

**Związki biologiczne czynne
w medycynie i ochronie zdrowia
– przegląd zagadnień**

**Związki biologiczne czynne
w medycynie i ochronie zdrowia
– przegląd zagadnień**

Redakcja:
Edyta Bajek
Kamil Maciąg

Lublin 2017

Recenzenci:

- dr Jolanta Artym
- dr n. farm. Anna Biernasiuk
- dr n. med. Edyta Gałęziowska
- dr Mariola Janiszewska
- dr Michał Kalita
- dr n. med. Małgorzata Kozioł
- dr Agnieszka Kuźniar
- dr n. med. Robert Łuczyk
- dr n. farm. Agnieszka Marzec
- dr Renata Matraszek-Gawron
- dr n. med. Marta Olszewska
- dr n. farm. Anna Serefko
- dr Aneta Sławińska
- dr inż. Rafał Sochaczewski

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-65598-85-1

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Alicja Golletz

Chemoprewencyjne działanie i zastosowanie resweratrolu w terapii wybranych nowotworów 7

Barbara Król-Kogus

Przeciwwzapalne działanie galaktolipidu - składnika czynnego z owoców dzikiej róży, w chorobach zwyrodnieniowych stawów 31

Wojciech Trybus, Teodora Król, Ewa Trybus, Anna Kopacz-Bednarska

Antrachinony – związki o wielokierunkowej aktywności biologicznej..... 38

Monika Elżbieta Jach, Kinga Podstawka

Zastosowanie ozonowanych olejów roślinnych w profilaktyce i terapii 61

Katarzyna Kmiecik, Iga Hołyńska-Iwan

Kwercetyna jako cenny dla zdrowia fitoskładnik..... 79

Angelika Mastalerczyk, Marta Ciwińska, Natalia Dębowska, Weronika Michalczuk, Jacek Kurzepa, Anna Boguszewska-Czubara

Cure-cuma? Lecznicze działanie *Curcuma longa* 87

Mateusz Bartz

Wykorzystanie związków biologicznie czynnych pozyskiwanych z rodzaju *Selaginella* w medycynie..... 105

Monika Janeczko, Angelika Muzyczka

Przeciwmikrobiologiczna aktywność 1,4-naftochinonów..... 127

Monika Janeczko

Substancje o potencjale przeciwgrzybiczym produkowane przez mikroorganizmy 142

Paula Chechła, Iga Hołyńska-Iwan

Związki biologicznie czynne obecne w grzybach wyższych 162

Beata Chudzik-Rząd, Anna Malm, Jan Sobczyński

Wpływ fotouczulaczy na biofilm drobnoustrojów 170

Anna Michalicha, Aleksander Klepka

Laktoferyna jako jedno z białek siary o potencjale terapeutycznym 183

Dominika Skonieczna, Paulina Sławianowska, Agata Smalczewska, Iga Hołyńska-Iwan

Hepcydyna i erytroferon – nowe białka przydatne w ocenie metabolizmu żelaza 194

<i>Paweł Śledziński, Agnieszka Nowak, Joanna Zeyland, Ryszard Słomski</i> Kannabinoidy – skutki zdrowotne	202
<i>Barbara Gieroba</i> Witamina C – struktura, występowanie i rola w organizmie człowieka.....	213
<i>Paulina Pruszkowska-Przybylska</i> Witamina D niejedno ma imię – znaczenie witaminy D w kształtowaniu komponentu tłuszczowego składu ciała człowieka.....	225
<i>Ewelina Cholewińska, Katarzyna Ognik, Paweł Sagan, Daniel Stępniewski</i> Toksyczność preparatów farmakologicznych – dostępnych bez recepty	233
<i>Anna Tylutki, Magdalena Paziewska, Paulina Gil-Kulik</i> Wielokierunkowe działanie surwiwiny w komórkach ludzkich.....	246
<i>Joanna Hodyl, Błażej Błaszak, Karolina Majewska, Joanna Szulc, Grażyna Gozdecka</i> Wpływ sposobu przygotowania herbaty na zawartość substancji aktywnych.....	256
Indeks Autorów	265

Chemoprewencyjne działanie i zastosowanie resweratrolu w terapii wybranych nowotworów

1. Wstęp

W 2012 roku, według Cancer Research UK, choroby nowotworowe zostały wykryte u ponad 14 mln ludzi na świecie, z czego ponad 8 mln zmarło [1]. W Polsce znajdują się one na drugim miejscu najczęstszych przyczyn zgonów [2]. Z tego względu dużą uwagę poświęca się działaniom mającym na celu zmniejszenie ryzyka zachorowalności na schorzenia nowotworowe.

Szczególnym zainteresowaniem cieszą się związki fitochemiczne znajdujące się w roślinach jadalnych oraz wykazujące działanie chemoprewencyjne, czyli posiadające zdolność do opóźnienia, zahamowania lub odwrócenia procesu kancerogenezy [3]. Do grupy tej zalicza się flawonoidy o wysokiej aktywności biologicznej, do której przynależy resweratrol.

Resweratrol wykorzystywany jest zarówno w chemoprewencji nowotworów jak i podczas ich terapii. Dotyczy to na przykład nowotworów piersi, prostaty oraz jelita grubego. Jego działanie przeciwnowotworowe polega na hamowaniu inicjacji, promocji oraz progresji. Posiada on także zdolność usuwania wolnych rodników, ma działanie przeciwzapalne, przeciwmutagenne oraz antyproliferacyjne [4, 5]. Resweratrol jest również inaktywatorem białka – NF- κ B, który jest czynnikiem transkrypcyjnym, dzięki czemu przyczynia się do zwiększenia efektywności chemioterapii, co udowodniono w badaniach przeprowadzonych *in vitro* [4, 6].

Mając na uwadze, że choroby nowotworowe dotyczą coraz większej liczby osób, ciągle poszukuje się nowych rozwiązań, które mogłyby zostać wykorzystane w ich leczeniu lub zapobieganiu.

Celem pracy jest zgromadzenie informacji na temat polifenolu roślinnego, jakim jest resweratrol, koncentrując się na jego zdolności do hamowania procesów nowotworowych.

2. Resweratrol

2.1. Źródła resweratrolu

Resweratrol został wyizolowany po raz pierwszy w 1940 roku z korzenia ciemnicy białej (*Veratrum grandiflorum* O. Loes). W roku 1963 stwierdzono jego obecność również w korzeniu rdestowca ostrokończystego (*Polygonum cuspidatum*), który uprawiany jest w Japonii oraz Chinach i wykorzystywany w medycynie ludowej. Z rośliny tej uzyskuje się preparat *ko-jo-kon*. Jest on stosowany w leczeniu m.in.

¹ golletza@gmail.com

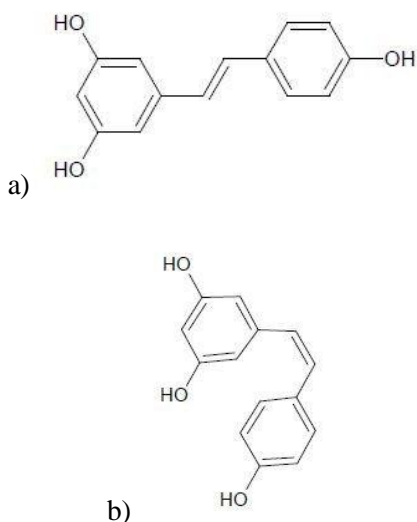
ropnych zakażeń skóry, chorób wenerycznych oraz układu sercowo-naczyniowego, a także grzybic. Obecnie wiadomo, że resweratrol występuje w wielu gatunkach roślin [8, 13]. Substancję tą można znaleźć, między innymi, w skórce czerwonych oraz czarnych odmian winogron, orzechach ziemnych, owocach jagodowych, kakao, skórkach pomidorów, jak również w liściach i kwiatach orchidei, a także rabarbaru [4, 5]. W tabeli 1 została przedstawiona zawartość resweratrolu w poszczególnych produktach.

