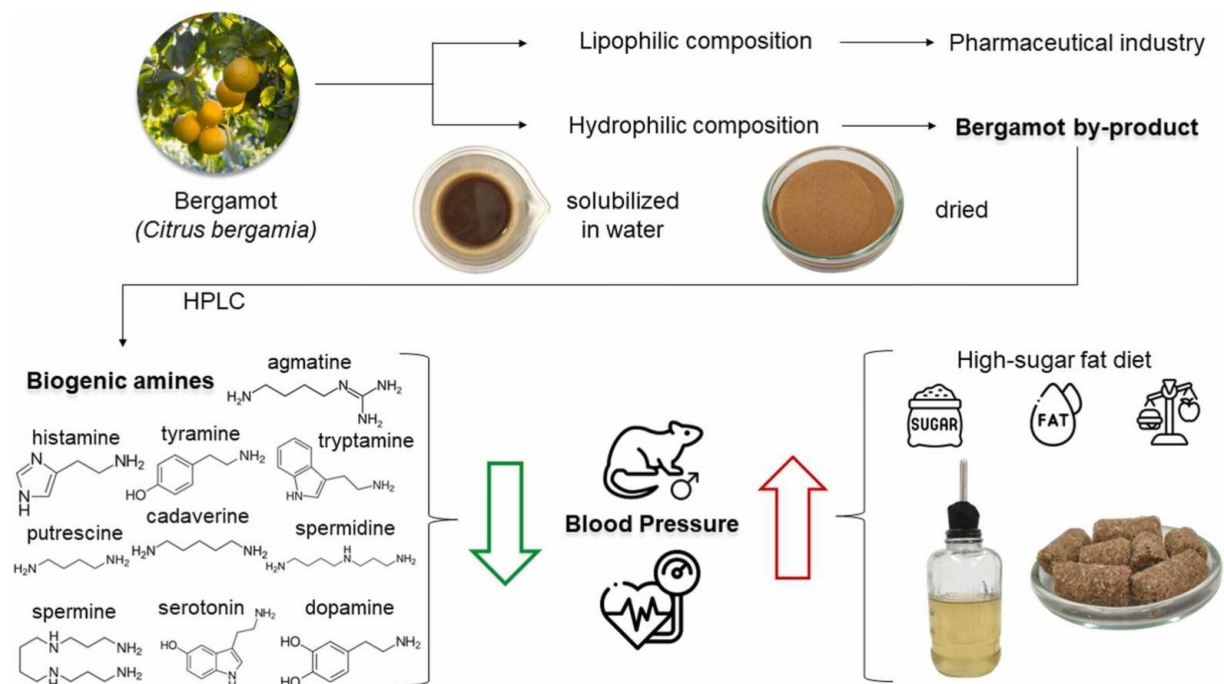


Bergamot vedľajší produkt, zdroj biogénnych amínov, znižuje hypertenziu vyvolanú diétou s vysokým obsahom cukrov a tukov

Abstrakt

Diéta s vysokým obsahom cukru (HSF) spôsobuje hypertenziu. Bergamot vedľajší produkt (BBP) je zdrojom hydrofilných bioaktívnych zlúčenín. Cieľom bolo otestovať podávanie BBP proti hypertenzii vyvolanej HSF. 48 samcov potkanov Wistar bolo rovnako rozdelených do 4 skupín: kontrolná strava (C), C+BBP, HSF a HSF+BBP. BBP (250 mg/kg) sa podával sondou počas 20 týždňov. Celkové fenolové zlúčeniny, karotenoidy a antioxidačná kapacita BBP sa hodnotili spektrofotometriou a na vyhodnotenie profilu biogénnych amínov (BAs) sa použila HPLC. Na konci experimentu sa merala telesná hmotnosť (BW), kalorický príjem, hladiny glukózy, aktivita superoxiddismutázy a systolický krvný tlak (SBP). Výsledky ukázali, že BBP je dobrým zdrojom bioaktívnych zlúčenín, ako sú fenolové zlúčeniny ($15 \pm 2,1$ μg ekvivalentov kyseliny galovej/mg, ww) a flavonoidov ($5,09 \pm 0,22$ μg ekvivalentov kvercetínu/mg, ww), a má vysokú antioxidačnú kapacitu ($5,35 \pm 0,06$ μg troloxových ekvivalentov (TE)/mg, ww; $1,30 \pm 0,14$ μg TE/mg a $2,54 \pm 0,31$ mM FeSO₄/mg), tromi rôznymi metódami). BBP obsahuje BA histamín ($28,4 \pm 3,1$ $\mu\text{g/g}$, ww), tyramín ($6,39 \pm 0,39$ $\mu\text{g/g}$, ww), tryptamín (186 ± 11 $\mu\text{g/g}$, ww), putrescín ($29,0 \pm 4,4$ $\mu\text{g/g}$, ww), kadaverín ($10,6 \pm 0,8$ $\mu\text{g/g}$, ww), spermidín ($34,8 \pm 4,3$ $\mu\text{g/g}$, ww), spermin ($2,28 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$, ww), serotonin ($4,46 \pm 0,77$ $\mu\text{g/g}$, ww) a dopamín ($2,50 \pm 0,29$ $\mu\text{g/g}$, ww) a agmatín (140 ± 10 $\mu\text{g/g}$, ww). BBP má pozoruhodné hladiny antioxidačných BA, ako je spermidín ($34,8 \pm 4,3$ $\mu\text{g/g}$, ww) a agmatín (140 ± 10 $\mu\text{g/g}$, ww). HSF zvýšila telesnú hmotnosť (532 ± 72 g oproti 474 ± 36 g (C), $p < 0,001$), hladiny glukózy ($91,4 \pm 6,2$ mg/dl oproti $80,9 \pm 7,1$ mg/dl (C), $p < 0,001$) a SBP (146 ± 9 mmHg VS 121 ± 5 mmHg (C), $p < 0,001$). BBP znížil hypertenziu generovanú HSF (133 ± 9 mmHg VS 146 ± 9 mmHg, $p < 0,001$), čo naznačuje priamy hypotenzívny účinok. Synergia medzi bioaktívnymi zlúčeninami identifikovanými v BBP demonštruje veľký potenciál na použitie na prevenciu a liečbu hypertenzie.



