

IMPACT OF ARONIA MELANOCARPA ON INTESTINAL INFLAMMATORY MARKERS IN AGED RATS

Elena Daskalova

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Medical University of Plovdiv, Bulgaria, elena.daskalova@mu-plovdiv.bg

Abstract: As global life expectancy increases, the importance of addressing age-related health issues is growing, sparking interest in nutritional strategies that promote healthy ageing. Aronia melanocarpa fruit juice, a functional beverage rich in polyphenols and vitamins, is a promising option due to its potent antioxidant and anti-inflammatory properties.

This study aimed to investigate the impact of Aronia melanocarpa fruit juice on inflammatory markers in the small intestine wall of aged rats.

Twenty-four male Wistar rats were divided into three groups: young controls (YC, aged three months), aged controls (OK, aged 24 months), and aged rats supplemented with 100% Aronia melanocarpa juice (A, 10 ml/kg daily). After the three-month supplementation period, samples were collected from the small intestine for immunohistochemical analysis of selected inflammatory cytokines.

The analysis revealed age-related variations in inflammatory status, with older animals exhibiting heightened pro-inflammatory activity. Aronia supplementation exerts significant, tissue-specific effects on inflammatory cytokine expression in model of naturally aged rats. Ageing was associated with increased IL-1 β expression and anti-inflammatory cytokine dysregulation across small intestine wall. Supplementation with Aronia melanocarpa juice partially restored the balance of cytokines by reducing pro-inflammatory signalling and enhancing IL-4 and IL-10 expression in small intestine wall.

Regular supplementation with Aronia melanocarpa juice may help counteract age-related inflammation by influencing key immune signalling molecules. These results support the potential of *Aronia melanocarpa* as a functional food with geroprotective and anti-inflammatory properties, highlighting its relevance in strategies aimed at mitigating inflammation and improving gut health during ageing.

Based on the results, it could be recommended that functional beverages such as *Aronia melanocarpa* be included in the diet to support healthy ageing. Regular Aronia juice supplementation may help to reduce age-related inflammation and improve immune regulation. These findings lend weight to the idea of using *Aronia melanocarpa* as a nutritional tool to reduce inflammation and promote healthy ageing.

Keywords: IL-10, IL-4, IL-1 β , functional foods, Aronia, ageing.

ЕФЕКТ НА ARONIA MELANOCARPA ВЪРХУ ВЪЗПАЛИТЕЛНИ МАРКЕРИ В ТЪНКО ЧЕРВО НА СТАРИ ПЛЪХОВЕ

Елена Даскалова

Катедра по анатомия, хистология и ембриология, Медицински факултет, Медицински университет-Пловдив, България, elena.daskalova@mu-plovdiv.bg

Абстракт: С увеличаването на средната продължителност на живота в световен мащаб, значимостта на свързаните с възрастта здравни проблеми нараства, което предизвиква интерес към хранителни стратегии, подпомагащи здравословното стареене. Сокът от плодовете на *Aronia melanocarpa*, функционална напитка, богата на полифеноли и витамини, е обещаваща опция поради своите мощни антиоксидантни и противовъзпалителни свойства.

Целта на това проучване е да изследва въздействието на сока от плодовете на *Aronia melanocarpa* върху възпалителни маркери в стената на тънките черва на стари плъхове.

Двадесет и четири мъжки плъха Wistar бяха разделени на три групи: млади контролни (YC, на възраст три месеца), стари контролни (OK, на възраст 24 месеца) и стари плъхове (на 24 месеца), суплементирани орално с 100% сок от *Aronia melanocarpa* (A, 10 ml/kg дневно). След тримесечния период на суплементация бяха взети проби от тънките черва за имунохистохимичен анализ на избрани възпалителни цитокини.

Анализът разкри възрастови вариации във възпалителния статус, като по-възрастните животни проявяват повишена провъзпалителна активност. Суплементацията с арония оказва значими тъканно специфични ефекти върху експресията на възпалителни цитокини при модел на естествено остарели плъхове. Стареенето

е свързано с повишена експресия на IL-1 β и дисрегулация на противовъзпалителните цитокини в стената на тънките черва. Приемът на сок от *Aronia melanocarpa* частично възстановява баланса на цитокините чрез намаляване на провъзпалителните сигнали и повишаване на експресията на IL-4 и IL-10 в стената на тънките черва.

