okresie obserwacji Cy3gal był głównym natywnym związkiem, podczas gdy mCyglc oraz mCyglc dominowały wśród metabolitów II fazy. Podobny profil związków cyjanidyny stwierdzono w moczu w dwóch kolejnych przedziałach czasowych.

Ponadto, przez pierwsze 3 godziny od momentu podania preparatu dominowały te same trzy antocyjany (Cy3gal i dwie formy mCyglc), a udział związków natywnych był wyższy niż metabolitów II fazy. Jednak wraz z upływem czasu przewaga antocyjanów natywnych stopniowo malała, by po 3 godzinach od momentu podania preparatu wykryto przewagę metabolitów II fazy (od 64,04% po 3–4 godz. do 94,81% po 9–10 godz.). Co więcej, z czasem udział metabolitów II fazy w całkowitej zawartości antocyjanów stale wzrastał i osiągał najwyższą wartość w przedziale 7–8 godzina (97,16%) po podaniu preparatu. Podobnie jak w osoczu krwi, od 8 godz. nastąpił stopniowy wzrost udziału związków natywnych w całkowitej zawartości antocyjanów w moczu (z 2,84% w 7–8 godz. do 5,19% w 9–10 godz.).

Otrzymane wyniki wskazują, że kształt, zakres i profil antocyjanów wydalanych z moczem u owiec są odzwierciedleniem procesów metabolicznych tych związków zachodzących na poziomie wchłaniania do krwi i metabolizmu w wątrobie. W konsekwencji można przypuszczać, że intensywność wchłaniania na poziomie żołądka i jelita cienkiego oraz metabolizm w komórkach błony śluzowej tych dwóch odcinków przewodu pokarmowego oraz w komórkach wątroby są decydującymi obszarami biotransformacji tych polifenoli. Wydaje się, że biotransformacja antocyjanów zachodząca w nerkach owiec jest mniej intensywna, chociaż wcześniejsze badania na szczurach wskazywały na istotną rolę tego narządu w metabolizmie antocyjanów (Vanzo i in., 2011). W niniejszym badaniu w moczu owiec stwierdzono 21 antocyjanów (4 formy natywne i 17 metabolitów II fazy), czyli o 4 więcej niż w osoczu krwi (4 formy natywne i 13 metabolitów). Ponieważ dodatkowe cztery pochodne cyjanidyny (mCyglcsulf, dwie formy unm-Cy3ara, mCyara, unm-Cy3ara) wykryte w moczu nie występowały w osoczu krwi, musiały zatem powstać podczas procesów metabolicznych zachodzących w nerkach owiec.

4.1.2.3. Profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w płynie mózgowo-rdzeniowym

Zmiany profilu i stężenia antocyjanów i ich metabolitów II fazy w PMR owiec przedstawiono w **Tabeli 4** i **Wykresie 1C** (publikacja: **PI**). Przeprowadzone badania dowodzą, że antocyjany docierały do PMR po dożwaczowym podaniu preparatu z aronii, a ich profil i stężenie istotnie zmieniały się w czasie. Obserwowana fluktuacja wynikała prawdopodobnie ze zmiany stężenia tych polifenoli w osoczu krwi i różnych zdolności pochodnych cyjanidyny obecnych w osoczu krwi do przekraczania bariery krew–PMR. Pierwsze maksymalne stężenie antocyjanów w PMR ($0,28 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$) odnotowano 2 godziny od momentu podania preparatu. Przez następne 2,5 godz. całkowita zawartość antocyjanów w PMR stopniowo

obniżała się do poziomu $0,12 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$, by ostatecznie po 6,5 godz. od podaniu aronii osiągnąć najwyższą wartość ($0,32 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$). Następnie, gdy pula antocyjanów dostępnych we krwi zaczęła się wyczerpywać, zaobserwowano znaczny spadek zawartości antocyjanów w PMR. Ostatecznie 10 godz. po podaniu aronii zawartość antocyjanów w PMR ukształtowała się na poziomie $0,04 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$.

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano różnice w zdolności do przenikania bariery krew-PMR (**Tabela 2** vs. **Tabela 3**, publikacja: **PI**) pomiędzy poszczególnymi związkami. Generalnie, w PMR natywne antocyjany stanowiły 21,62% całkowitej zawartości antocyjanów. Co więcej, porównanie danych z osocza krwi i PMR wskazuje, że w PMR udział związków nasyconych (21,62%) był niższy w porównaniu z całkowitą zawartością tych związków w osoczu krwi (28,18%). Zjawisko to mogło wynikać z faktu, że natywne antocyjany mniej intensywnie przenikały do PMR niż inne formy tych związków. Z drugiej strony, niższy udział związków nasyconych w PMR mógł wynikać z faktu, że natywne antocyjany były absorbowane przez komórki bariery krew-PMR, a następnie były natychmiast metabolizowane. Jest również prawdopodobne, że natywne glikozydy antocyjanowe po wchłonięciu do komórek bariery krew-PMR mogły ulegać hydrolizie. W tym kontekście wcześniejsze badanie (Ishisaka i in., 2014) wykazało, że komórki splotu naczyniówkowego, gdzie znajduje się bariera krew-PMR, charakteryzowały się potencjałem dekonjugacji glukuronidu kwercetyny do aglikonu w wyniku aktywności β -glukuronidazy. Niestety, nie ma badań dostarczających jednoznacznych dowodów na aktywność β -glikozydazy w komórkach bariery krew-PMR. Jednak na podstawie znajomości aktywności β -glikozydaz w innych komórek organizmu, np. w komórkach błony śluzowej jelita cienkiego (Wiczowski i Piskula, 2004), nie można wykluczyć obecności tej aktywności w komórkach bariery krew-PMR. Ponieważ w osoczu krwi nie wykryto aglikonu cyjanidyny a jednocześnie w PMR wykryto znacznie wyższy niż w osoczu krwi odsetek mCy i Cysulf, można przypuszczać, że glikozydy cyjanidyny były wchłaniane przez komórki bariery krew-PMR, następnie hydrolizowane przez β -glikozydazy, a powstały aglikon mógł podlegać dalszym przemianom, głównie metylacji i/lub siarczanowaniu.

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazywały, że w PMR antocyjany występowały głównie jako metabolity II fazy (78,38%). Ponadto, odsetek metabolitów II fazy w puli antocyjanów znalezionych w PMR był o ~9% wyższy niż wykryty w osoczu krwi (71,82%). W przypadku poszczególnych grup metabolitów II fazy (glukuronowane, metylowane i siarczanowane) zaobserwowano różną zmianę proporcji tych pochodnych w całkowitej zawartości antocyjanów między osoczem krwi a PMR. Po pierwsze, zaobserwowano

zmniejszanie udziału pochodnych glukuronowanych z 63,12% (osocze krwi) do 55,26% (PMR). Po drugie, zwiększył się udział pochodnych metylowanych i siarczanowanych w PMR. Co więcej, w PMR udział pochodnych metylowanych, które nie zawierały reszt glukuronowych, zwiększył się dwukrotnie (16,73%) w stosunku do udziału tych pochodnych w osoczu krwi. Z kolei pochodne z resztami siarczanowymi wykazały aż pięciokrotny wzrost udziału w PMR (3,78%) w porównaniu z osoczem krwi (0,71%). Interpretując powyższe obserwacje można wskazać, że mniejszy udział form glukuronowanych antocyjanów (głównie mCyglc) w PMR niż w osoczu krwi mógł wynikać z aktywności β -glukuronidazy obecnej w komórkach bariery krew-PMR. Po wchłonięciu przez komórki bariery krew-PMR, mCyglc mógł być dekoniugowany przez ten enzym, a następnie pochodne deglukuronidowane mogły przenikać do PMR lub ulegać dalszym biotransformacjom, np. metylacji i/lub siarczanowaniu. Co istotne na możliwość przejściowej reakcji dekoniugacji i późniejszej rekoniugacji w środowisku bariery mózgowej wskazują wcześniejsze badania (Ishisaka i in., 2011). W przypadku wyższego udziału metylowanych form Cy3gal i Cy3ara w PMR można wskazać, że te dwie pochodne mogły być metylowane przez COMT po wchłonięciu przez komórki bariery krew-PMR, a następnie jako metylowane pochodne mogły przenikać do PMR. Proces ten mógł być możliwy, ponieważ, jak wcześniej wskazano (Polak i in., 2014) w komórkach układu nerwowego występuje COMT i może prowadzić metylację grup hydroksylowych fitozwiązków. Ponadto, w komórkach układu nerwowego znajdują się enzymy z grupy SULT, które katalizują sprzęganie różnych związków z kwasem siarkowym a proces ten jest ważnym szlakiem metabolizmu II fazy w mózgu (Suominen i in., 2013). Co więcej, zaobserwowano różne proporcje poszczególnych form glukuronowanych cyjanidyny w całkowitej zawartości antocyjanów w PMR i osoczu krwi. W porównaniu do osocza krwi, w badanym PMR stwierdzono zarówno spadek udziału procentowego dwóch form mCyglc (o 10.66% oraz 6.58%), jak i wzrost udziału procentowego Cyglc (o 9.49%). Wyższa pula Cyglc odkryta w PMR może wynikać z nagromadzenia form glukuronowych, które przenikły bezpośrednio z osocza krwi, ale może również uwzględniać substancje utworzone w komórkach bariery krew-PMR z zaabsorbowanych glikozydów cyjanidyny, które jak już wcześniej wspomniano mogły być hydrolizowane przez β -glikozydazy. Powstały aglikon mógł następnie ulegać koniugacji z kwasem glukuronowym, za pośrednictwem transferazy UDP-glukuronowej, która występuje w komórkach układu nerwowego (Suominen i in., 2013). Możliwe było również, że penetracja pochodnych cyjanidyny przez barierę krew-PMR, jak również metabolizm w komórkach bariery krew-PMR przebiegały według innych, niespecyficznych schematów. Ponadto, mCyglc