Úvod

Konzumácia HSF, nezdravej stravy, podporuje oxidačný stres a metabolické poruchy, zvyšuje telesnú hmotnosť, hladiny glukózy a hladiny krvného tlaku, čo vedie k hypertenzii. Hypertenzia postihuje viac ako 30 % dospelých a je celosvetovo hlavnou príčinou kardiovaskulárnych ochorení a predčasných úmrtí. Globálny priemerný krvný tlak stále rastie v dôsledku rozšíreného používania antihypertenzív. Okrem nízkej adherencie k medikamentóznej liečbe má hypertenziu pod kontrolou len asi 20 % pacientov užívajúcich lieky, preto je potrebné zaviesť stratégie na prevenciu a kontrolu hypertenzie.

Niektoré druhy ovocia a ich vedľajšie produkty, ako sú citrusové plody, majú terapeutické vlastnosti vďaka značnému množstvu antioxidantných zlúčenín. Bergamot (*Citrus bergamia*) je ovocie pestované takmer výlučne v južnom Taliansku (25 000 ton/rok), predovšetkým pre priemysel esenciálnych olejov, ktorý ročne vyprodukuje 25 miliárd EUR. Šťava a dužina sú priemyselným BBP a predstavujú zdroj fenolových zlúčenín, vitamínov, minerálov a iných antioxidantných zlúčenín, ako sa nedávno uvádzalo.

Zahrnutie citrusových plodov do stravy zvyšuje príjem antioxidantných zlúčenín, ako sú fenolové zlúčeniny, karotenoidy a biogénne amíny (BA). Tieto molekuly pôsobia ako lapače radikálov a priamo alebo nepriamo môžu pomôcť kontrolovať niekoľko ochorení znížením infiltrácie zápalových buniek, oxidačného stresu a koncentrácií lipidov v plazme, zlepšením mitochondriálnej funkcie a biologickej dostupnosti oxidu dusnatého. Príjem flavonoidov bol spojený s nižším rizikom ischemickej cievnej mozgovej príhody a môže pomôcť znížiť krvný tlak (napr. luteolín, kvercetín, hesperidín a naringenín). Citrusové plody obsahujú vysoké množstvo fenolových zlúčenín. V oranžovej farbe „Washington pupok“ Multari a kol. (2020) popisali najvyššie obsahy fenolových zlúčenín v albede ($10\,910 \pm 320 \text{ mg kg}^{-1}$), kým Elkhatim et al. (2018) zistili nižšie hodnoty v odpadových častiach pomaranča, citrónu a grapefruitu. Zmeny v obsahu týchto bioaktívnych látok sa môžu vyskytnúť v závislosti od analyzovaného tkaniva, ako aj od času zberu a iných faktorov kultivácie a pozberu.

Karotenoidy sú tiež schopné udržiavať normálny krvný tlak v normálnom rozmedzí, ako opísali Wolak et al. (2019) s použitím 15 alebo 30 mg lykopénu extrahovaného paradajkami. Naproti tomu syntetický lykopén podobný účinok nepreukázal. Vo flavede citrusových plodov v úplnej zrelosti dosahuje obsah celkových karotenoidov 12,6 mg/100 g čerstvej hmotnosti (FW), kým v dužine je obsah 1,4 mg/100 g FW. Keďže ide o všadeprítomnú látku, BA sa vyskytujú v citrusoch v premenlivom množstve v závislosti od pestovania, zberu a pozberových úprav. V pomarančovom džúze Preti a kol. (2016) okrem serotonínu a histamínu zistili putrescín ako prevládajúci amín (45,5 mg/l) a spermidín a spermin. Putrescín je amín, ktorý sa vyskytuje vo vyšších koncentráciách, zatiaľ čo histamín vykazuje nižšie hladiny (do 0,26 mg/l) (Basheer et al., 2011). Keďže BBP obsahuje fytochemikálie, táto štúdia analyzovala antioxidantný potenciál vrátane fenolových zlúčenín a karotenoidov, ako aj profil BBP BAs. Preto vzhľadom na potrebu zlepšenia bol BBP kŕmený nezdravou stravou (HSF) potkanom, aby sa overilo, či tieto zlúčeniny môžu pomôcť znížiť hypertenziu.