Редовният прием на сок от *Aronia melanocarpa* може да подпомогне противодействието на възрастоообусловеното възпаление чрез въздействие върху ключови имунни сигнални молекули. Тези резултати подкрепят потенциала на *Aronia melanocarpa* като функционална храна с геропротективни и противовъзпалителни свойства, подчертавайки нейната значимост в стратегиите, насочени към смекчаване на възпалителните процеси и подобряване на здравето на червата в хода на стареенето.

Въз основа на резултатите може да се препоръча включването на функционални напитки като *Aronia melanocarpa* в диетата за подпомагане на здравословното стареене. Редовното приемане на сок от арония може да спомогне за намаляване на възрастоообусловеното възпаление и подобряване на имунната регулация в контекста на остаряването в добро здраве.

Ключови думи: IL-10, IL-4, IL-1 β , функционални храни, арония, стареене.

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Стареенето е естествен биологичен процес, характеризиращ се с постепенно намаляване на функционалната способност на тъканите и органите, което води до повишена уязвимост към заболявания, влошаване на физическата и когнитивната способност и в крайна сметка до смърт (Tenchov et al., 2024). С увеличаването на средната продължителност на живота в световен мащаб, въпросите, свързани с дълголетие и по-специално със здравословното стареене, стават все по-важни както в научен, така и в обществен контекст. Процесът на стареене засяга всички системи в организма и е свързан с прогресивни структурни и функционални увреждания (Tenchov et al., 2024). Една от характерните черти на биологичното стареене е установяването на продължително, нискостепенно възпаление, наричано „inflammaging“ (Ferrucci & Fabbri, 2018). За разлика от острото възпаление, което се съпровожда от изразени клинични симптоми като болка, зачервяване и температура, inflammaging представлява хронично, системно възпалително състояние без явни клинични прояви, но с доловими биохимични промени. Този тип субклинично възпаление допринася за развитието и прогресирането на много възрастови заболявания, включително сърдечно-съдови заболявания, саркопения, невродегенеративни състояния, захарен диабет тип 2, артрит, остеопороза и различни форми на рак. Следователно стратегиите, насочени към смекчаване на хроничното възпаление, представляват обещаващ път към насърчаване на здравословното стареене (Ferrucci & Fabbri, 2018). През последните години функционалните храни и натуралните биоактивни съединения привличат значително внимание като потенциални геропротективни агенти. *Aronia melanocarpa* е сред най-широко проучваните растения поради богатия си полифенолен профил и добре документираните си антиоксидантни и противовъзпалителни свойства (Daskalova et al., 2022; Denevet et al., 2012). Плодовете на *Aronia melanocarpa* имат хепатопротективно, имуномодулиращо, антимутагенно, антикарциногенно, липидопонижаващо, антидиабетно и антихипертензивно действие. Все повече научни доказателства подчертават и неговия антиейджинг и геропротективен потенциал, който се проявява чрез удължаване на продължителността на живота, антипролиферативно действие, подобрен метаболизъм на глюкозата и липидите, отслабване на невродегенеративните промени и усилване на антиоксидантните защитни механизми. Предполага се, че тези ефекти се медиатират чрез хормезис, модулация на инсулиновите/IGF-1 сигнални пътища и противовъзпалителна активност (Ferrucci & Fabbri, 2018; Daskalova et al., 2022).