mógł przenikać przez barierę krew-PMR mniej intensywnie niż inne metabolity II fazy antocyjanów. Z drugiej strony, komórki barier mózgowych, oprócz kontrolowania napływu różnych cząsteczek do środowiska mózgu, mogą również odpowiadać za system wydalania tych związków i ich metabolitów ze środowiska PMR (Ishisaka i in., 2011), tym samym decydować o poziomie poszczególnych związków po obu stronach bariery. Zatem rzeczywiste chwilowe stężenie antocyjanów i ich metabolitów II fazy w PMR może kształtować się w wyniku zmian stężenia tych związków w osoczu krwi, procesów napływu i wypływu przez barierę krew-PMR oraz intensywności i kierunku metabolizmu w komórkach barierowych.

4.2. Określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z kapusty czerwonej [publikacja: PII; Płatosz i in., 2020]

4.2.1. Charakterystyka profilu i zawartości antocyjanów kapusty czerwonej

Przeprowadzona analiza metodą mikro-HPLC-MS/MS preparatu z liofilizowanej kapusty czerwonej wykazała obecność 20 pochodnych cyjanidyny (**Tabela 1**, publikacja: **PII**), a ich całkowita zawartość wyniosła $20,14 \pm 0,39$ mg cyjanidyny/g sm. Podstawową strukturą antocyjanów występujących w tym warzywie była nieacylowana forma Cy3diG5G. Związek ten stanowił 10,3% całkowitej zawartości antocyjanów kapusty czerwonej, podczas gdy druga nieacylowana pochodna, 3-glukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3G5G) stanowiła jedynie 0,7% tej zawartości. Poza związkami nieacylowanymi, w analizowanym warzywie wykazano obecność osiemnastu mono- i diacylowanych (kwasem sinapinowym, ferulowym, kawowym i/lub *p*-kumarowym) pochodnych Cy3diG5G. Pochodne te stanowiły 89% całkowitej zawartości antocyjanów.

Dominującymi związkami wśród pochodnych acylowanych znalezionych w kapuście czerwonej był 3-(synapoilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(sin)diG5G), oraz 3-(synapoilo)(synapoilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(sin)(sin)diG5G)) stanowiące odpowiednio ponad 15% i 13% całkowitej zawartości antocyjanów. Podobny profil i zawartość antocyjanów w kapuście czerwonej został przedstawiony wcześniej przez Wiczkowskiego i in. (2014) oraz Wu i in. (2006).

Z uzyskanych danych wynika, że kapusta czerwona jest bogatym źródłem nieacylowanych i acylowanych antocyjanów. Tym samym jest unikalną, naturalną matrycą umożliwiającą zbadanie zależności między występowaniem acylacji w strukturach antocyjanów, a procesami zachodzącymi w organizmie po spożyciu tych antocyjanów. Dlatego w niniejszych badaniach, oprócz analizy przenikania antocyjanów kapusty czerwonej

i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR, oceniono również wpływ występowania acylacji w cząsteczkach antocyjanów na ich przenikanie przez barierę krew-PMR.

4.2.1. Badanie profilu i zawartości antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec

Z przeprowadzonej analizy wynika, że podobnie jak w przypadku ludzi (Wiczowski i in., 2016; Charron i in., 2007) antocyjany z kapusty czerwonej są również wchłaniane przez owce, co potwierdzono identyfikując 34 pochodne antocyjanów w osoczu krwi i moczu tych zwierząt (**Tabela 1**, publikacja: **PII**). Oprócz antocyjanów natywnych (2 formy nieacylowane i 15 acylowanych), po dożwaczowym podaniu kapusty czerwonej w osoczu krwi i moczu owiec stwierdzono obecność 17 metabolitów cyjanidyny (formy metylowane, glukuronowane i siarczanowane). Dla porównania, w ludzkich płynach fizjologicznych po spożyciu tego warzywa zidentyfikowano 29 pochodnych cyjanidyny (Wiczowski i in., 2016). Ta obserwacja znajduje potwierdzenie we wcześniejszych badaniach wykazujących, że różnice we wchłanianiu, metabolizmie, dystrybucji i wydalaniu fitozwiązków między poszczególnymi grupami zwierząt (Sakakibara i in., 2009; Chen i in., 2015) mogą wpływać na różne profile związków natywnych i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych.

4.2.1.1. Badanie profilu i stężenie antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w osoczu krwi owiec

Na **Wykresie 1** i w **Tabeli 2** (publikacja: **PII**) przedstawiono zmiany profilu i stężenia antocyjanów oraz ich metabolitów II fazy w osoczu krwi owiec po dożwaczowym podaniu preparatu z kapusty czerwonej. Głównymi natywnymi antocyjanami zidentyfikowanymi w osoczu krwi podczas całego eksperymentu były Cy3diG5G, Cy3(sin)(sin)diG5G, 3-(*p*-kumaroilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny, (Cy3(*p*-cum)diG5G), oraz Cy3(sin)diG5G, a najwyższe stężenia tych barwników wykryto w okresie 1,5-2,5 godz. po podaniu preparatu. Ponadto, pochodne nieacylowane stanowiły ponad 25%, a pochodne acylowane prawie 75% wszystkich antocyjanów natywnych występujących w osoczu krwi. Wśród metabolitów II fazy w trakcie trwania eksperymentu dominowały Cyglc, metylowana cyjanidyna (mCy) i mCyglc, a najwyższe stężenie tych metabolitów zaobserwowano po 7,5 godz. od podania preparatu. Ponadto, biorąc pod uwagę poszczególne grupy metabolitów II fazy, wykazano, że deglukozylacja, metylacja, glukuronidacja i siarczanowanie występowały odpowiednio w 80, 65, 37 i 9% wykrytych metabolitów II fazy. Ogólnie, średni procentowy

udział natywnych antocyjanów w całym eksperymencie wyniósł prawie 39,5%, a ich metabolity II fazy stanowiły nieco ponad 60,5%. Przy czym należy zauważyć, że udziału form natywnych w stosunku do metabolitów II fazy zmieniał się podczas trwania eksperymentu. Zatem, można wyróżnić trzy główne przedziały wykazujące skrajnie różne stosunki tych dwóch form. Pierwszy okres z przedziałem czasowym 0,5–4 godz. wyróżniał się przewagą pochodnych natywnych (> 76%). W drugim okresie (4,5 godz.) odnotowano podobny udział natywnych antocyjanów (49,85%) i ich metabolitów II fazy (50,15%). Zupełnie inny układ antocyjanów odkryto w trzecim przedziale (5,0–10 godz.), gdzie ponad 87% antocyjanów występowało w postaci metabolitów II fazy.