Materiál a metódy

BBP bol vyrobený na priemyselnej úrovni spoločnosťou AKHYNEX srl, (Polistena, RC, Taliansko) a bude komerčne dostupný pod obchodným názvom Endo@berg od AKHYNEX a KALITA® od Giellepi SpA Miláno, Taliansko.

Celkové fenolové zlúčeniny, celkové flavonoidy, karotenoidy a antioxidantná aktivita

Ako opísali Belin a kol. (2021) sa BBP zriedil v MeOH:voda:kyselina fosforečná (80:1:19 v/v/v). Po sonikácii počas 30 minút a odstredení počas 10 minút pri 6000 xg sa pomocou

supernatantu stanovili celkové fenolové zlúčeniny, celkové flavonoidy a antioxidačná aktivita pomocou DPPH, FRAP a ABTS.

Analýza celkových fenolových zlúčenín sa uskutočnila s použitím Folin-Ciocalteauovho činidla, ako je opísané v Singleton & Rossi (1965) a výsledky boli vyjadrené v ug ekvivalentoch kyseliny galovej (GAE)/mg. Analýza celkového flavonoidu sa uskutočnila tak, ako je opísané v Popova et al. (2005) s úpravami. V stručnosti, 4 ml BBP sa zmiešali s 1 % obj./obj. okysleným metanolovým roztokom a zmes sa pretrepávala (1 min) a nasledovala sonikácia (25 °C, 30 min). Pridal sa jeden mililiter (1 ml) 5 % obj./obj. roztoku chloridu hlinitého a zmes sa pretrepala na vortexe a udržiavala sa v tme počas 30 minút. Po centrifugácii počas 10 minút pri 6000 xg sa merala absorbancia pri 425 nm. Celkový obsah flavonoidov bol vyjadrený ako µg ekvivalentov kvercetínu (QE)/mg.

Schopnosť BBP redukovať radikály 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) a 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfónová) (ABTS) bola analyzovaná tak, ako je opísané v Brand-Williams et al. (1995) a Re a kol. (1999) a výsledky boli vyjadrené ako µg ekvivalenty Troloxu (TE)/mg. Antioxidačná kapacita testu Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) sa uskutočnila tak, ako opísali Benzie & Strain (1996) s použitím čerstvého FRAP činidla (300 nM acetátový pufo, pH 3,6; 2,5 ml 10 mM 2,4,6 -tris(2-pyridyl)-5-triazín [TPTZ] v 40 mM HCl, 2,5 ml roztoku FeCl₃) a výsledky boli vyjadrené v mM FeSO₄/mg.

Celkové karotenoidy

Celkové karotenoidy (TC) boli stanovené tak, ako to opísal Lichtenthaler (1987) s malými úpravami. BBP sa dvakrát extrahoval 80 % acetónom, premiešal sa a sonikoval počas 30 minút. Extrakty sa spojili a centrifugovali pri 6000 x g. Absorbancia supernatantu sa merala pri 450 nm, 646 nm a 663 nm, aby sa určil celkový obsah karotenoidov, a výsledky sa vyjadrili v ug/mg (w/w).

Biogénny amínový profil pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC)

V stručnosti, BA boli extrahované tak, ako je opísané v Borges et al. (2019) takto. BBP (100 mg) sa zmiešal s 3000 ul studenej kyseliny chloristej s koncentráciou 5 % (v/v). Potom sa zmes centrifugovala pri 3800 g (Hettich Zentrifugen, Mikro220R) počas 20 minút pri 4 °C a k supernatantu sa pridala dansylchlorid a nasýtený uhličitan sodný (2 M). Po inkubácii počas 1 hodiny pri 60 °C sa k zmesi pridalo 200 ul prolínu a zmes sa udržiavala v tme počas 30 minút pri teplote miestnosti. K tejto zmesi sa pridalo 1000 ul toluénu, takmer homogenizovaného, a supernatant sa vysušil pod plynným dusíkom. Vzorky sa resuspendovali v acetonitrile a 20 ul sa vstrekl do systému HPLC (Dionex UltiMate 3000; Thermo Fisher Scientific, Brémy, Nemecko) vybaveného kvartérnym čerpadlom, automatickým vzorkovačom 3000, detektorom diódového poľa (DAD-3000) a ACE C18 kolóna (4,6 x 250 mm; 5 µm) pri 25 °C. Analýza sa monitorovala pri 280 nm a integračný pík a kalibrácie sa uskutočnili medzi 210 a 350 nm pomocou softvéru Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, Brémy, Nemecko). Chromatografický gradient sa nastavil na zmes rozpúšťadiel (A) 100 % acetonitril a (B) 50 % acetonitril nasledovne: 0–2 minúty, 40 % A + 60 % B; 2–4 minúty, 60 % A + 40 % B; 4–8 min, 65 % A + 35 % B; 8–12 min, 85 % A + 15 % B; 12–15 min, 95 % A + 5 % B; 15–21 min, 85 % A + 15 % B; 21–22 min, 75 % A + 25 % B; 22–25 minút, 40 % A + 60 % B. Množstvo každého BA (agmatín, serotonín, dopamín, histamín, tyramín, tryptamín, putrescín, kadaverín, spermidín a spermín) sa vypočítalo porovnaním plôch píkov so štandardmi, a plocha pod krivkou získaná pomocou kalibračných kriviek a vyjadrená v µg/g (w/w).