Централно място в оценката на възпалителния статус заемат интерлевкините – ключови цитокини, отговорни за имунната комуникация и регулирането на възпалителните процеси. Балансът между провъзпалителните (напр. IL-1 β) и противовъзпалителните (напр. IL-4, IL-10) интерлевкини играе решаваща роля при определянето на степента на възпаление и оценката на ефикасността на съединения с потенциални противовъзпалителни или геропротективни свойства (Daskalova et al., 2024; Pencheva et al., 2023). В този контекст настоящото проучване имаше за цел да изследва ефектите на сока от *Aronia melanocarpa* върху възпалителното състояние на тънкочревната стена при естествено остарели плъхове. Беше използван имунохистохимичен анализ за оценка на експресията на IL-1 β , IL-4 и IL-10 в тънкочревната стена. Резултатите предоставят ценна информация за потенциалното противовъзпалително и геропротективно влияние на суплементацията с арония в хода на стареенето.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

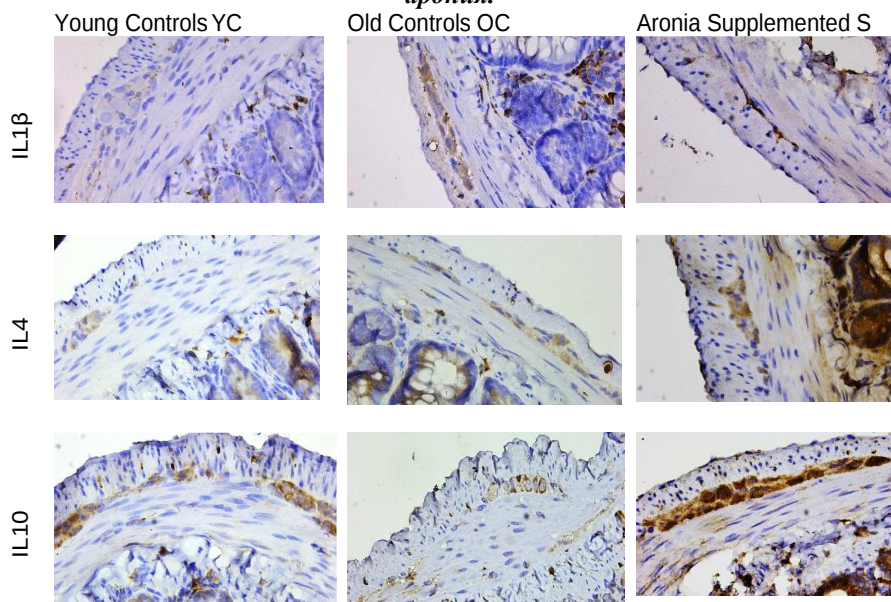
Бяха използвани общо 24 мъжки плъха Wistar, които бяха разпределени в три експериментални групи:

YC – млади контролни (на 3 месеца); OC – стари контроли (на 24 месеца) и A – стари плъхове (на 24 месеца), които получаваха перорално сок от *Aronia melanocarpa*. Дневната доза (10 мл/кг) от 100% сок от *Aronia melanocarpa* беше разредена 1:1 с питейна вода и предоставяна на животните в отделна бутилка успоредно с питейната им вода. Периодът на приемане на антиоксидантната напитка беше 3 месеца. В края на експеримента бяха взети проби от стената на тънките черва за имунохистохимичен анализ. Имунохистохимичното оцветяване на срезове за IL-1 β , IL-4 и IL-10 беше извършено по стандартни протоколи. Беше приложена полуколичествена оценка за определяне на интензивността на оцветяването в различни структури на средния слой на стената на тънките черва, включително гладко мускулни клетки, миентеричен плексус и макрофаги. Интензивността на имунохистохимичното оцветяване беше визуално оценена и класифицирана по четиристепенна скала от двама независими патолози: 0 – без реакция; + – слаба интензивност; ++ – умерена интензивност; и +++ – силна интензивност. Критерият беше наличието на кафяво гранулирано цитоплазмено оцветяване в гладкомускулните клетки, миентеричния плексус и макрофагите.

3. РЕЗУЛТАТИ

Резултатите показаха разлики в интензивността на експресията на IL-1 β , IL-4 и IL-10 в зависимост от типа клетки и експерименталната група. Фигура 2 и таблица 1 демонстрират имуноекспресията на IL-1 β , IL-4 и IL-10 в различни структури на пробите от тънко черво, включително гладко мускулни клетки, миентеричен плексус и макрофаги.

Фигура 1. Микрофотографии на имунореакцията за IL-1 β , IL-4 и IL-10 в тънките черва на плъхове, увеличение x 400; YC – млади контроли, OC – стари контроли, Aronia supplemented - група, приемала арония.