Tabela 1. Zawartość resweratrolu w wybranych produktach spożywczych [7]

Produkt spożywczy	Zawartość resweratrolu
Sok z winogron	$0,156 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/g}$
Borówka amerykańska	$0,6 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol/g}$
Skórka pomidorów	$18,4 \pm 1,6 \mu\text{g/g}$ (max zawartość w suchej masie)
Orzechy ziemne	$0,02 - 1,79 \mu\text{g/g}$
Czekolada gorzka	$0,35 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$
Kakao	$1,85 \pm 0,43 \mu\text{g/g}$

2.2. Struktura resweratrolu

Resweratrol (3,5,4'-trihydroksy-trans-stilben) to związek zaliczany do klasy stilbenów. Jego cząsteczka zbudowana jest z dwóch pierścieni fenolowych połączonych ze sobą mostkiem etylenowym. Występuje on w dwóch formach izomerycznych – trans- i cis- (rysunek 1). Forma trans- jest stabilniejsza oraz wykazuje większą aktywność biologiczną pod względem działania przeciwutleniającego i przeciwnowotworowego. Forma ta przeważa w tkankach roślinnych. Forma cis- powstaje w wyniku izomeryzacji poprzez oddziaływanie promieniowaniem UV, wysokim pH na formę trans- lub podczas fermentacji skórek z winogron [7-9, 13].

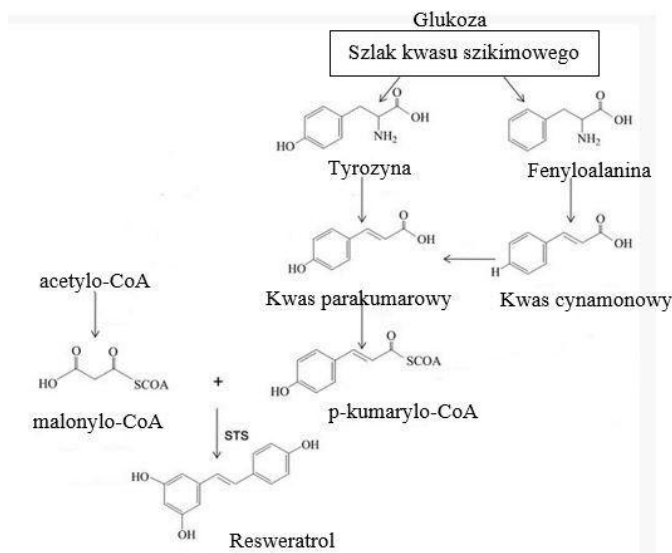


Rysunek 1. Formy izomeryczne resweratrolu: a) forma trans-, b) forma cis- [13]

2.3. Biosynteza resweratrolu w roślinach

Resweratrol jest fitoauksyną wytwarzaną przez roślinę w odpowiedzi na zakażenie grzybicze, uszkodzenie tkanki bądź promieniowanie UV. Stężenie resweratrolu związane jest z rozmiarem uszkodzenia.

Resweratrol powstaje z prekursorów metabolizmu podstawowego, które ulegają przekształceniom na drodze dwóch szlaków. Szlak kwasu malonowego prowadzi do powstania malonylokoenzymu A (malonylo-CoA) z acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) wytworzonego w procesie glikolizy. Z kolei na drodze szlaku kwasu szikimowego z erytrozo-4-fosforanu (pochodzącego z szlaku pentozo-fosforanowego) oraz fosfoenolopirogronianu (pochodzącego z glikolizy) powstaje kwas szikimowy, który ulega dalszym przemianom do fenyloalaniny lub tyrozyny. Wskutek deaminacji aminokwasów powstaje kwas cynamonowy, który najpierw ulega przemianie w kwas parakumarowy, a następnie w parakumaroilokoenzym A (p-kumarylo-CoA). Ostatni etap biosyntezy resweratrolu polega na kondensacji trzech cząsteczek malonylo-CoA i jednej cząsteczki p-kumarylo-CoA. Reakcja ta jest katalizowana przez syntazę stylbenową (STS). Schemat procesu został przedstawiony na rysunku 2 [4, 5, 9, 10, 42].



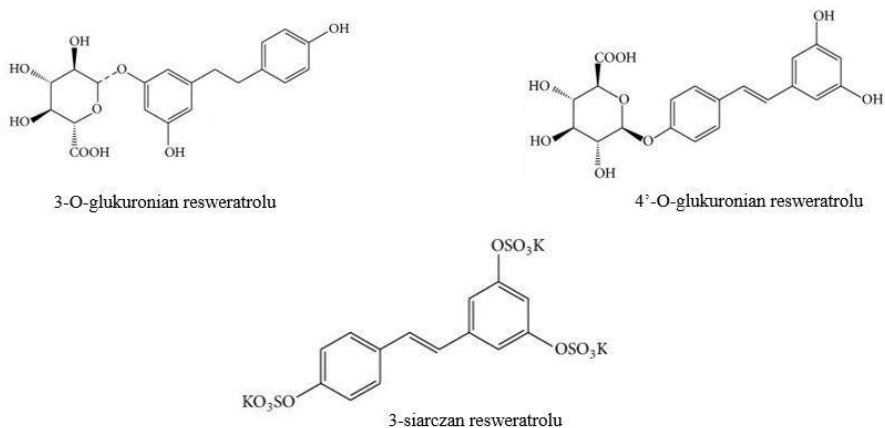
Rysunek 2. Schemat biosyntezy resweratrolu w roślinach [9]

2.4. Wchłanianie i metabolizm resweratrolu

Wchłanianie resweratrolu w organizmie ludzkim odbywa się w jelicie cienkim. Proces ten przebiega na drodze dyfuzji pasywnej lub poprzez tworzenie kompleksów z transporterami błonowymi, np. integrynami. Resweratrol, po wnikięciu do krwioobiegu, występuje w trzech formach: glukuronianu, siarczanu lub w postaci wolnej. Postać wolna resweratrolu może wiązać się z albuminą lub lipoproteinami, np. LDL,

dzięki czemu jest następnie wylapywana przez komórki, które posiadające na swojej błonie receptory dla albuminy lub danej lipoproteiny. Następuje rozpad kompleksu, a resweratrol w wolnej postaci przedostaje się do wnętrza komórki. Wyniki badań wskazują, że po wchłonięciu, resweratrol kierowany jest do narządów, takich jak serce, wątroba oraz nerki [10, 43].

Resweratrol metabolizowany jest w wątrobie, a dokładniej w hepatocytach. W procesie tym bierze udział cytochrom P450. Resweratrol zostaje przekształcony do piceatannolu oraz tetrahydroksystilbenu M1. Badania wykazały, że u ludzi metabolitami są glukuronowe i siarczanowe formy trans- resweratrolu (rysunek 3). Po 30 minutach, od przeniknięcia do krwioobiegu, resweratrol zostaje zamieniony na siarczynowe pochodne. Związki te krążą w surowicy do 9 godzin. Wydalane są z organizmu wraz z kałem oraz moczem. Okres połowicznego rozpadu resweratrolu w osoczu wynosi od 8 do 14 minut [4, 11, 12].



Rysunek 3. Metabolity resweratrolu [43]

2.5. Biodostępność resweratrolu

Liczne badania *in vitro* przeprowadzone z udziałem resweratrolu wykazały, między innymi, jego działanie neuroprotekcyjne, a także korzystny wpływ w leczeniu nowotworów oraz chorób układu sercowo-naczyniowego. Jednakże efekty te okazały się trudne do uzyskania w warunkach *in vivo*. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że przy podaniu doustnym lub dożylnym resweratrol wchłaniany jest co najmniej w 75%. Niestety szybki metabolizm, który prowadzi do rozpadu cząsteczki na mniej aktywne metabolity, przyczynia się do jego niskiej biodostępności. Ciągłe prowadzone są badania mające na celu zwiększenie biodostępności resweratrolu u ludzi, gdyż wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* są nadal bardzo obiecujące [43- 45].

2.6. Toksyczność resweratrolu

Toksyczność resweratrolu była badana na grupie 104 osób (uwzględniona została także grupa kontrolna). Po podaniu ochotnikom 400 mg resweratrolu u 3 na 24 zaobserwowano zmiany elektrolitów we krwi, zapalenie nosogardzieli lub wysypkę rumieniową. Kolejna dawka podana badanym wynosiła 1 g resweratrolu. U dwóch osób zaobserwowano niewielki wzrost bilirubiny we krwi lub poziomu aminotransferazy alaninowej. Następne przeprowadzone doświadczenie dotyczyło 40 osobowej grupy, z której każda osoba dostawała odpowiednią dawkę resweratrolu (25 mg, 50 mg, 100 mg lub 150 mg) lub placebo co 4 godziny przez okres 48 godzin. Trzy osoby skarżyły się na ból w przedniej części głowy. Innymi działaniami niepożądanymi, które zostały zgłoszone w pojedynczych przypadkach, były:

- w grupie, która przyjmowała dawkę 25 mg resweratrolu: ból głowy, senność, bóle mięśni dolnych;
- w grupie, która przyjmowała dawkę 100 mg resweratrolu: zapalenie najądrzy,
- w grupie, która przyjmowała dawkę 150 mg resweratrolu: zwroty głowy.