Po pierwszym pojawieniu się antocyjanów w osoczu krwi owiec (0,5 godz., $10,54 \pm 0,40$ nmol/L), ich stężenie intensywnie zmieniał się w ciągu kolejnych 10 godz., co objawiało się występowaniem aż dwóch maksymalnych wartości tego parametru (2 godz., $37,91 \pm 1,35$ nmol/L; 7,5 godz., $45,89 \pm 1,81$ nmol/L) rozdzielonych okresem charakteryzującym się znacznie niższym stężeniem antocyjanów (4–6 godz., $10,65 \pm 0,31$ nmol/L). Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku dożwaczowego podania preparatu antocyjanów z aronii (publikacja: **PI**). Ponadto, po okresie wystąpienia w osoczu krwi drugiego maksimum stężenia antocyjanów, w wyniku intensywnego metabolizmu i stopniowego wyczerpywania się puli antocyjanów znajdujących się w przewodzie pokarmowym, odnotowano sukcesywny spadek całkowitej zawartości antocyjanów. Ostatecznie po 10 godzinach od podania kapusty czerwonej stężenie antocyjanów w osoczu krwi owiec wyniosło $17,03 \pm 0,69$ nmol/L.

4.2.1.2. Badanie profilu i stężenie antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w moczu owiec

Zmiany profilu i stężenia antocyjanów w moczu owiec po podaniu kapusty czerwonej przedstawiono na **Wykresie 2** i w **Tabeli 3** (publikacja: **PII**). Wśród natywnych antocyjanów występujących w moczu głównym związkiem był Cy3diG5G, a następnie Cy3G5G, Cy3(sin)diG5G, Cy3(*p*-cum)diG5G i 3-(feruloilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny (Cy3(fer)diG5G). Generalnie, pochodne nieacylowane stanowiły około 40%, natomiast pochodne acylowane prawie 60% związków natywnych. W przypadku metabolitów II fazy największy udział miał Cyglc (32,99%), natomiast drugim głównym metabolitem był mCyglc (21,93%). Ponadto, ocena profilu metabolitów antocyjanów w moczu wskazuje, że dominującymi były formy deglukozylowane (95%) i glukuronidowane (82%). Mniejszym udziałem charakteryzowały się formy metylowane (46%) i siarczanowane (1%).

Podobnie jak w przypadku osocza krwi owiec, w moczu ujawniono trzy stadia o różnym stosunku form natywnych do metabolitów II fazy. Przewaga antocyjanów natywnych (68,8%) została wykryta w ciągu pierwszych trzech przedziałów czasowych (od 0-1 godz. do 2-3 godz.), natomiast dominacja metabolitów II fazy (88,4%) została znaleziona w ciągu ostatnich sześciu okresów (od 4 do 5 godz. do 9-10 godz.). Pomiedzy tymi dwoma etapami wystąpił jeden okres (3-4 godz.) o bardzo podobnym udziale związków natywnych i metabolitów II fazy (48,5 vs. 51,5%). Ogólnie w całym eksperymencie średni procentowy udział antocyjanów natywnych w moczu wyniósł prawie 31%, a ich metabolity II fazy nieco ponad 69%. Ponadto, po pierwszym pojawieniu się antocyjanów w moczu owiec (0–1 godz., $109,13 \pm 1,90$ nmol/L) przebieg zmian ich stężenia był zbliżony do stwierdzonego w osoczu krwi z dwoma maksymalnymi wartościami tego parametru (3-4 godz.: $316,13 \pm 7,43$ nmol/L; 7-8 godz.: $345,88 \pm 13,92$ nmol/L). Otrzymane wyniki wskazują, że kształt, zakres i profil wydalania antocyjanów z moczem w znacznym stopniu stanowi odzwierciedlenie obserwacji ujawnionych w osoczu krwi. Podobne zjawisko zaobserwowano w eksperymencie z antocyjanami aronii (publikacja: **PI**).

4.2.1.3. Badanie profilu i stężenie antocyjanów kapusty czerwonej i ich metabolitów II fazy w płynie mózgowo-rdzeniowym owiec

W niniejszych badaniach wykazano po raz pierwszy obecność 12 pochodnych cyjanidyny w PMR owiec po dożwaczowym podaniu preparatu z kapusty czerwonej (**Tabela 1**, publikacja: **PII**). Co ciekawe, spośród 17 natywnych antocyjanów kapusty czerwonej występujących w osoczu krwi owiec, w PMR tych zwierząt wykryto tylko jeden związek - Cy3G5G. W pobranym PMR nie znaleziono Cy3diG5G i acylowanych pochodnych cyjanidyny. W przypadku metabolitów II fazy, wśród 17 pochodnych cyjanidyny zidentyfikowanych w osoczu krwi, aż 11 stwierdzono również w PMR. Zatem, jak wykazują przedstawione dane, antocyjany przenikają z krwi do PMR po podaniu kapusty czerwonej. Ponadto, należy wskazać, że podobnie jak po podaniu antocyjanów aronii ich profil i stężenie istotnie zmieniały się w czasie eksperymentu (**Wykres 3**, **Tabela 4**, publikacja: **PII**). Biorąc pod uwagę ogólny profil metabolitów II fazy w osoczu krwi w porównaniu z ich profilem w PMR, należy zauważyć, że w obu przypadkach najczęściej występowały metabolity o cząsteczkach deglukozylowanych (odpowiednio 80 i 94%), a kolejnymi były pochodne metylowane (65 i 54%) oraz glukuronowane (odpowiednio 37 i 42%), natomiast pochodne siarczanowane charakteryzowały się najniższym udziałem w obu płynach fizjologicznych (odpowiednio 9 i 31%). Obserwowana zmienność mogła wynikać ze

zmiany stężenia pochodnych cyjanidyny w osoczu krwi (1), z różnych zdolności związków cyjanidyny występujących w osoczu krwi do przekraczania bariery krew-PMR (2) oraz z przemian metabolicznych pochodnych cyjanidyny w komórkach bariery krew-PMR (3). Biorąc pod uwagę pierwsze wyjaśnienie, można zaobserwować wiele podobieństw między osoczem krwi, a PMR w zakresie przebiegu zmiany stężenia antocyjanów (**Wykres 1** vs. **Wykres 3**, publikacja: **PII**). Tak więc w obu płynach fizjologicznych wystąpiły aż dwie maksymalne wartości całkowitego stężenia antocyjanów (2 i 2,5 godz. vs. 2,5 i 8 godz.). Ponadto, gdy pula związków cyjanidyny dostępnych we krwi uległa wyczerpaniu, odnotowano również spadek całkowitego stężenia antocyjanów w PMR. Odnosząc się do drugiego uzasadnienia dotyczącego zdolności związków cyjanidyny do przechodzenia przez barierę krew-PMR, stwierdzono znaczne rozbieżności w tym kontekście pomiędzy poszczególnymi związkami (**Tabela 2** vs. **Tabela 4**, publikacja: **PII**). Należy najpierw zauważyć, że nieacylowane pochodne cyjanidyny przenikały przez barierę krew-PMR, tymczasem acylowane pochodne cyjanidyny nie miały takich możliwości. Wyniki te sugerują, że istnieją istotne różnice w biologicznym losie antocyjanów nieacylowanych i acylowanych w obszarze bariery krew-PMR. Prawdopodobne jest, że brak przenikania acylowanych antocyjanów przez tę barierę wynika ze znacznego rozmiaru ich cząsteczek (≥ 787 Da) (Pan i Kastin, 2004). Nie wykluczając jednak powyższego argumentu, możliwe jest również, że acylowane antocyjany nie oddziałują bezpośrednio z miejscem aktywnym bilitranslokazy obecnej w barierze krew-PMR, ale tylko w pobliżu tego miejsca, co w konsekwencji zaburza aktywne miejsce transportera i uniemożliwia transport tych pochodnych (Passamonti i in., 2002). W przypadku trzeciej interpretacji przyczyn powodujących znaczne fluktuację profilu i stężenia pochodnych cyjanidyny w PMR (**Tabela 4**, **Wykres 3**, publikacja: **PII**), można brać pod uwagę kilka możliwych biotransformacji tych związków w barierze krew-PMR podczas ich przenikania. Procesy te zostały już szczegółowo omówione w podrozdziale 4.1.2.3. dotyczącym przenikania antocyjanów aronii w PMR.