Источник: Микрофотографиите са направени от авторката, изцяло от препарати от експеримента

Микрофотографиите на чревната стена, показани на фиг. 1, демонстрират, че гладкомускулните клетки не показват експресия на IL-1 β в групите YC и OC и проявяват минимална експресия в групата суплементирана с Aronia. Миентеричният плексус показва най-силна експресия на IL-1 β в групата Aronia, докато групите YC и OC показват по-слаба по интензивност имунна реакция. Експресията на IL-1 β в макрофагите е умерена в групата Aronia, висока в групата OC и слаба в групата YC. Експресията на IL-4 в гладките мускули е слаба в YC и OC, но по-силна в групата суплементирана с Aronia. Експресията на IL-4 в миентеричния плексус е най-висока в Aronia групата и умерена в двете контролни групи (YC и OC). Експресията на IL-4 в макрофагите е много силна в OC и Aronia и слаба в групата YC. Експресията на IL-10 в гладките мускули е слаба в YC и OC, но висока в групата Aronia. Имуноекспресията на IL-10 в миентеричния плексус е висока в

YC и Aronia, но ниска в групата ОС. Експресията на IL-10 в макрофагите е силна в групата с Aronia и слаба в двете контролни групи (YC и ОС). Резултатите от полуколичествения анализ на интензивността на имунните реакции са представени в таблица 1.

Таблица 1. Интензивност на имуноекспресията на IL-1 β , IL-4, IL-10 в тънките черва на плъхове. Полуколичествен анализ. Легенда: - отсъства; + слаба; ++ умерена; +++ силна експресия. YC – млади контроли, СО - стари контроли, А - група, приемала сок от арония.

	Локализация	YC	ОС	А
IL-1 β	Гладкомускулни клетки	-	-	+/-
	Миентеричен плексус	+	+	+++
	Макрофаги	+	+++	++
IL-4	Гладкомускулни клетки	+	+	++
	Миентеричен плексус	++	++	+++
	Макрофаги	+	+++	+++
IL-10	Гладкомускулни клетки	-	-	+++
	Миентеричен плексус	++	+	+++
	Макрофаги	+	++	+++

Източник: Таблицата представя обобщение на наши собствени данни и е изработена от автора на статията

Анализът на интензивността на имунната експресия на IL-1 β в гладкомускулните клетки показва липса на имуноекспресия в групите YC и ОС и минимална експресия в групата приемала Aronia.

Миентеричният плексус показва най-силна експресия на IL-1 β в групата с Aronia, докато YC и ОС показваха по-слаба интензивност на имунореакцията. Имуноекспресията на IL-1 β в макрофагите беше умерена в групата с Aronia, висока в ОС и слаба в YC.

Имунната реакция на IL-4 в гладките мускули беше слаба в YC и ОС, но умерена в групата с Aronia. IL-4 експресията в миентеричния плексус беше силна в групата приемала Aronia и умерена в двете контролни групи (YC и ОС). IL-4 експресията в макрофагите беше силна в групите ОС и Aronia и слаба в YC.

Експресията на IL-10 в гладките мускули липсваше в групите YC и ОС, но беше силна в групата с Aronia. Имуноекспресията на IL-10 в миентеричния плексус беше умерена в YC, силна в Aronia групата, но слаба в групата ОС. Експресията на IL-10 в макрофагите беше силна в групата с Aronia, слаба в YC и умерена в групата СО.

4. ОБСЪЖДАНЕ

Настоящото проучване оцени въздействието на суплементацията със сок от *Aronia melanocarpa* върху възпалителния профил на тъканите в тънчочревната стена при естествено остарели плъхове чрез анализ на експресията на IL-1 β , IL-4 и IL-10. Резултатите като цяло показват, че стареенето е свързано с изразена дисрегулация в баланса на възпалителните цитокини в структурите на тънчочревната стена, докато добавката от арония модулира локалната имунна реакция по специфичен за тъканта начин. Старееенето е известно с феномена „inflammaging“ – хронично нискостепенно възпаление, което засяга и стомашно-чревния тракт и допринася за нарушаване на бариерната и невромускулната функция (Franceschi et al., 2000; Buford, 2017).