Podsumowując, nawet wysokie dawki resweratrolu, w większości przypadków, nie prowadzą do niepożądanych zdarzeń. Negatywne skutki, które odnotowano w pojedynczych przypadkach, minęły w ciągu kilku dni i były łagodne. Niestety badania te przeprowadzono w krótkim czasie, więc wymagane jest przeprowadzenie kolejnych, w celu uzyskania większej liczby informacji [46].

Przed przeprowadzeniem badań klinicznych, testy obejmowały zwierzęta doświadczalne. W jednym z badań, przeprowadzonych przez J.A. Crowell i innych, sprawdzono wpływ różnych dawek resweratrolu na szczury. Badanie trwało 28 dni. Przy dawce 3 g/ kg masy ciała/ dzień zaobserwowano następujące zmiany: redukcja masy ciała, wzrost stężenia kreatyniny, aminotransferazy alaninowej, fosfatazy alkalicznej, a także bilirubiny całkowitej, zmniejszenie stężenia hemoglobiny, hematokrytu, liczby leukocytów oraz erytrocytów, wystąpienie zmian histopatologicznych, mających charakter hiperplazji, nerek oraz pęcherzyka żółciowego. Kolejna dawka podawana zwierzętom wynosiła 1 g/ kg masy ciała/ dzień. U samic zaobserwowano spadek masy ciała, natomiast u samców leukocytozę. Przy podaniu dawki wielkości 0,3 g/ kg masy ciała/ dzień, badacze nie zaobserwowali żadnych skutków ubocznych.

Podsumowując, najwięcej skutków niepożądanych odnotowano dla dawki 3 g resweratrolu/ kg masy ciała/ dzień, jednak taka ilość jest niemożliwa do spożycia przez człowieka. Ludzie mogą reagować na różne dawki resweratrolu w inny sposób niż badane zwierzęta, dlatego konieczne jest przeprowadzenie większej ilości badań właśnie na tej grupie [4, 47].

3. Nowotwór gruczołu krokowego

Rak gruczołu krokowego jest chorobą dotyczącą mężczyzn. Nowotwór ten rozwija się bezobjawowo na przestrzeni wielu lat, a ryzyko zachorowalności wzrasta wraz z wiekiem [14].

Podstawowe leczenie tego typu schorzenia opiera się na hormonalnej terapii antyandrogenowej. Metoda ta ma na celu obniżenie poziomu testosteronu lub zahamowanie oddziaływania androgenów na receptory androgenowe. Powoduje to zmniejszenie masy guza i przerzutów. Nie jest jednak ona w stanie całkowicie wyleczyć chorego [17]. Leczenie ma charakter paliatywny, dlatego dużą wagę zwraca się na możliwość chemoprewencji raka gruczołu krokowego.

Wiadomo, że androgeny odpowiadają za proliferację, różnicowanie komórek i funkcję gruczołu krokowego. Biorą także udział w rozwoju nowotworu. Również receptor androgenowy (AR), jako pośrednik działania androgenów, odgrywa rolę w rozwoju raka prostaty, dlatego to właśnie na tych czynnikach naukowcy skupiają się podczas przeprowadzania badań [18].

3.1. Hormonozależność i heterogenność raka prostaty

Rak prostaty jest nowotworem hormonozależnym. Proces kancerogenezy uwarunkowany jest zaburzeniem równowagi androgenowej. Polega ona na wzroście stężenia testosteronu oraz 5-alfa dihydrotestosteronu (DHT) we krwi. Komórki rakowe wykorzystują te dwa hormony do rozwoju, czego skutkiem jest progresja nowotworu [15].

Komórki nowotworowe posiadają zdolność do odseparowania się od kontrolowanej aktywacji receptora androgenowego. Powoduje to wzrost ekspresji genów, a także liczby receptorów androgenowych. Tę umiejętność nazywa się heterogennością raka gruczołu krokowego [15].

3.2. Produkcja testosteronu i DHT

Produkcja tych dwóch hormonów jest kontrolowana przez podwzgórze oraz przysadkę mózgową. Pierwszym etapem jest pobudzenie czynności wydzielniczej przysadki mózgowej przez podwzgórze. Następuje to poprzez wydzielenie dwóch związków – gonadoliberyny (GnRH) i kortykoliberyny (CRH). Przedni płąt przysadki mózgowej wytwarza gonadotropinę LH, która z kolei pobudza wytwarzanie androgenów w komórkach Leydiga znajdujących się w jądrach. Tak powstaje 95% całkowitej ilości testosteronu w organizmie dorosłego mężczyzny. Pozostałe 5% wytwarzane jest poprzez obwodową konwersję androgenów nadnerczowych. Reakcji tej podlega głównie dehydroepiandrosteron (DHEA). Po jego konwersji do testosteronu ulega on przekształceniu do 5-alfa-dihydrotestosteronu (DHT) w komórce gruczołowej. Gdy poziom wytwarzanego testosteronu osiągnie pożądane stężenie we krwi (tabela 2) następuje zahamowanie jego produkcji z użyciem mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego. W przypadku zaburzenia tego mechanizmu następuje nadprodukcja testosteronu, a to z kolei może przyczynić się do rozrostu prostaty oraz rozwoju raka gruczołu krokowego [15].

Tabela 2. Prawidłowe stężenie testosteronu w surowicy w zależności od zakresu wiekowego mężczyzn [16]

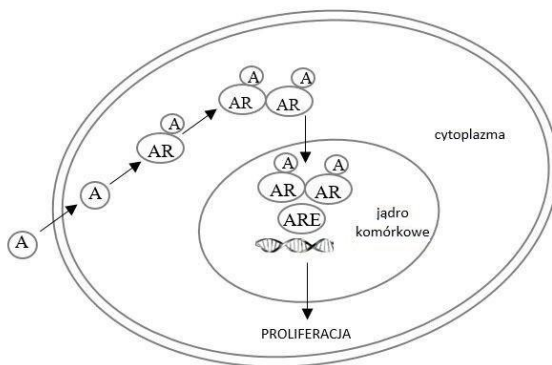
Zakres wiekowy mężczyzn [lata]	Prawidłowe stężenie testosteronu w surowicy [ng/ml]
20 - 50	6,0
50 - 60	3,4
60 - 70	2,3

3.3. Receptor androgenowy

Wyróżnia się niegenomowy i genomowy szlak odpowiedzi receptora androgenowego na obecność androgenów [15].

Droga genomowa

Androgen przyłącza się do receptora androgenowego znajdującego się w cytoplazmie. Powstaje kompleks androgen-receptor. Umożliwia to dimeryzację receptora, a następnie jego wniknięcie do jądra komórkowego. Dimer wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym lub elementem odpowiedzi na androgeny tzw. ARE (androgen response element). Pozwala to na regulację transkrypcji genów w ARE lub innych miejscach promotorowych DNA, które odpowiadają za proliferację komórek, co prowadzi do progresji nowotworu (rysunek 4) [15].