Experimentálny protokol a charakterizácia skupín

Samce potkanov Wistar s 21 dňami (± 185 g) získané z Animal Center of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP, Botucatu, SP, Brazília) boli náhodne rozdelené

do štyroch skupín (n = 12 na skupinu): kontrolná strava (C), C + BBP, diéta s vysokým obsahom cukru a tuku (HSF) a HSF + BBP počas 20 týždňov, ako už bolo opísané. BBP sa podával sondou (250 mg/kg/deň). Použitým vozidlom bola voda. HSF bol vypracovaný na Experimental Research Unit (UNIPEX) na Botucatu Medical School. Táto strava obsahovala sójovú múčku, cirok, sójovú kôru, dextrín, sacharózu, fruktózu, bravčovú masť, minerály a soľ. HSF skupiny tiež dostali 25% sacharózu v pitnej vode, zatiaľ čo normálna pitná voda bola podávaná C potkanom bez akéhokoľvek prídania. Diétny model tohto experimentu bol založený na štúdií Francisquetiho a kol. (2017). Zvieratá boli umiestnené v individuálnych klietkach pri kontrolovanej teplote (22 ± 3 °C), svietivosti (12 h cyklus svetlo/tma), vlhkosti (60 ± 5 %) a dostávali krmivo a voľnú vodu *ad libitum*. Skupiny C a HSF dostali vehikulum (vodu) sondou. Experimenty a postupy boli schválené Výborom pre etiku zvierat Lekárskej fakulty Botucatu (číslo protokolu CEUA-1137). Uskutočnili sa podľa príručky National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals a riadili sa usmerneniami ARRIVE.

Analýza nutričného a biochemického profilu

Nutričný profil bol hodnotený podľa kalorického príjmu a telesnej hmotnosti. Príjem potravy a vody sa vypočítal denne z jednotlivých zvyškov každého zvieratá a kalorický príjem sa určil vynásobením energetickej hodnoty každej stravy (g \times Kcal) príjmom potravy. V prípade skupiny HSF zahŕňala aj kalórie z vody (spotrebované $0,25 \times 4 \times$ ml). Telesná hmotnosť zvieratá sa vyhodnocovala týždenne. Po 8 hodinách hladovania sa koncentrácia glukózy stanovila pomocou glukometra (Ac-cu-Chek Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

Aktivita superoxidodismutázy v srdcovom tkanive

Aktivita superoxidodismutázy (SOD) srdcového tkaniva bola meraná na základe inhibície reakcie superoxidových radikálov s pyrogallolom spektrofotometriou pri 420 nm. Výsledky boli vyjadrené v pmol SOD/mg proteínu/min.

Systolický krvný tlak

Hodnotenie SBP bolo hodnotené u potkanov pri vedomí neinvazívnou metódou manžety na chvoste s NarcoBioSystems® Electro-Sphygmomanometer (International Biomedical, Austin, TX, USA) na konci 20 týždňov, ako je opísané. V pilotnej štúdií sa zistilo, že tento diétny model vyvolal systolickú arteriálnu hypertenziu po 1 mesiaci experimentu a toto zvýšenie sa udržalo až 30 týždňov. Zvieratá boli držané v drevenej krabici (50 cm \times 40 cm \times 30 cm) pri teplote 38 až 40 °C počas 4–5 minút, aby sa stimulovala arteriálna vazodilatácia. Po tomto postupe bola na chvost každého zvieratá pripevnená manžeta s pneumatickým snímačom pulzu. Manžeta sa nafúkla na tlak 200 mmHg a následne sa vyfúkla. Hodnoty krvného tlaku boli zaznamenané na polygrafe Gould RS 3200 (Gould Instrumental, Valley View, OH, USA). Pre každé zviera sa zaznamenal priemer troch odčítaní tlaku.

Štatistická analýza

Údaje sú prezentované ako priemer \pm štandardná odchýlka. Rozdiely medzi skupinami boli stanovené dvojcestnou ANOVA s Tukeyho post hoc testom. Štatistické analýzy sa uskutočnili pomocou SigmaStat pre Windows verzie 3.5. (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Za štatisticky významnú sa považovala p-hodnota $< 0,05$.