Липсата на IL-1 β експресия в гладкомускулните клетки при младите и възрастните контролни групи, както и минималната експресия при животните, суплементирани с арония, предполага, че този силно провъзпалителен цитокин не е водещ медиатор в мускулния слой на тънките черва. От друга страна, повишената имунна експресия на IL-1 β в макрофагите при възрастните контролни групи потвърждава засиленото възпалително състояние при стареене, което е в съответствие с данните за активирането на чревните макрофаги в напреднала възраст (Man et al., 2014). Намалената експресия на IL-1 β в макрофагите в групата, суплементирана с арония, предполага противовъзпалителен ефект, вероятно свързан с високото съдържание на полифеноли и антоцианини в плода (Denev et al., 2012). Интересен е резултатът за

миентеричния плексус, където най-силна експресия на IL-1 β се наблюдава в групата, суплементирана с арония. Това може да отразява активирането на локални имунно-невронни взаимодействия, тъй като цитокините играят роля не само във възпалението, но и в невронната пластичност и регулирането на чревния мотилитет (Goehler et al., 2007). В този контекст повишената експресия може да е по-скоро регулаторна, отколкото патологична по характер. Систематичен преглед на рандомизирани контролирани проучвания при хора и животни суплементирани с Арония показва статистически значимо намаление на възпалителните маркери (CRP, IL-6, TNF- α) и повишена активност на антиоксидантните ензими (SOD, CAT, GPx), благоприятни промени в серумните и чревните метаболити, свързани с по-нисък възпалителен и метаболитен риск, както и с потенциална роля в модулирането на чревната микробиота и функцията на чревната бариера (Sarıkaya et al., 2025; Kaczmarczyk et al., 2024; Chamberlin et al., 2024). Експресията на IL-4, типичен противовъзпалителен и Th2-асоцииран цитокин, е умерено до силно повишена в гладката мускулатура, миентеричния плексус и макрофагите в групата с арония. Това показва промяна в имунния баланс в посока противовъзпалителен профил. Известно е, че IL-4 стимулира алтернативната (M2) активация на макрофагите, която е свързана с регенерацията на тъканите и потискането на хроничното възпаление (Murray & Wynn, 2011). Силната експресия на IL-4 в макрофагите при старите контроли вероятно отразява компенсаторен механизъм, който обаче е недостатъчен без допълнителна хранителна интервенция. Най-изразен ефект на *Aronia melanocarpa* се наблюдава при IL-10, ключов противовъзпалителен цитокин. Силната експресия на IL-10 в гладкомускулните клетки, миентеричния плексус и макрофагите в суплементираната група, в контраст с ниската или липсваща експресия в контролните групи, показва мощен имуномодулиращ ефект. IL-10 е от решаващо значение за поддържането на имунната хомеостаза на червата и ограничаването на прекомерните възпалителни реакции в стомашно-чревния тракт (Saraiva & O'Garra, 2010). Данните са в съответствие с други проучвания, показващи, че полифенолите могат да индуцират IL-10 и да потискат NF- κ B-медираните възпалителни сигнали (Joseph et al., 2016).

Като цяло, резултатите показват, че *Aronia melanocarpa* влияе върху експресията на цитокините не единствено чрез потискане на възпалението, а чрез пребалансиране на про-/антивъзпалителната ос в зависимост от контекста. Тази нюансирана модулация е в съответствие с хормоналните механизми, описани по-рано за растителните полифеноли, при които ниските дози предизвикват адаптивни клетъчни реакции, включително засилена антиоксидантна защита и контролирано противовъзпалително сигнализиране.