Rysunek 4. Genomowy szlak odpowiedzi receptora androgenowego, gdzie: A – androgen, AR – receptor androgenowy, ARE – element odpowiedzi na androgeny [15]

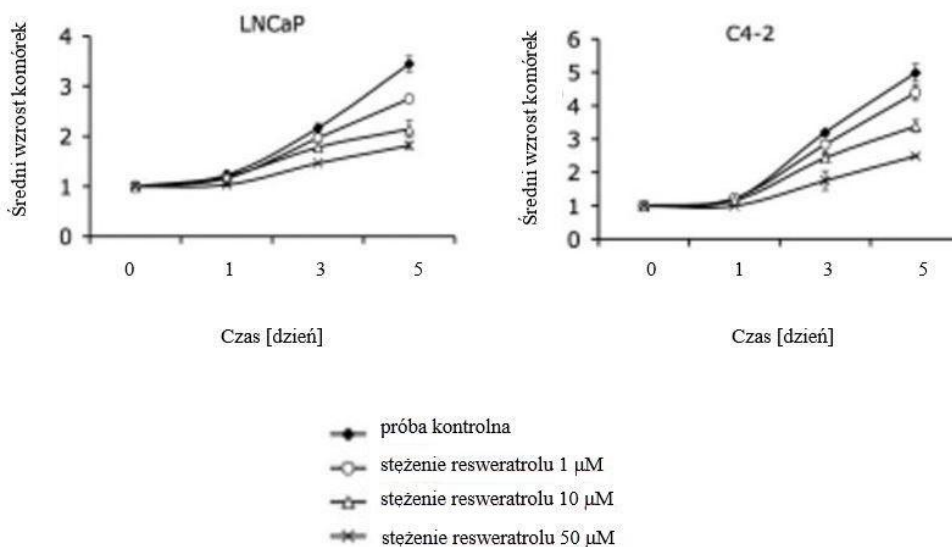
Droga niegenomowa

Przyłączenie się androgenu do receptora androgenowego znajdującego się w błonie komórkowej, odpowiada za regulację organizacji struktury cytoszkieletu, migrację i proces apoptozy, a także fosforylację czynników transkrypcyjnych i indukcję odpowiedzi DNA [15].

3.4. Przeciwnowotworowe działanie resweratrolu – wyniki badań

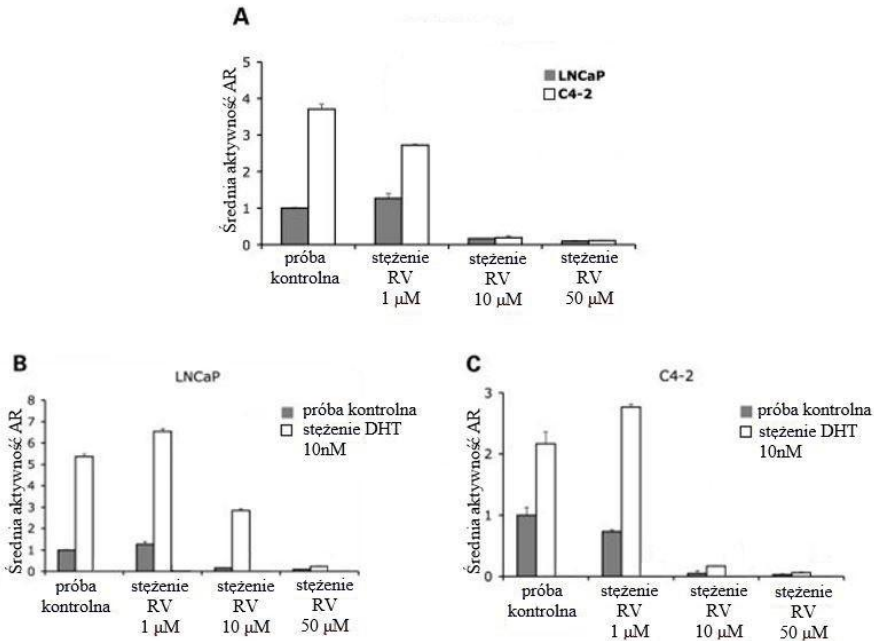
S. H. Mitchell i inni przeprowadzili badania na linii komórek LNCap, które wyizolowano z przerzutów do węzłów chłonnych, osób chorych na nowotwór gruczołu krokowego. Podczas badań zaobserwowano zarówno spadek poziomu białka AR, jak również spadek aktywności promotora transkrypcji AR w wyniku działania resweratrolu. Badacze sprawdzili również, czy substancja ta, ma wpływ także na inne geny regulowane za pomocą androgenów. Okazało się, że resweratrol powoduje obniżenie poziomu mRNA specyficznego koaktywatora receptora androgenowego – ARA70. Prawdopodobnie spadek tego koaktywatora wpływa pośrednio na ekspresję genów AR i procesy komórkowe. Dzięki możliwości obniżenia poziomu ekspresji ARA70, można będzie zwiększyć hamujące działanie resweratrolu wobec działania androgenów. Podsumowując, badacze udowodnili w przeprowadzonym doświadczeniu, że resweratrol jest zdolny do hamowania ekspresji receptora androgenowego i jego funkcji, w tym także proliferacji komórek [18].

Również badania przeprowadzone przez Yu Wang i innych potwierdzają korzystny wpływ resweratrolu na komórki nowotworowe. Poddali oni działaniu resweratrolu linię komórek LNCap, które były zależne od androgenów jak i linię komórek C4-2, które były niezależne od androgenów. Resweratrol dozowany był w trzech różnych dawkach. Dawka 10 μM miała odpowiadać stężeniu resweratrolu we krwi po spożyciu 1-2 kieliszków czerwonego wina. Obserwację prowadzono przez 5 dni i każdego dnia sprawdzano wzrost komórek obydwóch linii komórkowych. Zauważono zahamowanie wzrostu komórek przez resweratrol, a wyniki przedstawiono na poniższym wykresie (rysunek 5) [19].



Rysunek 5. Wpływ resweratrolu na linię komórkową LNCaP oraz C4-2 [19]

W badaniach tych potwierdzono również hamujący wpływ resweratrolu na aktywność receptora androgenowego. Działanie hamujące zaobserwowano dla stężeń 10 μM oraz 50 μM i obejmowało obydwie linie komórkowe. Dodatkowo zaobserwowano, że DHT znacznie zwiększa aktywność transkrypcji AR (rysunek 6). Autorzy badania, po przeanalizowaniu wyników otrzymanych z przeprowadzonych doświadczeń, sugerują, że hamowanie wzrostu komórek, może odbywać się poprzez mechanizm wtórny, niezależny od szlaku AR [19].



Rysunek 6. Wpływ resweratrolu i DHT na aktywność AR w liniach komórkowych LNCaP oraz C4-2, gdzie RV - resweratrol [19]

Na uwagę zasługuje również fakt, że resweratrol wpływa bezpośrednio na szlak sygnalizacji EGFR (receptora naskórkowego czynnika wzrostu) hamując go, czego konsekwencją jest zwrotne hamowanie szlaku Akt [19]. Jest to szczególnie istotne, gdy mamy do czynienia z hormonoopornym rakiem prostaty, gdyż nadmierna aktywacja szlaku sygnałowego EGFR wpływa na nasilenie proliferacji komórek, hamowanie apoptozy, a także odgrywa rolę w procesie angiogenezy i migracji komórek nowotworowych, co z kolei prowadzi do progresji raka gruczołu krokowego [20]. Akt (serynowo-treoninowa kinaza, znana również pod nazwą kinaza białkowa B) również pełni rolę w hamowaniu procesu apoptozy. Oprócz tego, promuje zmiany metaboliczne w komórkach nowotworowych, a także reguluje procesy odpowiedzialne za wzrost tych komórek i ich migrację. Prawdopodobnie Akt odpowiada za zwiększenie ekspresji transportera Glut1, który transportuje glukozę niezbędną dla komórek nowotworowych. Dzięki temu, komórki te, mają zapewniony zapas energetyczny, który

wykorzystują do przeprowadzania różnych procesów, a prekursory metaboliczne kierowane są na szlak biosyntezy lipidów w celu wytwarzania błon dzielących się stale komórek [21].

4. Nowotwór gruczołu piersiowego

Nowotwór piersi dotyczy głównie kobiet, szczególnie zamieszkujących kraje wysoko cywilizowane, jak na przykład USA, Australia lub kraje Europy Zachodniej. Każdego roku jest on wykrywany u 1,5 miliona kobiet na świecie, z czego około 1/3 umiera. Ryzyko zachorowania wzrasta wraz z wiekiem. Istnieją rzadkie przypadki wykrycia nowotworu u kobiet poniżej 20 roku życia [22, 23].

Rak gruczołu piersiowego jest hormonozależny. Oznacza to, że jego rozwój spowodowany jest zaburzeniem stanu hormonalnego organizmu. Uważa się, że estrogeny przyczyniają się do szybkiego wzrostu guza, ponieważ w komórkach nowotworowych piersi zaobserwowano nadekspresję receptorów estrogenowych [23].