Výsledky a diskusia

BBP je dobrým zdrojom bioaktívnych zlúčenín, ako sú fenolové zlúčeniny, ktorých profil je široko charakterizovaný, a karotenoidy, ktoré majú antioxidačnú kapacitu. V tejto štúdiu boli celkové fenolové zlúčeniny BBP prehodnotené spektrofotometriou vzhľadom na to, že táto metodológia, napriek tomu, že je menej špecifická, je stále dobre akceptovaná a ľahko dostupná. Vzhľadom na to, že BBP sa získava bez šupky, hladiny týchto antioxidantov sú v súlade s hladinami opísanými v literatúre pre dužinu a semená. Celkový obsah fenolových zlúčenín v BBP ($15 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$) bol blízky obsahu v odpadových častiach (dužina a semená) pomarančového ovocia. Avšak celkový obsah flavonoidov ($5,1 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$) bol nižší, ako popísali autori (približne $40 \text{ mg}/\text{g}$ (w/w)). Obsah polyfenolov v citrusových plodoch sa okrem iných biotických a abiotických faktorov môže líšiť v závislosti od analyzovaného tkaniva, doby vývinu/zberu a pozberovej úpravy. Plody bergamotu môžu vykazovať vysoký obsah flavonoidov až $438 \text{ mg}/100 \text{ g}$ naringínu. BBP vykázala nižšie hodnoty v porovnaní s inými štúdiami, ktoré používali čerstvé ovocie a rôzne pletivá, kultiváciu a metódy prípravy. Okrem fenolových zlúčenín BBP predstavoval karotenoidy ($0,07 \mu\text{g}/\text{mg}$). V bergamotovom vedľajšom produkte Siano a kol. (2023) zistili $0,61 \text{ mg}/\text{kg}$ celkových karotenoidov, zatiaľ čo iné štúdie popisujú obsah karotenoidov medzi $1,44$ a $4,69 \text{ mg}/100 \text{ g}$ pre mandarínky v závislosti od analyzovaného kultivaru. Všetky tieto zlúčeniny ovplyvňujú antioxidačnú aktivitu BBP, meranú prostredníctvom DPPH ($5,4 \mu\text{g TE}/\text{mg}$), ABTS ($1,3 \mu\text{g TE}/\text{mg}$) a FRAP ($2,5 \text{ mM FeSO}/\text{mg}$).

Celkové fenolové zlúčeniny, celkové flavonoidy, celkové karotenoidy a celková antioxidačná kapacita v bergamotovom vedľajšom produkte.

Rozhodnosť	Hodnota
Celkové fenolové zlúčeniny ($\mu\text{g GAE}/\text{mg}$)	$15,0 \pm 2,1$
Celkové množstvo flavonoidov ($\mu\text{g QE}/\text{mg}$)	$5,09 \pm 0,22$
Celkové karotenoidy ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$0,07 \pm 0,01$
Celková antioxidačná kapacita	
cez DPPH ($\mu\text{g TE}/\text{mg}$)	$5,35 \pm 0,06$
cez ABTS ($\mu\text{g TE}/\text{mg}$)	$1,30 \pm 0,14$
cez FRAP ($\text{mM FeSO}/\text{mg}$)	$2,54 \pm 0,31$

*GAE: ekvivalenty kyseliny galovej; QE: ekvivalenty kvercetínu; TE: Ekvivalenty troloxu.

HSF zvýšil telesnú hmotnosť, kalorický príjem a hladinu glukózy v krvi. Hoci BBP je zlúčenina odvodená z bergamotu a bola opísaná ako zdroj flavonoidov s antioxidačným účinkom; nezabránilo týmto nutričným a biochemickým zmenám generovaným HSF.

Nutričný profil a aktivita superoxiddismutázy v srdcovom tkanive potkanov Wistar kŕmených diétou s vysokým obsahom cukru a tuku, ktorým bol podávaný bergamotový vedľajší produkt.

Variabilné	skupiny			
	C	C + BBP	HSF	HSF + BBP
Telesná hmotnosť (g)	474 ± 36	473 ± 67	532 ± 72^a	512 ± 59
Kalorický príjem (kcal/d)	97 ± 7	99 ± 14	111 ± 13^a	106 ± 14
Glukóza v krvi (mg/dl)	$80,9 \pm 7,1$	$83,2 \pm 9,5$	$91,4 \pm 6,2^a$	$92,6 \pm 8,5^d$
SOD (pmol/mg proteínu/minútu)	109 ± 21	97 ± 22	113 ± 31	89 ± 21^b

* Údaje uvedené ako priemer \pm štandardná odchýlka a podrobené dvojcestnej ANOVA s Tukeyho post hoc ($p < 0,05$). a = C vs HSF; b = HSF verzus HSF + BBP; c = C vs C + BBP; d = C + BBP oproti HSF + BBP. C = kontrolná diéta; BBP = bergamotový vedľajší produkt; HSF = diéta s vysokým obsahom cukru a tukov; SOD = aktivita superoxiddismutázy v srdcovom tkanive.

V tejto štúdii sme pozorovali zvýšenie telesnej hmotnosti, ako aj hladiny glukózy v krvi. Je pozoruhodné, že HSF je bohatý na tuk zo živočíšnych zdrojov a cukor, ktoré sú metabolizované enzýmami, ako je pankreatická lipáza a enzýmami súvisiacimi s glykolytickou cestou. Aj keď v literatúre existuje popis, že bergamot obsahuje flavonoidy, ktoré môžu pôsobiť ako hypoglykemické, pridanie BBP do skupiny HSF nebolo účinné pri znižovaní hladín glukózy v krvi v súlade s inou štúdiou, ani úroveň kalorického príjmu. Čo sa týka systolického krvného tlaku, bolo pozorované, že HSF diéta podporuje zvýšenie hladín. Pri porovnaní skupín HSF a HSF+BBP sa pozoroval pokles hladín krvného tlaku, čo ukazuje, že študovaná zlúčenina bola účinná pri prevencii hypertenzie vyvolanej konzumáciou HSF. Štúdie ukázali, že extrakt z bergamotovej šľavy má pozitívny vplyv na hladinu glukózy, faktory, ktoré môžu prispieť k regulácii krvného tlaku. Tieto účinky sa pripisujú bioaktívnym zlúčeninám prítomným v tomto ovocí, navyše je možné predpokladať, že tieto zlúčeniny môžu určitým spôsobom pôsobiť aj na nejaký mechanizmus, ktorý reguluje krvný tlak. V bergamote bolo zistených niekoľko flavonoidov, okrem iného hesperidín a naringenín a určite sú súčasťou celkových fenolov a celkových flavonoidov prítomných v BBP, čo mohlo ovplyvniť hladiny krvného tlaku.