Podsumowując, niniejsze badania wskazują, że chociaż w osoczu krwi i moczu po spożyciu kapusty czerwonej występowały zarówno acylowane, jak i nieacylowane pochodne antocyjanów, to tylko nieacylowane pochodne były obecne w PMR. Ponadto zmiany profilu i stężenia antocyjanów w PMR wynikały z wahań stężeń tych barwników we krwi, ich różnej zdolności przenikania przez barierę krew-PMR oraz przemian metabolicznych w komórkach bariery krew-PMR podczas procesu przenikania. Warto zauważyć, że niniejsze wyniki jednoznacznie wskazują, że bariera krew-PMR jest selektywna dla poszczególnych antocyjanów.

4.3. Określenie zdolności pochodnych cyjanidyny i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy po dożylnym podaniu owcom preparatu 3-galaktozydu cyjanidyny oraz 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny [publikacja: PIII; Płatosz i in., 2022]

Jak przedstawiono powyżej, pochodne cyjanidyny mogą przenikać przez barierę krew-PMR i kumulować się w PMR owiec po dożwaczowym podaniu preparatów z aronii (publikacja: **PI**) i kapusty czerwonej (publikacja: **PII**). Ponadto, analiza danych z tych dwóch eksperymentów wskazuje, że w PMR po dożwaczowym podaniu aronii zidentyfikowano aż 14 związków z puli 17 pochodnych cyjanidyny zidentyfikowanych w osoczu krwi, natomiast po dożwaczowym podaniu kapusty czerwonej w PMR zidentyfikowano jedynie 12 związków z puli 34 metabolitów II fazy zidentyfikowanych w osoczu krwi. Jednak na podstawie tych badań nie można jednoznacznie określić, które z antocyjanów, czy z aronii, czy z kapusty czerwonej (poza formami acylowanymi, które nie przenikają przez barierę krew-PMR) mają większy potencjał przekraczania tej bariery. Biorąc powyższe pod uwagę, celem kolejnego etapu badań nad antocyjanami było określenie zdolności Cy3gal (głównego związku antocyjanowego aronii) oraz Cy3diG5G (podstawowego związku antocyjanowego kapusty czerwonej) do przenikania przez barierę krew-PMR po dożylnym podaniu czystych postaci tych substancji, umożliwiającym pominięcie wpływu procesów wchłaniania. Zgodnie z dostępną wiedzą, jest to pierwsze badanie, w którym określono pełny profil metabolomiczny pochodnych cyjanidyny w osoczu krwi, moczu i PMR po dożylnym podaniu mieszaniny Cy3gal i Cy3diG5G.

4.3.1. Badanie profilu i zawartości 3-galaktozydu cyjanidyny oraz 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec

W analizowanych metodą mikro-HPLC-MS/MS płynach fizjologicznych owiec (osocze krwi, mocz i PMR) po dożylnym podaniu preparatu zawierającego mieszaninę Cy3gal i Cy3diG5G zidentyfikowano 19 antocyjanów (publikacja: **PIII**). Wszystkie pochodne cyjanidyny zidentyfikowane w tym badaniu zostały już wcześniej opisane (rozdział 4.1.2 oraz 4.2.2).

4.3.1.1. Zmiany profilu i stężenia 3-galaktozydu cyjanidyny oraz 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny i ich metabolitów II fazy w osoczu krwi, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym

Biologiczny los Cy3gal i Cy3diG5G po ich dożylnym podaniu owcom scharakteryzowano na podstawie zmian profilu i stężenia związków natywnych oraz ich metabolitów II fazy w próbkach osocza krwi (**Tabela 2 i Wykres 1**), moczu (**Tabela 3 i Wykres 2**) i PMR (**Tabela 4, Wykres 3**) (publikacja: **PIII**). Tendencje zmian obserwowane w profilu i stężeniu pochodnych cyjanidyny są podobne we wszystkich analizowanych płynach fizjologicznych, a ponadto wydaje się, że zjawiska obserwowane w moczu i PMR w dużym stopniu odzwierciedlają te znajdujące w osoczu krwi. Ogólnie, w ciągu 10 godzin od momentu dożylnego podania mieszaniny Cy3gal/Cy3diG5G, stężenie pochodnych cyjanidyny wahało się istotnie w zgromadzonym osoczu krwi, moczu i PMR (**Wykres 1, 2, 3**, publikacja: **PIII**). Maksymalne stężenia pochodnych cyjanidyny we wszystkich badanych płynach fizjologicznych wystąpiło w ciągu pierwszych 2 godzin od momentu podania preparatu. Co więcej, po osiągnięciu maksymalnego stężenia, w kolejnych punktach czasowych całkowite stężenie pochodnych cyjanidyny w badanych płynach fizjologicznych zmniejszało się sukcesywnie. Niemniej jednak w tym okresie w przypadku osocza krwi i PMR zaobserwowano chwilowe wzrosty całkowitego stężenia pochodnych cyjanidyny. Jedną z prawdopodobnych przyczyn pojawienia się tych wzrostów stężeń antocyjanów w osoczu krwi, a co za tym idzie również w PMR, może być krążenie jelitowo-wątrobowe metabolitów cyjanidyny. Ostatecznie najniższe całkowite stężenie pochodnych cyjanidyny w osoczu krwi ($0,22 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$), moczu ($18,28 \pm 2,69 \mu\text{mol/L}$) i PMR ($0,03 \pm 0,00 \mu\text{mol/L}$) wykryto po 10 godz. eksperymentu.

Uzyskane wyniki wykazują, że pochodne cyjanidyny obecne w osoczu krwi, moczu i PMR po dożylnym podaniu preparatu zawierającego mieszaninę Cy3gla i Cy3diG5G były reprezentowane głównie przez metabolity II fazy (**Tabela 2**, publikacja: **PIII**). W przypadku moczu (96%) i PMR (94,1%) procentowa zawartość metabolitów II fazy była wyższa niż w osoczu krwi (76%). Biorąc pod uwagę powyższe dane należy stwierdzić, że przewaga metabolitów II fazy mogła wynikać z drogi podania związków cyjanidyny. W tym przypadku nieuzupełniana pula antocyjanów po dożylnym podaniu związków cyjanidyny w pojedynczej dawce była intensywnie metabolizowana. Dla porównania po podaniu dożwaczowym (publikacje: **PI, PII**) kolejne pule antocyjanów uwalniane z matrycy mogły przenikać z przewodu pokarmowego do krwi i zasilać poszczególne frakcje. W niniejszym badaniu, w ciągu 10 godzin od momentu dożylnego podania związków cyjanidyny, wśród metabolitów II fazy znalezionych w osoczu krwi głównymi pochodnymi cyjanidyny były

diglukozyd cyjanidyny (CydiG) (12,94%), Cy3G (12,47%) i mCyglc (11,83%) (**Tabela 2**, publikacja: **PIII**). Najwyższe stężenie CydiG w osoczu krwi oznaczono po 0,5 godz., podczas gdy Cy3G dominował po 1 godz. od momentu podania preparatu. Ponieważ oba metabolity są deglukozylowanymi pochodnymi Cy3diG5G, można przypuszczać, że deglukozylacja przebiegała etapami ($\text{Cy3diG5G} \rightarrow \text{CydiG} \rightarrow \text{Cy3G}$) i była głównym procesem biotransformacji w pierwszej godzinie po podaniu mieszaniny. W pierwszej godzinie po prowokacji maksymalne stężenia wykryto również dla glukozydu metylowanej cyjanidyny (mCyG), diglukozydu metylowanej cyjanidyny (mCydiG), triglukozydu metylowanej cyjanidyny (mCytriG), mCygal, Cyglc i mCy, przy czym należy zauważyć że stężenia tych związków były niższe w porównaniu z deglukozylowanymi pochodnymi. Ponieważ większość wymienionych metabolitów to metylowane pochodne cyjanidyny, wyniki te mogą sugerować, że w przypadku dożylnego podania antocyjanów metylacja była drugą drogą po deglukozylacji w procesie biotransformacji. W przypadku trzeciego głównego metabolitu, mCyglc, jego najwyższy stężenie wykryto nieco później w porównaniu z formami deglukozylowanymi i metylowanymi, tj. 1,5 godz. po podaniu mieszaniny antocyjanów. Co ciekawe, w cząsteczce tego metabolitu pojawiła się inna ścieżka biotransformacji – glukuronidacja. Ponadto, w tym czasie eksperymentu, oprócz monoglukuronowanej pochodnej cyjanidyny, maksymalne stężenie stwierdzono dla diglukuronowanej pochodnej cyjanidyny. Ten wynik może wskazywać, że po dożylnym podaniu antocyjanów, glukuronidacja jest trzecią w kolejności ścieżką biotransformacji po deglukozylacji i metylacji. Jeśli chodzi o czwartą ścieżkę metaboliczną, czyli siarczanowanie, najwyższy udział metabolitów sprzężonych z kwasem siarkowym zaobserwowano znacznie później, bo w okresie od 3 do 4 godz. po dożylnym podaniu mieszaniny antocyjanów. Ponadto, w tym przedziale czasowym pojawienie się maksymalnej zawartości pochodnych siarczanowych w osoczu krwi owiec zbiegło się z drugim maksimum całkowitej zawartości pochodnych cyjanidyny i drugim maksimum dla pochodnych deglukozylowanych, metylowanych i glukuronidowanych. Jest zatem prawdopodobne, że siarczanowanie jest jednym z ostatnich w serii procesów biotransformacji antocyjanów u owiec po dożylnym podaniu tych naturalnych barwników. W przypadku moczu i PMR zaobserwowano inny profil głównych metabolitów II fazy. Głównymi metabolitami Cy3gal i Cy3diG5G w PMR były dwa związki: Cyglc (16,24%) i mCy (12,88%). Najwyższa zawartość obu głównych metabolitów II fazy pojawiła się 1 godz. po podaniu antocyjanów. Natomiast w moczu owiec, głównymi związkami wśród metabolitów II fazy były Cyglc (26,92%) i mCyglc (26,54%). Ponadto mCygal (12,72%), Cy3G (11,75%), oraz mCyG (11,24%) miały znaczący udział w całkowitej zawartości pochodnych cyjanidyny