4.1. Mechanizmy działania estrogenów

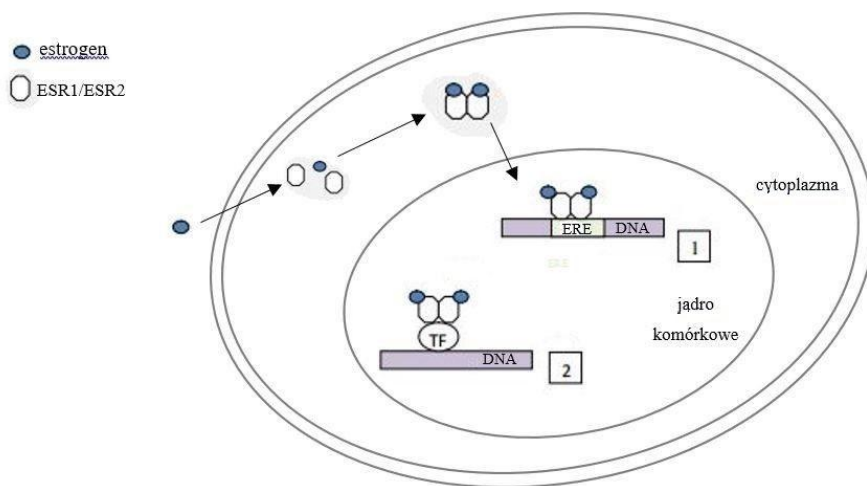
Wyróżnia się dwa rodzaje mechanizmów działania estrogenów – mechanizm genomowy oraz mechanizm niegenomowy [24].

Genomowy mechanizm działania estrogenów

Do wnętrza komórki estrogeny dostają się na drodze dyfuzji. Łączą się z obecnymi w cytoplazmie nieaktywnymi receptorami estrogenowymi typu 1 (ESR1) oraz typu 2 (ESR2) powodując tym ich aktywację. Następuje dimeryzacja receptora – tworzone są homodimery ESR1 lub ESR2 lub heterodimery. Różnią się one siłą aktywacji transkrypcji (homodimery ESR1 > homodimery ESR2, natomiast przy wysokim stężeniu estrogenów siła aktywacji transkrypcji heterodimerów zbliżona jest do homodimerów ESR1). Receptory estrogenowe są transportowane do jądra komórkowego. Następnie dimery wiążą się z ERE, czyli swoistym elementem odpowiedzi na estrogeny (estrogen response element) lub innymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. z białkiem SP1 (specificity protein 1). Genomowy mechanizm działania estrogenów został przedstawiony na rysunku 7 [24].

Niegenomowy mechanizm działania estrogenów

Mechanizm niegenomowy polega na wiązaniu estrogenów z receptorem estrogenowym znajdującym się w błonie komórkowej lub mitochondrium. Prowadzi to do aktywacji różnych szlaków sygnałowych, które odpowiadają za proliferację komórek, fosforylację czynników transkrypcyjnych, a także proces apoptozy [25].



Rysunek 7. Genomowy mechanizm działania estrogenów, gdzie: 1 – wiązanie dimera z ERE, 2 – wiązanie dimera z czynnikiem transkrypcyjnym (TF) [24]

4.2. Gonadotropiny przysadkowe

Gonadotropiny przysadkowe wytwarzane są przez przysadkę mózgową. Luteotropina (LH) stymuluje wydzielanie androgenów, natomiast folikulotropina (FSH) odpowiada za ich aromatyzację, co skutkuje powstaniem estrogenów. Uważa się, że gonadotropiny przysadkowe przyczyniają się do rozwoju nowotworu piersi. Taki wniosek wyciągnięto na podstawie zaobserwowanych w komórkach nowotworowych receptorów dla luteotropiny, które pobudzone przez LH pozwalają na produkcję estrogenów wewnątrz guza [23].

4.3. Mutacje w genach BRCA

W większości przypadków, mutacje w tych genach przyczyniają się do rozwoju dziedzicznego raka piersi. Białka pBrca1 oraz pBrca2 są ze sobą powiązane i odpowiadają za regulację procesów jądrowych, takich jak naprawa DNA, cykl komórkowy oraz transkrypcja. U kobiet z mutacją genu BRCA2 występują głównie nowotwory estrogenozależne, natomiast u kobiet z mutacją genu BRCA1 większość nowotworów (ok. 80%) to nowotwory estrogenoniezależne. W niektórych przypadkach nowotworów spowodowanych mutacją w genie BRCA1 (ok. 20%), białko pBrca1, które u zdrowych osób odpowiada za stymulowanie ekspresji receptora estrogenowego typu 1 przy jednoczesnym hamowaniu proliferacji spowodowanej przez ten receptor, może prowadzić do zwiększenia proliferacji komórek, a także transformacji nowotworowej [23,26,27,30]. Tabela 3 przedstawia procentowy stopień ryzyka wystąpienia nowotworu piersi u osób, w rodzinie których mutacje w genach BRCA1 lub BRCA2 wykryte zostały u krewnych, w zależności od wieku [28].

Tabela 3. Ryzyko wystąpienia nowotworu piersi u osób (w rodzinie których mutacje w genach BRCA1 lub BRCA2 wykryte zostały u krewnych) w zależności od wieku [28]

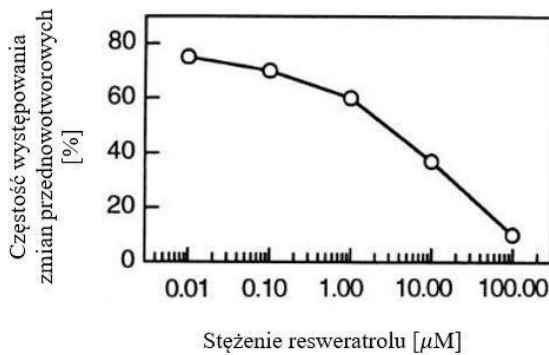
Wiek [lata]	Ryzyko zachorowania na nowotwór piersi [%]
40	20
60	55
>80	>80

4.4. Progesteron

Hormon ten bierze udział w prawidłowym rozwoju gruczołu sutkowego oraz przygotowuje go do laktacji. W przypadku 70% nowotworów dochodzi do nadekspresji receptora progesteronowego, jak również estrogenowego. Progesteron, jak wskazują badania przeprowadzone na organizmach modelowych, tj. myszach, szczurach oraz naczelnych, zwiększa stopień proliferacji guzów piersi [23].

4.5. Przeciwnowotworowe działanie resweratrolu – wyniki badań

W badaniu przeprowadzonym, między innymi, przez M. Jang, L. Cai i G. Udeani, wykazano, że resweratrol hamuje zmiany przednowotworowe indukowane DMBA w hodowli mysich komórek sutka. W doświadczeniu tym inkubowano z resweratrolu (o różnym stężeniu) mysie komórki sutka przez 10 dni. Trzeciego dnia przez dobę inkubowano komórki te z DMBA w celu wykształcenia zmian przednowotworowych. Po 14 dniach od zakończenia inkubacji zbadano częstość występowania zmian przednowotworowych. Uzyskane wyniki przedstawiono na poniższym wykresie (rysunek 8) [29].