Keďže existuje rozdiel vo fenolickej polarite, BBP sa zriedil vo vode na podávanie potkanom Wistar sondou, čím sa podporila najlepšia biologická dostupnosť a biologická dostupnosť hydrofilných zlúčenín, ako sú flavonoidy, naringenín a hesperidín a BA. Štúdie ukazujú, že pridanie hesperidínu a naringenínu do stravy pre spontánne hypertenzné potkany so sklonom k mozgovej príhode (SHRSP) významne nezmenilo telesnú hmotnosť, ale zlepšilo krvný tlak. Tento jav bol tiež pozorovaný v tejto štúdii s podávaním BBP skupine HSF. Naringin, zistený aj v bergamote, normalizoval systolický krvný tlak a zlepšil vaskulárnu dysfunkciu a ventrikulárnu diastolickú dysfunkciu u potkanov s vysokým obsahom sacharidov a tukov. Tieto priaznivé účinky naringínu môžu byť sprostredkované zníženou infiltráciou zápalových buniek, zníženým oxidačným stresom, nižšími koncentraciami lipidov v plazme a zlepšenou mitochondriálnou funkciou pečene u potkanov.

Priaznivý účinok flavonoidov možno pripísať zmenám v obsahu oxidu dusnatého (NO). Oxid dusnatý je signálna molekula, ktorá sa viaže na redoxne aktívne kovy a nadbytok aj nedostatok ovplyvňujú metabolizmus vrátane kardiovaskulárnych ochorení. Nízke hladiny NO môžu súvisieť s kardiovaskulárnymi ochoreniami, ako je ateroskleróza a hypertenzia, zatiaľ čo vysoké hladiny NO modulované NO syntázou súvisia okrem iného s bunkovým zápalom, hypotenziou a inhibíciou mitochondriálneho dýchania. Flavonoidy môžu pôsobiť ako prooxidanty alebo antioxidanty v závislosti hlavne od hladiny kyslíka a pH média. Pri nízkej hladine O₂ a kyslejšom pH flavonoidy zachovávajú NO a zvyšujú ich biologickú aktivitu. Na druhej strane, pri vysokých hladinách kyslíka a alkalickom pH môžu flavonoidy zachytávať NO, čo má prooxidačný účinok. V médiu s vysokými hladinami O₂, aj pri vysokej aktivite superoxidodismutázy (SOD), môže dochádzať k tvorbe peroxydusitanu (ONOO⁻), oxidačného druhu, ktorý prispieva k cievnyim ochoreniam, zápalom, bolestiam, neurodegenerácii, zníženiu dopamínu (spojené s Parkinsonovou chorobou), okrem iného. V našej štúdii bola aktivita SOD nižšia, keď boli potkany kŕmené HSF + BBP, čo môže naznačovať pozitívny účinok kombinácie BBP s diétou, to znamená, že jeden z účinkov možno pripísať poklesu ONOO⁻, súvisiaci s oxidačným stresom.

Ďalšou zlúčeninou prítomnou v BBP, hoci v malých množstvách v porovnaní s fenolickými zlúčeninami, boli karotenoidy s polárnymi chemickými charakteristikami, pretože produkt bol získaný z hydrofilnej časti ovocia. Je pozoruhodné, že metodika použitá na detekciu karotenoidov neumožňovala identifikáciu, iba množstvo. Toto však nebolo obmedzenie, pretože cieľom tejto štúdie bolo synergicky pristupovať k pôsobeniu všetkých bioaktívnych zlúčenín prítomných v BBP. Karotenoidy môžu pôsobiť ako protizápalové látky a