Това изследване има някои ограничения. Тъй като резултатите се базират на животински модел са необходими допълнителни клинични проучвания при хора, за да се потвърди неговата ефективност, оптималната дозировка и дългосрочната безопасност.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суплементацията с *Aronia* оказва значителни тъканно-специфични ефекти върху експресията на възпалителни цитокини при естествено остарели плъхове. Стареенето е свързано с повишена експресия на IL-1 β и дисрегулация на противовъзпалителните цитокини в структурите на стената на тънките черва. Суплементацията със сок от *Aronia melanocarpa* частично възстановява баланса на цитокините чрез намаляване на провъзпалителните сигнали в гладкомускулните клетки и макрофагите и чрез повишаване на експресията на IL-4 и IL-10, особено в гладкомускулните клетки, миентеричния плексус и макрофагите. Тези резултати подкрепят потенциала на аронията като функционална храна с геропротективни и противовъзпалителни свойства и подчертават нейната значимост в стратегиите, насочени към смекчаване на възпалителните процеси и подобряване на чревното здраве и имунната хомеостаза по време на стареене.

Допълнителни данни

Тази работа е финансирана от проект КР-06-Н71/4 - 05.12.2023 на Фонд научни изследвания.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Buford, T. W. (2017). Disrupted gut microbiome and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and MetabolicCare*, 20(1), 38–43. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000332>
- Chamberlin, M. L., Peach, J. T., Wilson, S. M. G., Miller, Z. T., Bothner, B., Walk, S. T., Yeoman, C. J., & Miles, M.P. (2024). Polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit beneficially impact cholesterol, glucose, and serum andgut metabolites: A randomized clinical trial. *Foods*, 13(17), Article 2768. <https://doi.org/10.3390/foods13172768>

- Daskalova, E., Delchev, S., Vladimirova-Kitova, L., Bivolarski, I., Pencheva, M., & Denev, P. (2022). Aronia melanocarpa fruit juice modulates ACE2 immunoexpression and diminishes age-related remodeling of coronary arteries in rats. *Foods*, 11(9), Article 1220. <https://doi.org/10.3390/foods11091220>
- Daskalova, E., Pencheva, M., & Denev, P. (2024). Black chokeberry (Aronia melanocarpa) juice supplementation improves oxidative stress and aging markers in testis of aged rats. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(5), 4452–4470. <https://doi.org/10.3390/cimb46050270>
- Denev, P. N., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Blazheva, D., Nedelcheva, P., & Vojtek, L. (2012). Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (Aronia melanocarpa) polyphenols. *Food Chemistry*, 134(1), 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.170>
- Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). Inflammageing: Chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology*, 15(9), 505–522. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging: An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P. A., Hansen, M. K., Anderson, K., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2007). The immune-to-brain pathway: Cytokine communication and behavioral responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.007>
- Joseph, S. V., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2016). Polyphenols and inflammation. *Nutrition Reviews*, 74(4), 257–271. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw002>
- Kaczmarczyk, S., Dziewiecka, H., Pasek, M., Skarpańska-Stejnborn, A., & Ostapiuk-Karolczuk, J. (2024). Effects of black chokeberry (Aronia melanocarpa) supplementation on oxidative stress, inflammation and gut microbiota: A systematic review of human and animal studies. *British Journal of Nutrition*, 133(1), 58–81. <https://doi.org/10.1017/S0007114524002976>
- Man, A. L., Gicheva, N., & Nicoletti, C. (2014). Age-associated modifications of intestinal immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(4), 619–631. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0214-096R>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11, 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Pencheva, M., Bozhkova, M., Kalchev, Y., Petrov, S., Baldzhieva, A., Kalfova, T., Dichev, V., Keskinova, D., Genova, S., & Atanasova, M. (2023). The serum ACE2, CTSL, AngII, and TNF α levels after COVID-19 and mRNA vaccines: The molecular basis. *Biomedicines*, 11(12), Article 3160. <https://doi.org/10.3390/biomedicines1112160>
- Saraiva, M., & O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10, 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
- Sarıkaya, B., Kolay, E., Güney-Coşkun, M., Yiğit-Ziolkowski, A., & Aktaş, Ş. (2025). The effect of black chokeberry (Aronia melanocarpa) on human inflammation biomarkers and antioxidant enzymes: A systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition Reviews*, 83(6), 1083–1098. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuae143>
- Tenchov, R., Sasso, J. M., Wang, X., & Zhou, Q. A. (2024). Aging hallmarks and progression and age-related diseases: A landscape view of research advancement. *ACS Chemical Neuroscience*, 15(1), 1–30. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00531>