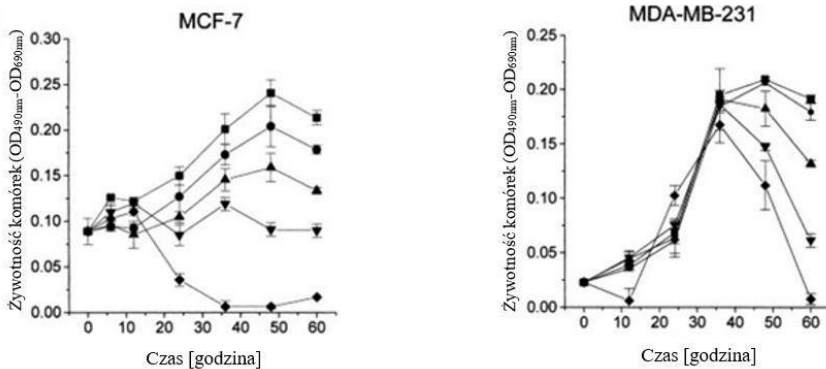


Rysunek 8. Wpływ resweratrolu na częstość występowania zmian przednowotworowych indukowanych DMBA w hodowli mysich komórek sutka [29]

Kolejne badanie przeprowadzone, między innymi, przez L. Corre, P. Fustier, N. Chalabi także wykazuje pozytywny wpływ resweratrolu na komórki nowotworowe piersi. Wykazali oni, że resweratrol reguluje ekspresję genu BRCA1 poprzez szlak receptora estrogenowego oraz inne, niepoznane szlaki, a także wpływa na różne

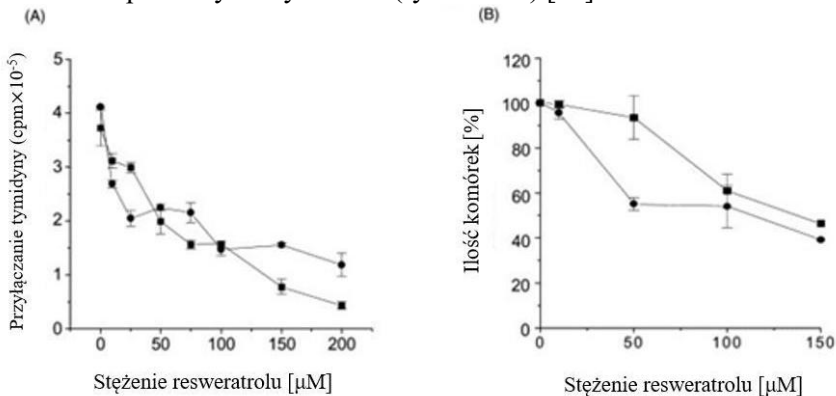
czynniki odpowiadające za regulację funkcjonowania białka BRCA1. Doświadczenie przeprowadzono na ludzkich liniach komórkowych raka piersi MCF-7, MDA-MB-231, HBL100 oraz linii komórkowej MCF10a. Miało ono na celu zbadanie wpływu resweratrolu na transkrypcję genów kooperujących z BRCA1 [30].

Warto również zwrócić uwagę na pracę E. Pozo-Guisado i innych. W przeprowadzonym badaniu wykazali, że resweratrol wpływa hamująco na wzrost ludzkich linii komórkowych raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231. Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach (rysunek 9) [31].



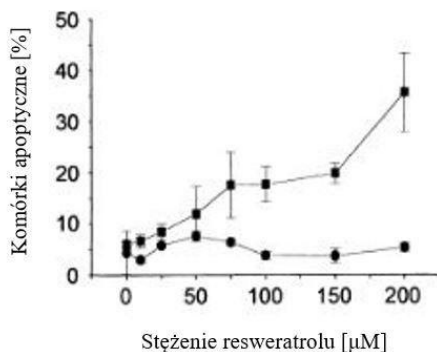
Rysunek 9. Wpływ resweratrolu na wzrost ludzkich linii komórkowych raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231, gdzie stężenie resweratrolu: 0 μM (■), 10 μM (●), 50 μM (▲), 100 μM (◐), 200 μM (◑) [31]

Następnie sprawdzono, czy powodem zmniejszenia wzrostu komórek było zahamowanie proliferacji. W tym celu zmierzono syntezę DNA. Zbadano również, czy ma to powiązanie ze śmiercią komórek. Uzyskane dane potwierdziły tę korelację dla wysokiego stężenia resweratrolu w obu liniach komórkowych, natomiast dla stężenia poniżej 50 μM dotyczyło to jedynie linii komórkowej MDA-MB-231. Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach (rysunek 10) [31].



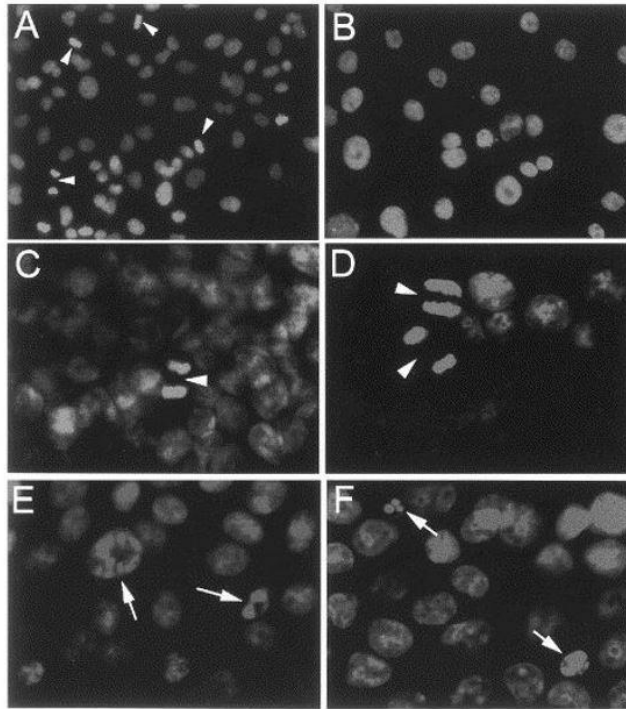
Rysunek 10. Wpływ resweratrolu na proliferację (A) oraz śmierć komórek (B), gdzie linia komórkowa MCF-7 (■) i MDA-MB-231 (●) [31]

Badacze starali się również sprawdzić, jak duży udział w śmierci komórek ma proces apoptozy. Określili to na podstawie stanu ploidalności komórek oraz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Badanie wykazało, że przy wyższych stężeniach, resweratrol wywołał apoptozę komórek jedynie w linii komórkowej MCF-7, osiągając poziom apoptozy prawie 40% dla 200 μM resweratrolu. Wyniki przedstawiono na poniższym wykresie (rysunek 11) [31].



Rysunek 11. Wpływ resweratrolu na indukcję apoptozy, gdzie linia komórkowa MCF-7 (■) i MDA-MB-231 (●) [31]

Następnie autorzy badania poddali analizie jądra komórkowe w komórkach nowotworowych linii MCF-7 oraz MDA-MB-231. Do tego celu wykorzystali mikroskop fluorescencyjny. Komórki poddawano działaniu resweratrolu przez 36 h w linii MCF-7 oraz 48 h w linii MDA-MB-231. Przy stężeniu resweratrolu 0 μM jądra komórkowe obu linii komórkowych wykazywały jednorodny rozkład chromatyny (rysunek 12A i 12C). Nie zaobserwowano również istotnych zmian dla stężenia 50 μM w linii komórkowej MCF-7 (rysunek 12D) oraz MDA-MB-231. Dopiero przy stężeniu resweratrolu wynoszącym 100 μM (rysunek 12E) oraz 150 μM (rysunek 12F) komórki wykazywały zmiany w postaci kondensacji chromatyny oraz fragmentacji jądra, co wskazuje na wejście komórek w szlak apoptozy. Dotyczy to jednak tylko linii komórkowej MCF-7, gdyż w linii komórkowej MDA-MB-231 przy stężeniu 150 μM (rysunek 12B) nie zaobserwowano zmian. Na uwagę zasługuje również fakt, że komórki wykazujące cechy mitotyczne w obu liniach komórkowych obecne przy braku resweratrolu (zaznaczone strzałkami na rysunku 12A i 12C), nie były obecne po potraktowaniu komórek resweratrolem o stężeniu wynoszącym 100 μM (rysunek 12E) oraz 150 μM (rysunek 12B i 12F). W linii komórkowej MCF-7 przy stężeniu 50 μM są one obecne (zaznaczone strzałkami na rysunek 12D). Jest to dowód na zdolność resweratrolu do hamowania mitozy zarówno w linii komórkowej MCF-7 jak i MDA-MB-231 przy stężeniu równym 100 μM lub wyższym [31].



Rysunek 12. Wpływ resweratrolu na linie komórkowe MCF-7 oraz MDA-MB-231: A i B – indukcja apoptozy w linii komórkowej MDA-MB-231, C-F – indukcja apoptozy w linii komórkowej MCF-7.

Stężenie resweratrolu: 0 μM (ryc. A i C), 50 μM (ryc. D), 100 μM (ryc. B i E), 150 μM (ryc. F) Strzałkami zostały zaznaczone komórki mitotyczne w stanie metafazy i anafazy, jak również komórki będące w stanie apoptozy (komórki o skondensowanej chromatynie oraz wykazujące fragmentację jądra).