antioxidanty, faktory, ktoré môžu modulovať hladiny krvného tlaku. Čo sa týka polárnejších karotenoidov, štúdia uskutočnená s diabetikmi ukázala, že suplementácia astaxantínom zlepšila lipidový profil a znížila krvný tlak. V tejto štúdii sa však neskúmal žiadny mechanizmus, takže toto zlepšenie bolo pripísané protizápalovému účinku, potvrdenému zvýšením cirkulujúcich hladín adiponektínu. Okrem zápalu zohráva úlohu oxidačný stres aj v patológii hypertenzie spojenej so zvýšenou produkciou prooxidantov, ako je superoxidový anión peroxid vodíka, zníženou syntézou NO a zníženou biologickou dostupnosťou antioxidantov. Zistilo sa, že oxidačný stres súvisí s endoteliálnou dysfunkciou, zápalom, hypertrofiou, apoptózou, migráciou buniek, fibrózou a angiogenezou pri vaskulárnej prestavbe hypertenzie. Na základe toho môžeme prisúdiť, že vďaka antioxidaçnej aktivite BBP meranej pomocou testov DPPH, ABTS a FRAP môže BBP pôsobiť ako vycytávač radikálov, čo môže prispievať k zníženiu hladín krvného tlaku pozorovaných v tejto štúdii. Spomedzi bioaktívnych zlúčenín, ktoré tvoria rastlinnú potravu, okrem flavonoidov a karotenoidov, môže BA, prítomný vo všetkých bunkách, ovplyvňovať metabolizmus a pôsobiť ako antioxidant, sprostredkujúci zápalové procesy. BBP má pozoruhodnú koncentráciu BA (444 µg/g). Profil BAs BBP sa skladá z agmatínu, serotonínu, dopamínu, histamínu, tyramínu, tryptamínu, putrescínu, kadaverínu, spermidínu a spermínu. Vzhľadom na dôležitosť poznania profilu BA v potravinárskych výrobkoch uvádzame po prvýkrát profil BA v BBP. Niekoľko biogénnych amínov bolo opísaných pre ich ochranný účinok na membrány, pôsobia ako antioxidanty a pomáhajú znižovať zápal spôsobený oxidačným stresom.

Biogénny aminový profil vedľajšieho produktu bergamotu.

Biogénny amín	Koncentrácia (µg/g)
Histamín	28,4 ± 3,1
tyramín	6,39 ± 0,39
tryptamín	186±11
Putrescine	29,0 ± 4,4
kadaverín	10,6 ± 0,8
Spermidín	34,8 ± 4,3
Spermie	2,28 ± 0,25
Serotonín	4,46 ± 0,77
dopamín	2,50 ± 0,29
Agmatine	140±10

*Údaje uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka.

BBP vyniká hladinami agmatínu (140 µg/g, biogénneho amínu považovaného za lapač voľných radikálov, s cytoprotektívnym účinkom vďaka ochrane mitochondrií pred oxidačným stresom, ktorý podporuje spomalenie apoptotickej bunkovej smrti. BBP môže predstavovať zaujímavý zdroj agmatínu, pretože podľa Morettiho et al. (2015) príjem 0,0001 – 1 mg/kg môže mať antidepresívny účinok, prispievať k redukcii symptómov súvisiacich s Parkinsonovou chorobou. Okrem agmatínu boli v BBP nájdené aj serotonín (4,46 µg/g) a dopamín (2,5 µg/g). Serotonín, napriek tomu, že neprechádza účinne hematoencefalickou bariérou, je opísaný ako antioxidant a podieľa sa na metabolickej regulácii a niektorých dôležitých fyziologických procesoch súvisiacich s chuťou do jedla, spánkom, náladou, úzkosťou a krvným tlakom. Dopamín, neurotransmitter s vysokou antioxidaçnou aktivitou, sa spolu so serotonínom podieľa na odmeňujúcich účinkoch potravy a existujú hypotézy, že zvýšená chuť do jedla u obéznych ľudí je spôsobená zmenami v centrálnom systéme dopamínu a serotonínu. Napriek tomu, že hladiny serotonínu a dopamínu zistené BBP sú

nižšie ako hladiny opísané pre niektoré druhy ovocia a zeleniny, môže byť zaujímavým zdrojom týchto neurotransmiterov pre budúce štúdie s obezitou a zlepšením fyzickej kondície. Hladiny niektorých biogénnych amínov sú dôležitými faktormi na zistenie kvality potravín a bezpečnosti, najmä histamínu a tyramínu. Vysoké hladiny histamínu môžu okrem iného ovplyvniť krvný tlak, ako aj vyvolať edémy, kožné vyrážky a migrény. Jeho hypotenzívny účinok súvisí so znížením objemu krvi a považuje sa za vazodilatátor. V BBP je obsah histamínu 28,4 µg/g pod úrovňou, ktorá sa považuje za toxickú (50 mg/100 g), ale okrem toho, že je priaznivá, môže prispieť k zistenému výsledku.

Ďalší biogénny amín – tyramín, by sa mal zväziť vzhľadom na jeho vzťah k krvnému tlaku, okrem iných škodlivých účinkov na telo, ako sú okrem iného búšenie srdca, nevoľnosť a vracanie. Obsah tyramínu v BBP (6,39 µg/g, je pod „hladinou bez pozorovaných nepriaznivých účinkov“ (NOAEL) (200 mg na jedlo, žena s hmotnosťou 60 kg). Tyramín aj histamín sú monoamíny, ktoré sú oxidované monoaminoxidázami (MAO; EC 1.4.3.4), zvyčajne v čreve a u ľudí, ktorí konzumujú inhibitory aminooxidázy (mono a diaminoxidáza – MAOI/DAOI), alkohol, s gastrointestinálnymi problémami a nedostatkom z týchto enzýmov, môže vykazovať príznaky otravy histamínom alebo tyramínom. Stanovenie obsahu oboch amínov v BBP má teda veľký význam na preukázanie bezpečnosti jeho konzumácie.