w wydalonym moczu. Ich maksymalne stężenia obserwowano już w pierwszych okresach po podaniu antocyjanów (0-1 godz. i 1-2 godz.).

4.3.1.2. Porównanie zdolności 3-galaktozydu cyjanidyny i 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny oraz ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy

Jak opisano powyżej, antocyjany są intensywnie biotransformowane w organizmach zwierząt i ludzi, dlatego też w celu pełnego scharakteryzowania potencjału Cy3gal i Cy3diG5G do przekraczania przez barierę krew-PMR należy w pierwszej kolejności określić pochodzenie każdego zidentyfikowanego metabolitu II fazy tj. wytworzonego z Cy3gal lub wytworzonego z Cy3diG5G. Przeprowadzona analiza struktur zidentyfikowanych związków wskazała, że siedem związków (CydiG, Cy3G, mCyG, mCydiG, mCytriG, mCyG i siarczano-glukuronido-glukozyd metylowanej cyjanidyny (mCyGglsulf)) powstało z Cy3diG5G. Związki te scharakteryzowano jako metabolity Cy3diG5G, ponieważ podobnie jak forma natywna zawierały co najmniej jedną resztę glukozy w zidentyfikowanej cząsteczce. Spośród nich tylko jeden, mCytriG nie został znaleziony w PMR. Kolejne dwa metabolity II fazy (mCygal i mCygal) zostały wstępnie zidentyfikowane jako pochodne Cy3gal na podstawie obecności reszty galaktozy w ich cząsteczce. Te dwie grupy metabolitów II fazy (łącznie dziewięć pochodnych) zostały określane jako „niekwestionowane pochodne/metabolity” Cy3diG5G (7 pozycji) lub Cy3gal (2 pozycje). W przypadku pozostałych ośmiu metabolitów II fazy (mCy, Cyglc, diglukuronid cyjanidyny (Cydiglc), mCyglc, diglukuronid metylowanej cyjanidyny (mCydiglc), Cysulf, mCysulf i mCyglcsulf), nie było możliwe jednoznaczne określenie z ich pochodzenia (z Cy3diG5G czy z Cy3gal), ponieważ nie zawierały reszty glikozydowej w swojej cząsteczce. Ta grupa metabolitów II fazy została określona mianem „nieprzypisanych metabolitów”. Spośród nich 4 związki, tj. mCydiglc, Cysulf, mCysulf i mCyglcsulf, zostały znalezione tylko w osoczu krwi owiec.

Biorąc pod uwagę dużą rozbieżność w liczbie metabolitów II fazy sklasyfikowanych jako powstające z podanych związków (7 metabolitów z Cy3diG5G i 2 metabolity z Cy3gal) oraz liczby „nieprzypisanych metabolitów” (8 związków), należy podkreślić, że proponowane poniżej oszacowanie potencjału przekraczania barier nie jest jednoznaczne i ukazuje jedynie pewne trendy. Zatem, potencjał przekraczania bariery krew-PMR przez obie pochodne cyjanidyny można porównać tylko w oparciu o stężenie związków natywnych po obu stronach bariery (tj. osocze krwi vs. PMR). Wydaje się jednak, że takie podejście będzie zbyt wąskie, ponieważ pochodne cyjanidyny są bardzo intensywnie metabolizowane u ludzi i zwierząt,

a wiele metabolitów cyjanidyny znajduje się we krwi (Wiczowski i in., 2010). Dlatego zasadne jest rozważenie innych opcji uwzględniających znacznie większy zbiór danych i szersze spojrzenie na obserwowane zjawisko (tj. porównanie sumy metabolitów II fazy lub sumy związków natywnych i ich metabolitów II fazy po obu stronach bariery). Biorąc pod uwagę pierwszy układ - porównanie form natywnych, w osoczu krwi owiec stwierdzono podobne całkowite stężenie Cy3diG5G ($3,93 \pm 0,38 \mu\text{mol/L}$) i Cy3gal ($4,42 \pm 0,33 \mu\text{mol/L}$) podczas trwania całego eksperymentu. W przeciwieństwie do tego, w PMR znaleziono jedynie Cy3gal ($0,13 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$). Dane te wskazują, że około $2,96 \pm 0,22\%$ Cy3gal przeszło przez barierę krew-PMR w swojej natywnej postaci, podczas gdy Cy3diG5G nie przekroczył bariery krew-PMR. W poprzednim badaniu (publikacja: **PII**) również nie stwierdzono Cy3diG5G w PMR po dożwaczowym podaniu preparatu z kapusty czerwonej. Biorąc pod uwagę tylko te dwa związki natywne, można stwierdzić, że jedynie Cy3gal ma potencjał do przekroczenia badanej bariery. Podejście to wyklucza jednak wiele metabolitów obu związków powstających w organizmie owcy w wyniku procesów metabolicznych, a tym samym nie odzwierciedla rzeczywistego zjawiska przenikania antocyjanów przez tę barierę. Porównując natomiast całkowite stężenie metabolitów II fazy we krwi, należy stwierdzić że stężenie „niekwestionowanych metabolitów Cy3diG5G” ($13,13 \pm 0,23 \mu\text{mol/L}$) było ponad 5-krotnie wyższe niż „niekwestionowanych metabolitów Cy3gal” ($2,68 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$). Z drugiej strony, w PMR stężenie „niekwestionowanych metabolitów Cy3diG5G” ($0,86 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$) było tylko 2,7 razy większe niż „niekwestionowanych metabolitów Cy3gal” ($0,32 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$). Analiza tych danych wykazała, że barierę krew-PMR przekroczyło 12,06% metabolitów Cy3gal i tylko 6,58% metabolitów Cy3diG5G. Zatem po przeanalizowaniu stężeń związków natywnych i ich „niekwestionowanych metabolitów” w osoczu krwi i PMR stwierdzono, że Cy3gal i jego „niekwestionowane metabolity” (6,40%) miały lepszy potencjał przenikania przez barierę krew-PMR w porównaniu z Cy3diG5G oraz jego „niekwestionowanymi metabolitami” (5,07%).