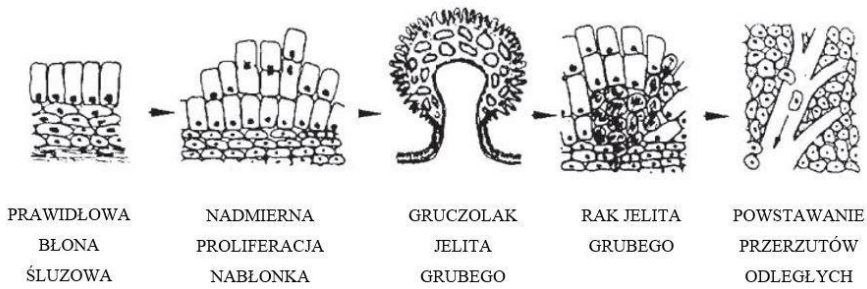
Powiększenie: 400 \times [31]

5. Nowotwór jelita grubego

Ryzyko zachorowalności na raka jelita grubego wzrasta wraz z wiekiem. Większość osób cierpiących na tę chorobę ma 50 lub więcej lat. Sporadyczne zachorowanie na ten typ nowotworu dotyczy 90-95% przypadków, natomiast podłoże genetyczne występuje jedynie w 5-10% przypadków [22].

5.1. Proces powstania nowotworu

Proces powstania nowotworu jelita grubego zaczyna się od rozwoju niewielkich rozmiarów ogniska dysplastycznego w nabłonku. Przekształca się on stopniowo w gruczolaka, który z czasem zmienia charakter na inwazyjny w postaci raka (rysunek 13). Dochodzi do tego wskutek zmian ekspresji genów, które odpowiadają za regulację procesów proliferacji oraz różnicowania się komórek. Prowadzi to do selekcji klonów komórkowych, które mogą się dzielić w sposób niekontrolowany, a dodatkowo nie podlegają one procesom apoptozy [32].



Rysunek 13. Schemat powstawania nowotworu jelita grubego [32]

5.2. Rodzaje niestabilności w rozwoju raka

Uważa się, że za proces powstawania raka jelita grubego (RJG) jest odpowiedzialnych kilka szlaków sygnałowych, które związane są z różnymi niestabilnościami [33].

Niestabilność chromosomalna

Jest rodzajem niestabilności genomowej. Niestabilność chromosomalna (CIN) związana jest z gromadzeniem się niepożądanych zmian chromosomalnych, zarówno liczbowych jak i strukturalnych (np. translokacje, utrata bądź zwielokrotnienie fragmentu lub całego chromosomu). Może przyczyniać się do promowania kancerogenezy wskutek zwiększenia liczby onkogenów lub usunięcia genów supresorowych. Niestabilność chromosomalna odpowiada za powstanie RJG w ok. 80% przypadków [33-35].

Niestabilność mikrosatelitarna

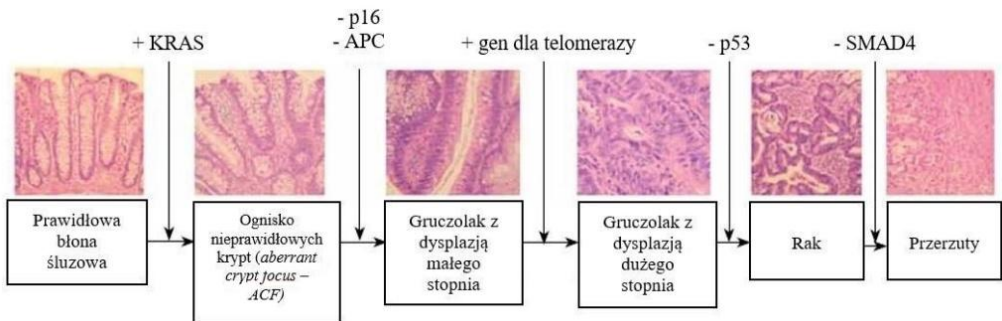
Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) jest rodzajem niestabilności genomowej. Sekwencje mikrosatelitarne znajdują się wewnątrz całego genomu i są powtarzającymi się sekwencjami DNA o długości 1-6 par zasad. Niestabilność ta wynika z mutacji jednego z genów MMR (MisMatch repair), które kodują białka biorące udział w naprawie nieprawidłowo połączonych zasad azotowych. Mutacja prowadzi do ich unieaktywnienia, co sprawia, że komórki nabywają fenotyp mutatorowy, a to skutkuje zwiększeniem prawdopodobieństwa wystąpienia mutacji spontanicznych. Niestabilność mikrosatelitarna odpowiada za wywołanie ok. 12% przypadków sporadycznego RJG [33-35].

Hipermetylacja wysp CpG

Wyspy CpG znajdują się w promotorach genów biorących udział w regulacji transkrypcji. Odpowiadają one za wyciszenie genów supresorowych. Wystąpienie nieprawidłowości na tym poziomie może prowadzić do zwiększenia proliferacji oraz zahamowania apoptozy [33].

5.3. Klasyczna ścieżka kancerogenezy

Klasyczna ścieżka związana jest z niestabilnością chromosomalną (CIN). Większość komórek wykazuje zmiany chromosomalne w postaci aneuploidii. Proces kancerogenezy rozpoczyna mutacja KRAS prowadząca do aktywacji szlaku MAPK, który powoduje transkrypcję genów odpowiadających, między innymi, za proliferację komórek i hamowanie procesu apoptozy. W ten sposób powstają ogniska nieprawidłowych krypt (ACF). Są one najwcześniejszymi zmianami morfologicznymi w procesie nowotworzenia. Następnie mają miejsce mutacje genu APC aktywujące szlak sygnałowy Wnt. Mutacje te zaburzają fosforylację β -kateniny, co uniemożliwia jej degradację w proteasomach. Przyczynia się to do jej nadmiernego gromadzenia i transportu do jądra komórkowego, gdzie kooperując z odpowiednim kompleksem białek staje się czynnikiem transkrypcyjnym, nasilając ekspresję genów. Skutkuje to pobudzeniem komórek do wzrostu. Dodatkowo uszkodzenie funkcjonowania białka p16 zwiększa proliferację komórek. Gruczolak z dysplazją dużego stopnia ulega przekształceniu do raka na skutek mutacji TP53. Mutacja ta odpowiada za nieprawidłowe działanie białka p53, czego skutkiem jest kumulacja zmian genetycznych w następnych pokoleniach. W tym samym czasie zostaje aktywowana również telomeraza, która zapobiega śmierci zmutowanym komórkom. Mutacje genu SMAD4 mają wpływ na wzrost oraz różnicowanie się komórek, a także prawdopodobnie biorą udział w powstawaniu przerzutów odległych. Schemat procesu kancerogenezy został przedstawiony na rysunku 14 [33, 37, 38].



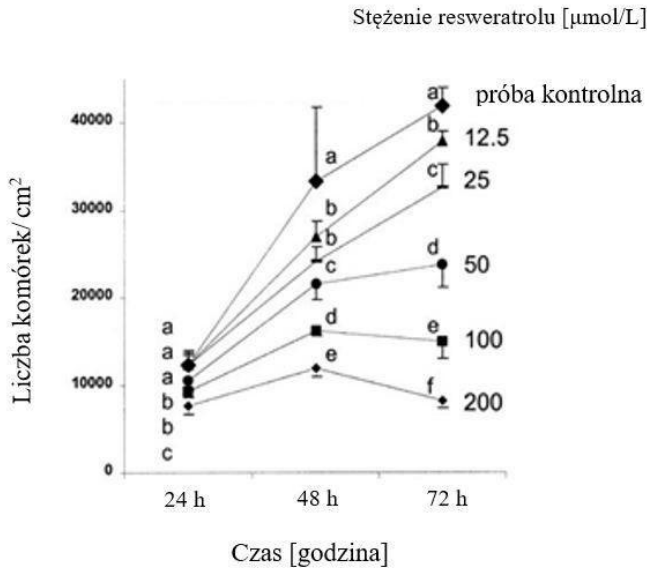
Rysunek 14. Schemat klasycznej ścieżki kancerogenezy według Vogelsteina, gdzie: „+” – mutacja aktywująca, „-” – mutacja dezaktywująca [33]

5.4. Przeciwnowotworowe działanie resweratrolu - wyniki badań

W badaniu przeprowadzonym przez Veronique S. Chachay i innych, przez 14 dni, przed chirurgicznym usunięciem nowotworu, podawano chorym ekstrakt z winogron, który zawierał 0,073-0,114 mg resweratrolu. Zaobserwowano, że resweratrol zahamował ekspresję genów, które biorą udział w procesie inicjacji kancerogenezy. Nie dotyczyło to jednak tkanki nowotworowej, lecz zdrowej błony śluzowej. Natomiast w przypadku dawki 500 mg oraz 1000 mg podawanej przez 8 dni zaobserwowano

zmniejszenie stopnia proliferacji komórek nowotworowych. Badacze sprawdzili również wpływ resweratrolu, w dawkach 500 mg-5000 mg przyjmowanych przez 29 dni, na czynnik IGF-1 oraz IGF-3, które biorą udział w procesie kancerogenezy. Okazało się, że resweratrol posiada zdolność do obniżenia ich stężenia w osoczu [36].