Okrem toho, že histamín a tyramín podporujú metabolické zmeny, keď sa užívajú vo väčšom množstve, ako sa odporúča, tryptamín môže vďaka svojmu vazokonstrikčnému pôsobeniu vyvolať aj zmeny krvného tlaku a vyvolať hypertenziu. Hladiny tohto biogénneho amínu však nie sú regulované. V testovanom produkte (BBP) je obsah tryptamínu 186 µg/g, zatiaľ čo v paradajkách dosahujú hladiny 147,1 µg/g a v čakanke 0,8 µg/g. Hoci NOAEL pre tryptamín ešte nebol dobre stanovený, určenie jeho obsahu je rozhodujúce, pretože tento amín môže zvýšiť škodlivý účinok histamínu a tyramínu. Pri konzumácii BBP neboli pozorované žiadne nepriaznivé účinky, ako je vracanie alebo hnačka.

V ovocí a zelenine je bežné nájsť vysoké hladiny putrescínu. Napríklad v pomarančovom džúse Preti a spol. (2016) zistili putrescín ako prevládajúci amín (45,5 mg/l) popri spermidíne, spermíne, serotoníne a histamíne. Iné štúdie tiež ukazujú, že putrescín je amín, ktorý sa vyskytuje vo vyšších koncentráciách, ako opísali Basheer et al. (2011) a histamín vykazuje nižšie hladiny (do 0,26 mg/l). Putrescín a kadaverín sú diamíny súvisiace s mikrobiálnou kontamináciou a súvisia s bezpečnosťou potravín. V BBP sú hladiny putrescínu 29 a kadaverínu 10,6 µg/g. Hoci sa uskutočnilo len málo štúdií na ľuďoch, u potkanov Wistar bola stanovená „hladina nepozorovaných nepriaznivých účinkov“ (NOAEL) 2 000 ppm (180 mg/kg telesnej hmotnosti/deň) pre putrescín aj kadaverín. Oba amíny môžu tiež zosilniť toxický účinok histamínu a tyramínu.

Spermidín (34,8 µg/g) a spermín (2,28 µg/g) boli detegované v BBP a môžu pôsobiť ako antioxidanty. Hoci niektoré štúdie ukazujú, že sa podieľajú na regulácii transkripcie DNA, translácie RNA, biosyntézy proteínov a úprave imunitnej odpovede, tieto BA môžu viesť k akútnemu zníženiu krvného tlaku, okrem toho, že súvisia s karcinogenezou, inváziou nádorov a metastázami. Mierna konzumácia spermidínu (0,05 % celkového denného príjmu dusíka) však môže byť dôležitá pri liečbe traumy z dôvodu zlepšenia absorpcie proteínov. Putrescín, kadaverín, histamín, tyramín, spermidín a spermín možno použiť ako index kvality, ktorý je dôležitý pre overovanie bezpečnosti potravín. IQ BBP vykazuje hodnotu 1,79, čo je nad takzvanou prijateľnou hranicou, ktorú možno pripísať vyšším hodnotám histamínu a putrescínu, napriek tomu, že ho viaceré štúdie považujú za tolerovateľné a bezpečné. Teda, hoci IQ bolo vyššie ako IQ opísané v iných štúdiách s jedlom, hladiny každého amínu jednotlivo neprekračujú to, čo je povolené niektorými orgánmi. Po podaní BBP neboli u zvierat pozorované žiadne nepriaznivé účinky.

Vzhľadom na synergický hypotenzívny účinok BBP by sa mohol uskutočniť budúci výskum hodnotiaci účinky biogénnych amínov nachádzajúcich sa v BBP, izolovaných alebo navzájom kombinovaných, na cievne a srdcové tkanivo zvierat s metabolickými poruchami, vyvolanými alebo nespôsobenými nezdravou stravou.

Záver

BBP má značné množstvo fenolových zlúčenín, flavonoidov a antioxidačnú kapacitu prostredníctvom DPPH, ABTS a FRAP a má nízke hladiny karotenoidov. Okrem toho bol po prvýkrát opísaný biogénny amínový profil *Citrus bergamia*. Toto ovocie obsahuje histamín, tyramín, tryptamín, putrescín, kadaverín, spermidín, spermín, serotonín, dopamín a agmatín. Hoci BBP má vysoké hladiny histamínu a tryptamínu, hladiny týchto zlúčenín neprekračujú bezpečné hladiny a nevyvolávajú nepriaznivé účinky u zvierat. BBP má pozoruhodné hladiny antioxidačných biogénnych amínov, ako je spermidín a agmatín.

HSF mal zvýšenú telesnú hmotnosť, hladinu glukózy v krvi a krvný tlak. BBP nezmenil telesnú hmotnosť a hladinu glukózy v krvi, ale bol schopný znížiť hypertenziu generovanú touto diétou, čo naznačuje priamy hypotenzívny účinok. Synergický účinok bioaktívnych zlúčenín identifikovaných v BBP demonštruje veľký potenciál na prevenciu a/alebo liečbu hypertenzie.

Zdroj:

Matheus Antônio Filiol Belin, Juliana Silva Siqueira, Taynara Aparecida Vieira, Núbia Alves Grandini, Thiago Luiz Novaga Palacio, Erika Tiemi Nakandakare-Maia, Dijon Henrique Salomé de Campos,

Department of Pathology, Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-687, Brazil

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Via Mangiagalli 25, Milan 20133, Italy

Bergamot by-product, a source of biogenic amines, reduces hypertension induced by high sugar-fat diet

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2950199724000107>