Wśród zebranych danych pozostała jeszcze grupa metabolitów II fazy zwanych „nieprzypisanymi metabolitami”. Jak wspomniano wyżej, ze względu na brak reszty glikozydowej w cząsteczce, związków tych nie można jednoznacznie przypisać do metabolitów Cy3gal lub Cy3diG5G. Nie mniej jednak, wcześniejsze badania przy użyciu tego samego modelu owczego, w których osobno analizowano przenikanie antocyjanów z aronii (publikacja: **PI**) i kapusty czerwonej (publikacja: **PII**), pozwalają na rozszyfrowanie przynależności metabolitów II fazy opisanych mianem grupy „nieprzypisanych metabolitów”. Zarówno po

podaniu aronii jak i kapusty czerwonej, w osoczu i PMR pojawiła się grupa metabolitów II fazy, które można określić jako „związki nieprzypisane” ze względu na brak reszty glikozydowej w cząsteczce. Ponieważ w przeprowadzonych eksperymentach podawano tylko jedno ze źródeł antocyjanów tj. aronię (publikacja: **PI**) lub czerwoną kapustę (publikacja: **PII**), tym samym w pierwszym przypadku zidentyfikowano tylko „nieprzypisane metabolity” antocyjanów aronii, a w drugim tylko „nieprzypisane metabolity” antocyjanów kapusty czerwonej. Analiza danych z eksperymentu po dożwaczowym podaniu aronii wykazała, że „nieprzypisane metabolity” stanowiły odpowiednio 64% i 65% wszystkich antocyjanów znajdujących się w osoczu krwi i PMR owiec. Po podaniu kapusty czerwonej udział procentowy tej grupy „nieprzypisanych metabolitów” wynosił 37% (osocze krwi) i 57% (PMR). Ekstrapolując dane uzyskane z poprzednich dwóch eksperymentów (publikacje: **PI**, **PII**) na wyniki eksperymentu z podaniem dożylnym (publikacja: **PIII**) można stwierdzić, że w osoczu krwi stężenie „nieprzypisanych metabolitów”, które mogą pochodzić z Cy3gal ($6,75 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$) było 1,7 razy wyższe niż z Cy3diG5G ($3,91 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$). Natomiast stężenie tych metabolitów II fazy w PMR było zbliżone, tj. $0,48 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ dla Cy3gal i $0,42 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ dla Cy3diG5G. Dalsza analiza „nieprzypisanych metabolitów” wykazała, że ich zdolność do przenikania bariery krew-PMR w przypadku metabolitów Cy3gal wynosiła 7,10% , a przypadku metabolitów Cy3diG5G kształtowała się na poziomie 10,60%.

Ponadto, porównanie sumy „niekwestionowanych metabolitów” i „nieprzypisanych metabolitów” pochodzących z Cy3diG5G i Cy3gal znalezionych w osoczu krwi wykazało, że stężenie związków pochodzących z Cy3diG5G ($17,04 \pm 0,24 \mu\text{mol/L}$) było prawie 1,8 razy wyższe niż pochodzących z Cy3gal ($9,43 \pm 0,21 \mu\text{mol/L}$). Natomiast, w PMR poziom metabolitów Cy3diG5G ($1,28 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$) był 1,6 razy wyższy w porównaniu z metabolitami Cy3gal ($0,80 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$). Analiza tych danych wykazała, że 8,50% metabolitów Cy3gal i 7,51% metabolitów Cy3diG5G przekroczyło barierę krew-PMR.

Natomiast, zsumowanie wszystkich grup związków występujących w osoczu krwi i PMR (tj. natywnych antocyjanów, „niekwestionowanych metabolitów” i „nieprzypisanych metabolitów”) pokazuje, że stężenie pochodnych Cy3diG5G w osoczu krwi ($20,97 \pm 0,24 \mu\text{mol/L}$) był 1,5 razy wyższy niż pochodnych Cy3gal ($13,85 \pm 0,21 \mu\text{mol/L}$). W przypadku PMR stężenie pochodnych Cy3diG5G ($1,28 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$) było 1,4 razy wyższe niż pochodnych Cy3gal ($0,93 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$). Analiza tych danych wykazała, że barierę krew-PMR przekroczyło 6,73% pochodnych Cy3gal i 6,10% pochodnych Cy3diG5G. Można zatem wywnioskować, że potencjał przekraczania barier przez Cy3gal i jego metabolity II fazy był wyższy niż w przypadku Cy3diG5G i jego metabolitów II fazy.

Ponieważ zastosowane w badaniach antocyjany mają identyczną strukturę podstawową - cyjanidynę, a różnią się rodzajem i liczbą podstawników oraz wielkością cząsteczek, prawdopodobnym czynnikiem decydującym o zaobserwowanych różnicach w potencjale przekraczania bariery była konkurencja tych związków o ten sam transporter odpowiedzialny za ich przenikanie przez barierę krew-PMR. Jak wspomniano wcześniej, ze względu na specyficzną budowę bariery oraz fakt, że antocyjany są substancjami hydrofilowymi, przejście Cy3gal i Cy3diG5G oraz ich metabolitów II fazy przez barierę jest możliwe za pomocą specyficznych transporterów, tj. bilitranslokazy i glikoproteiny P. Biorąc pod uwagę powyższe założenie, można przypuszczać, że typ podstawnika przyłączony do cząsteczki cyjanidyny, tj. galaktoza, glukoza, kwas glukuronowy, kwas siarkowy i grupa metylowa, może determinować zdolność poszczególnych pochodnych do przenikania przez bariery mózgowia. Z analizy danych zebranych podczas eksperymentu wynika, że procent przekraczania bariery przez Cy3gal (3,0%) był znacznie niższy niż w przypadku metylowanych pochodnych Cy3gal (12,1%). Podobną tendencję wykazały pochodne Cy3diG5G, tj. niemetylowane formy CydiG i CyG (3,4%) charakteryzowały się niższym procentem penetracji bariery niż metylowane pochodne CydiG i CyG (10,6%). Co więcej, metylowane pochodne Cy3gal (12,1%) wykazały wyższą zdolność przekraczania bariery w porównaniu z metylowanymi pochodnymi Cy3diG5G (10,6%). Ta obserwacja jest zgodna z wynikami wcześniejszych badań (Youdim i in., 2003; Ichianagi i in., 2006; Yi i in., 2006). W tym zakresie badania wskazują również na wyższą zdolność do przekraczania bariery przez pochodne cyjanidyny z resztą galaktozy (Cy3gal, 6,7%) niż przez pochodne cyjanidyny z resztami glukozy (Cy3diG5G, 6,1%). Oczywiście nie można wykluczyć, że inną współistniejącą przyczyną niższego potencjału przekraczania barier przez pochodne Cy3diG5G była wielkość cząstek (> 773 Da), której efekt zaobserwowano również we wcześniejszych badaniach (publikacja: **PI**). Nie można również pominąć możliwości, że metabolity cyjanidyny znajdujące się w PMR powstały w wyniku procesów zachodzących w komórkach barierowych, co wpłynęło na profil metabolitów II fazy obserwowany w tym płynie.

5. WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Aronia i kapusta czerwona są bogatym źródłem antocyjanów.
2. Podstawową strukturą antocyjanów znalezionych w aronii i kapuście czerwonej jest cyjanidyna występująca w formie glikozydowej. Główną pochodną cyjanidyny występującą w aronii jest Cy3gal, natomiast podstawową strukturą antocyjanów kapusty czerwonej jest Cy3diG5G.
3. Aronia i kapusta czerwona są unikalnymi matrycami umożliwiającymi zbadanie zależności między 1) występowaniem różnych podstawników glikozydowych (glukozy, galaktozy, ksylozy, oraz arabinozy) w cząsteczce cyjanidyny, oraz 2) występowaniem mono- i diacylacji w strukturach antocyjanów, a procesami zachodzącymi w organizmie po przyjęciu preparatu z tych roślin.
4. Antocyjany aronii i kapusty czerwonej są wchłaniane i przenikają przez barierę krew-PMR w organizmie owiec, występując w płynach fizjologicznych (osocze krwi, mocz i PMR) tych zwierząt w postaci natywnej oraz w formie ich metabolitów II fazy (glukuronowanych, metylowanych, siarczanowanych i kombinowanych pochodnych).
5. Odmienne matryce antocyjanów aronii i kapusty czerwonej powodują różnice w profilu antocyjanów i ich metabolitów II fazy w analizowanych płynach fizjologicznych.
6. W osoczu krwi i moczu owiec po spożyciu kapusty czerwonej występowały zarówno acylowane, jak i nieacylowane pochodne antocyjanów, natomiast w PMR obecne były tylko nieacylowane pochodne.
7. Antocyjany przechodzą selektywnie przez barierę krew-PMR w zależności od rodzaju i liczby podstawników oraz wielkości cząsteczki. Potencjał przekraczania bariery krew-PMR przez Cy3gal i jego metabolity II fazy był wyższy niż przez Cy3diG5G i jego metabolity II fazy.
8. Zmiany profilu i stężenia antocyjanów i ich metabolitów II fazy w PMR wynikają z wahań stężeń tych barwników we krwi, ich różnej zdolności przenikania przez barierę krew-PMR oraz przemian metabolicznych w komórkach bariery krew-PMR podczas penetracji.
9. Gromadzące się w PMR antocyjany natywne i ich metabolitów II fazy dzięki swoim właściwościom, między innymi silnym właściwościom przeciwutleniającym, mogą korzystnie oddziaływać na procesy zachodzące w szczególnie podatnym na uszkodzenia oksydacyjne środowisku centralnego układu nerwowego.

6. PIŚMIENNICTWO

Banks W.A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurology*, **2009**, 9, S3.

Charron C.S., Clevidence B.A., Britz S.J., Novotny J.A. Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2007**, 55(13), 5354-5362.

Chen T.Y., Ferruzzi M.G., Wu Q.L., Simon J.E., Talcott S.T., Wang J., Ho L., Todd G., Cooper B., Pasinetti G.M., Janle E.M. Influence of diabetes on plasma pharmacokinetics and brain bioavailability of grape polyphenols and their phase II metabolites in the Zucker diabetic fatty rat. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2017**, 61, 1700111.

Chen T.Y., Kritchevsky J., Hargett K., Feller K., Klobusnik R., Song B. J., Cooper B., Jouni Z., Ferruzzi M.G., Janle E.M. Plasma bioavailability and regional brain distribution of polyphenols from apple/grape seed and bilberry extracts in a young swine model. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2015**, 59, 2432–2447.

Chesworth J.M., Stuchbury T., Scaife J.R.. Digestion and absorption in ruminants and non-ruminants. W: Chesworth J.M., Stuchbury T., Scaife J.R. (red.), *An Introduction to Agricultural Biochemistry*. United Kingdom: Chapman & Hall, **1998**, 395–411ss.

de Pascual-Teresa, S., Sanchez-Ballesta, M.T. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochemistry Reviews*, **2008**, 7(2), 281–299.

Del Bò C.D., Ciappellano S., Klimis-Zacas D., Martini D., Gardana C., Riso P., Porrini M. Anthocyanin absorption, metabolism, and distribution from a wild blueberry-enriched diet (*Vaccinium angustifolium*) is affected by diet duration in the Sprague Dawley rat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2010**, 58(4), 2491–2497.

Faria A., Pestana D., Azevedo J., Martel F., de Freitas V., Azevedo I., Mateus N., Calhau C. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - putative involvement of GLUT2. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2009**, 53(11), 1430–1437.

Fenger J.A., Moloney M., Robbins R. J., Collins T. M., Dangles O. The influence of acylation, metal binding and natural antioxidants on the thermal stability of red cabbage anthocyanins in neutral solution. *Food & Function*, **2019**, 10(10), 6740–6751.

Fernandes I., Faria A., Calhau C., de Freitas V., Mateus N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, **2014a**, 7, 54–66

Fernandes I., Freitas V. D., Mateus N. Anthocyanins and human health: How gastric absorption may influence acute human physiology. *Nutrition and Aging*, **2014b**, 2(1), 1–14.

Fornasaro S., Zibera L., Gasperotti M., Tramer F., Vrhovšek U., Mattivi F., Passamonti S. Determination of cyanidin 3-glucoside in rat brain, liver and kidneys by UPLC/MS-MS and its application to a short-term pharmacokinetic study. *Scientific Reports*, **2016**, 6(1).

Galvano F., La Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Battistini N.C., Tavazzi B., Galvano G. Cyanidins: metabolism and biological properties. *The Journal of nutritional biochemistry*, **2004**, 15(1), 2–11.

Giuliani A., Cerretani L., Cichelli A. Colors: Properties and Determination of Natural Pigments, W: Caballero B., Finglas P.M., Toldrá F. (red.). *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, 2016, 273-283ss.

Haenlein, G. F. W., Caccese, R. Digestion. W: Haenlein G.F.W., Ace D.L. (red.). *Extension Goat Handbook*. United States: United States Department of Agriculture, **1984**, F-5ss.

Hladky S.B., Barrand M.A. Fluid and ion transfer across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. *Fluids Barriers CNS*. **2016**, 13, 19

Ichianagi T., Shida Y., Rahman M.M., Hatano Y., Konishi T. Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 6578–6587.

Ishisaka A., Ichikawa S., Sakakibara H., Piskula M.K., Nakamura T., Kato Y., Ito M., Miyamoto K.I., Tsuji A., Kawai Y., Terao J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, **2011**, 51(7), 1329–1336.

Ishisaka A., Mukai R., Terao J., Shibata N., Kawai Y. Specific localization of quercetin-3-O-glucuronide in human brain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2014**, 557, 11–17.

Kay C.D., Mazza G.J., Holub B.J. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *The Journal of nutrition*, **2005**, 135(11), 2582–2588.

Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, **2017**, 61(1), 1361779.

Kirakosyan A., Seymour E.M., Wolforth J., McNish R., Kaufman P.B., Bolling S.F. Tissue bioavailability of anthocyanins from whole tart cherry in healthy rats. *Food Chemistry*, **2015**, 171, 26–31.

Lee Y.M., Yoon Y., Yoon H., Park H.M., Song S., Yeum K.J. Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients*, **2017**, 9(10), 1089.

Lightbourn G.J., Griesbach R.J., Novotny J.A., Clevidence B.A., Rao D.D., Stommel J.R. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *Journal of Heredity*, **2008**, 99(2), 105–111.

Maestro A., Terdoslavich M., Vanzo A., Kuku A., Tramer F., Nicolin V., Micali F., Decorti G., Passamonti S. Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. *Cardiovascular Research*, **2010**, 85(1), 175–183.

Martín J., Kuskoski E.M., Navas M.J., Asuero A.G. W: Gonçalo J. (red.). Flavonoids – From Biosynthesis to Human Health. IntechOpen, **2017**.

McGhie T.K., Walton M.C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2007**, 51(6), 702–713.

Milbury P.E., Kalt W. Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood brain barrier †. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2010**, 58(7), 3950–3956.

Oliveira H., Roma-Rodrigues C., Santos A., Veigas B., Brás N., Faria A., Calhau C., de Freitas V., Baptista P.V., Mateus N., Fernandes A.R., Fernandes I. GLUT1 and GLUT3 involvement in anthocyanin gastric transport- Nanobased targeted approach. *Scientific Reports*, **2019**, 9(1).

Pan W., Kastin A.J. Why study transport of peptides and proteins at the neurovascular interface. *Brain Research Reviews*, **2004**, 46, 32–43.

Pardridge W.M. Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2012**, 32, 1959–1972.

Passamonti S. Role of the stomach in anthocyanin absorption. W: Brooks M.S., Celli G.B. (red.). Anthocyanins from natural sources: exploiting targeted delivery for improved health Great Britain. The Royal Society of Chemistry, **2019**, 216–246ss.

Passamonti S., Vrhovsek U., Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**, 296(3), 631–636.

Polak P.E., Lin S.X., Pelligrino D., Feinstein D.L. The blood–brain barrier-permeable catechol-O-methyltransferase inhibitor dinitrocatechol suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, **2014**, 276(1-2), 135–141.

Radović B., Mentrup B., Köhrle J. Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid. *British Journal of Nutrition*, **2006**, 95(6), 1171–1176.

Sakakibara H., Ogawa T., Koyanagi A., Kobayashi S., Goda T., Kumazawa S., Shimoi K. Distribution and excretion of bilberry anthocyanines in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57(17), 7681–7686.

Shimoi K., Saka N., Kaji K., Nozawa R., Kinae N. (2000). Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site. *BioFactors (Oxford, England)*, 12(1-4), 181–186.

Shimoi K., Saka N., Nozawa R., Sato M., Amano I., Nakayama T., Kinae N. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **2001**, 29(12), 1521–1524.

Skipor J., Thiery J. C. P-glycoprotein in the blood–brain barrier versus sensitivity to ivermectin. *Medycyna Weterynaryjna*, **2005**, 61, 384–386.

Spector R., Robert Snodgrass S., Johanson C.E. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, **2015**, 273, 57–68.

Suominen T., Uutela P., Ketola R.A., Bergquist J., Hillered L., Finel M., Zhang H., Laakso A., Kostiainen R. Determination of serotonin and dopamine metabolites in human brain microdialysis and cerebrospinal fluid samples by UPLC-MS/MS: discovery of intact glucuronide and sulfate conjugates. *PloS one*, **2013**, 8(6), e68007.

Taheri R., Connolly B.A., Brand M.H., Bolling B. W. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2013**, 61(36), 8581–8588.

Talavèra S., Felgines C., Texier O., Besson C., Lamaison J.L., Rémésy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *The Journal of nutrition*, **2003**, 133(12), 4178–4182.

Ullah R., Khan M., Shah S.A., Saeed K., Kim M.O. Natural antioxidant anthocyanins - a hidden therapeutic candidate in metabolic disorders with major focus in neurodegeneration. *Nutrients*, **2019**, 11(6), 1195.

Vanzo A., Vrhovsek U., Tramer F., Mattivi F., Passamonti S. Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. *Journal of Natural Products*, **2011**, 74(5), 1049–1054.

Veening J.G., Barendregt H.P. The regulation of brain states by neuroactive substances distributed via the cerebrospinal fluid, a review. *Cerebrospinal Fluid Research*, **2010**, 7, 1.

Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L., Fogliano V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides, *The Journal of Nutrition*, **2007**, 137(9), 2043–2048.

Wiczkowski W., Piskula M.K. Food flavonoids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **2004**, 54, 101–114.

Wiczkowski W., Romaszko E., Piskula M.K. Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2010**, 58(23), 12130–12136.

Wiczkowski W., Skipor J., Misztal T., Szawara-Nowak D., Topolska J., Piskula M.K. Quercetin and isorhamnetin aglycones are the main metabolites of dietary quercetin in cerebrospinal fluid. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2015**, 59(6), 1088–1094.

Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Romaszko J. The impact of red cabbage fermentation on bioavailability of anthocyanins and antioxidant capacity of human plasma. *Food Chemistry*, **2016**, 190, 730–740.

Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Topolska J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, **2013**, 51, 303–309.

Wiczkowski W., Topolska J., Honke J. Anthocyanins profile and antioxidant capacity of red cabbages are influenced by genotype and vegetation period. *Journal of Functional Foods*, **2014**, 7, 201–211.

Winter A.N., Bickford P.C. Anthocyanins and their metabolites as therapeutic agents for neurodegenerative disease. *Antioxidants (Basel)*, **2019**, 8(9), 333.

Wu X., Pittman H.E. 3rd, McKay S., Prior R.L. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *The Journal of nutrition*, **2005**, 135(10), 2417–2424.

Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 4069–4075.

Xie L., Lee S.G., Vance T.M., Wang Y., Kim B., Lee J.Y., Chun O.K., Bolling B. W. Bioavailability of anthocyanins and colonic polyphenol metabolites following consumption of aronia berry extract. *Food Chemistry*, **2016**, 211, 860–868

Yi W., Akoh C.C., Fischer J., Krewer G. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2006**, 54(15), 5651–5658.

Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Abbott N.J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine*, **2004**, 36(5), 592–604.

Youdim K.A., Dobbie M.S., Kuhnle G., Proteggente A.R., Abbott N.J., Rice-Evans C.A. Interactions between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies. *Journal of Neurochemistry*, **2003**, 85, 180–192.

Young J.F., Nielsen S.E., Haraldsdóttir J., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Crozier A., Sandström B., Dragsted L.O. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *The American journal of clinical nutrition*, **1999**, 69(1), 87–94.

Zini A., Rio, D.D., Stewart A.J., Mandrioli J., Merelli E., Sola P., Nichelli P., Serafini M., Brighenti F., Edwards C.A., Crozier A. Do flavan-3-ols from green tea reach the human brain? *Nutritional Neuroscience*, **2006**, 9(1-2), 57–61.

OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Płatosz N., Bączek N., Topolska J., Szawara-Nowak D., Skipor J., Milewski S., Wiczkowski W. 2021. Chokeberry anthocyanins and their metabolites ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Food Chemistry*, 346, 128730. DOI: [10.1016/j.foodchem.2020.128730](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128730).

Powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

Płatosz N. - 50% - Współudział w opracowaniu koncepcji badań i pobieraniu materiału biologicznego, przygotowanie materiału oraz do przeprowadzenie analiz, statystyczna analiza wyników, współudział w interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz czynnościach związanych z procesem publikacji.

Bączek N. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Topolska J. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Szawara-Nowak D. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Skipor J. - 5% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Milewski S. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Wiczkowski W. - 41% - Współudział w opracowaniu koncepcji badań i pobieraniu materiału biologicznego, nadzór merytoryczny, współudział w interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz czynnościach związanych z procesem publikacji.

Olsztyn, 12.12.2022


mgr Natalia Płatosz

Olsztyn, 12.12.2022


mgr inż. Natalia Bączek

Olsztyn, 12.12.2022


mgr inż. Joanna Topolska

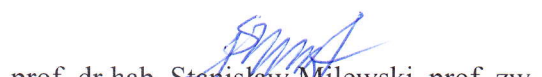
Olsztyn, 12.12.2022


dr inż. Dorota Szawara-Nowak

Olsztyn, 12.12.2022


prof. dr hab. n. wet. Janina Skipor

Olsztyn, 12.12.2022


prof. dr hab. Stanisław Milewski, prof. zw.

Olsztyn, 12.12.2022


dr hab. inż. Wiesław Wiczkowski, prof. Instytutu

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Płatosz N., Bączek N., Topolska J., Szawara-Nowak D., Misztal T., Wiczowski W. 2020. The blood-cerebrospinal fluid barrier is selective for red cabbage anthocyanins and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(31): 8274-8285. DOI: [10.1021/acs.jafc.0c03170](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03170)

Powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

Płatosz N. - 50% - Współudział w opracowaniu koncepcji badań i pobieraniu materiału biologicznego, przygotowanie materiału do analiz, przeprowadzenie analiz, przeprowadzenie statystycznej analizy wyników, współudział w interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz czynnościach związanych z procesem publikacji.

Bączek N. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Topolska J. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Szawara-Nowak D. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Misztal T. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Wiczowski W. - 46% - Współudział w opracowaniu koncepcji badań i pobieraniu materiału biologicznego, nadzór merytoryczny nad badaniami, współudział w interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz czynnościach związanych z procesem publikacji.

Olsztyn, 12.12.2022


mgr Natalia Płatosz

Olsztyn, 12.12.2022


mgr inż. Natalia Bączek

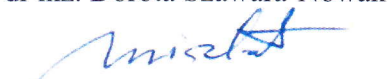
Olsztyn, 12.12.2022


mgr inż. Joanna Topolska

Olsztyn, 12.12.2022


dr inż. Dorota Szawara-Nowak

Jabłonna, 12.12.2022


prof. dr hab. Tomasz Misztal

Olsztyn, 12.12.2022


dr hab. inż. Wiesław Wiczowski, prof. Instytutu

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Płatosz N., Bączek N., Topolska J., Szawara-Nowak D., Wiczkowski W. 2022. The blood–cerebrospinal fluid barrier features different permeability to cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside and their metabolites circulating in blood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(40): 12852-12864.

DOI: [10.1021/acs.jafc.2c03778](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03778)

Powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

Płatosz N. - 42% - Współudział w opracowaniu koncepcji badań i pobieraniu materiału biologicznego, przygotowanie materiału do analiz, przeprowadzenie analiz, przeprowadzenie statystycznej analizy wyników, współudział w interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz czynnościach związanych z procesem publikacji.

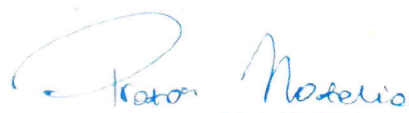
Bączek N. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Topolska J. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Szawara-Nowak D. - 1% - Współudział w pobieraniu materiału biologicznego.

Wiczkowski W. - 55% - Współudział w opracowaniu koncepcji badań i pobieraniu materiału biologicznego, nadzór merytoryczny nad badaniami, współudział w interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz czynnościach związanych z procesem publikacji.

Olsztyn, 12.12.2022


mgr Natalia Płatosz

Olsztyn, 12.12.2022


mgr inż. Natalia Bączek

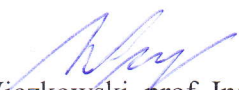
Olsztyn, 12.12.2022


mgr inż. Joanna Topolska

Olsztyn, 12.12.2022


dr inż. Dorota Szawara-Nowak

Olsztyn, 12.12.2022


dr hab. inż. Wiesław Wiczkowski, prof. Instytutu

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