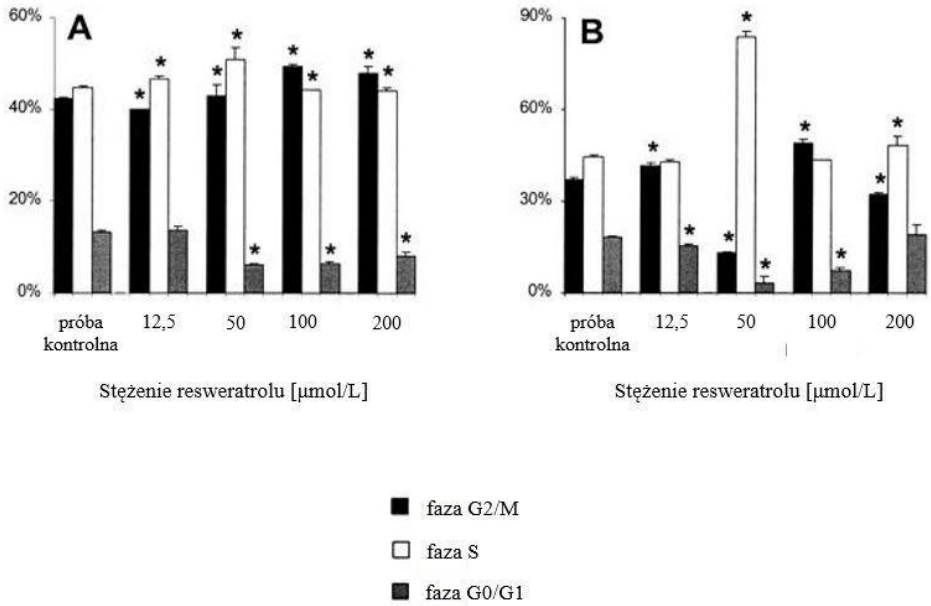
Warto zwrócić uwagę na pracę Freya Wolter i innych. Poddali oni badaniu zdolność resweratrolu do hamowania wzrostu komórek nowotworowych. Wykorzystali w tym celu linię komórkową ludzkiego raka okrężnicy Caco-2 oraz podłoża hodowlane o różnym stężeniu resweratrolu. Zaobserwowano, że przy stężeniu 100 $\mu\text{mol/L}$ liczba komórek nie wzrosła, natomiast przy stężeniu 200 $\mu\text{mol/L}$ liczba komórek uległa obniżeniu. Pomiaru dokonywano w ciągu 3 dni inkubacji. Wyniki zostały przedstawione na poniższym wykresie (rysunek 15) [39].



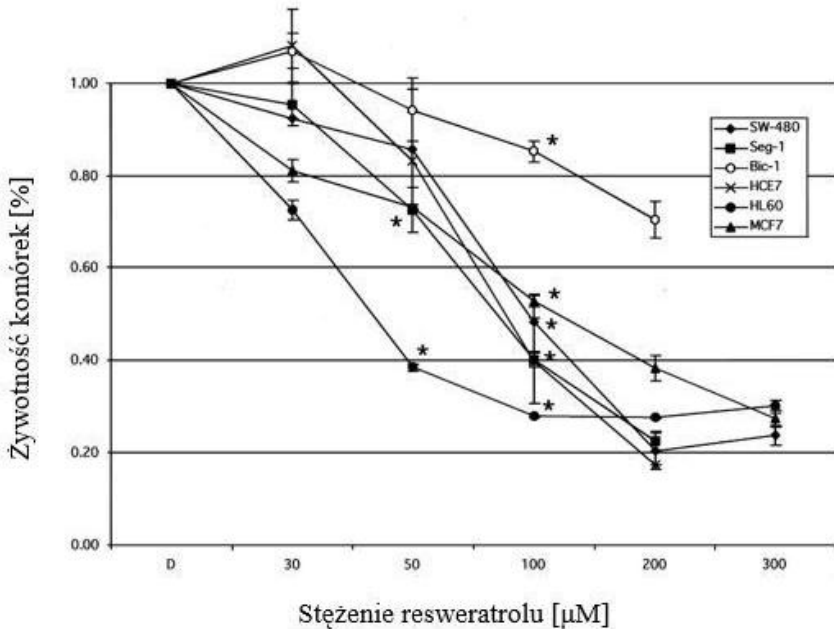
Rysunek 15. Wpływ różnych stężeń resweratrolu na liczbę komórek linii komórkowej Caco-2 [39]

Wykazano również, że resweratrol hamuje proliferację komórek linii Caco-2 oraz HCT-116. Przyczynia się także do zmniejszenia liczby komórek znajdujących się w fazie G2/M, co powoduje wzrost liczby komórek w fazie S. Jest to widoczne na poniższych wykresach (rysunek 16). Ponadto resweratrol obniżył poziom cykliny D1 oraz kinazy cdk4 mające wpływ na regulację cyklu komórkowego. W przypadku nowotworu ulegają one często nadekspresji [39].

Również badania przeprowadzone przez Andrew K. Joe i innych, na linii komórkowej raka okrężnicy SW480 potwierdziły zdolność resweratrolu do hamowania wzrostu komórek nowotworowych, a wyniki przedstawiono na poniższym wykresie (rysunek 17) [40].



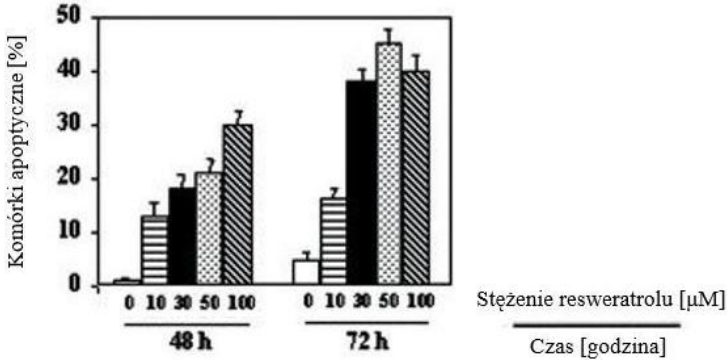
Rysunek 16. Wpływ różnych stężeń resweratrolu na poszczególne fazy cyklu komórkowego, A – linia komórkowa Caco-2, B – linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego HCT-116 [39]



Rysunek 17. Wpływ resweratrolu na wzrost komórek różnych linii komórkowych [40]

Jednocześnie w doświadczeniu tym wykazano, że resweratrol zatrzymuje cykl komórkowy w fazie S poprzez obniżenie poziomu ekspresji cykliny A oraz B1. Udo- wodniono także, że resweratrol obniża poziom ekspresji β -kateniny, przyczyniającej się do wzrostu komórek, po 24 h oraz 48 h przy stężeniu 300 μ M [40].

Kolejne badanie przeprowadzone przez Dominique Delmas i innych ukazały zdolność resweratrolu do indukcji apoptozy za pośrednictwem kaspazy w linii komórkowej SW480 (rysunek 18). Resweratrol doprowadził również do pojawienia się zmian apoptycznych w postaci kondensacji oraz fragmentacji chromatyny [41].



Rysunek 18. Wpływ różnych stężeń resweratrolu na liczbę komórek apoptycznych linii komórkowej SW480 [41]

6. Podsumowanie

Resweratrol jest cenną substancją ze względu na zdolność hamowania etapów kancerogenezy, tj. inicjacji, promocji oraz progresji, dzięki czemu może okazać się ważnym narzędziem w walce z nowotworami. Fitoauksyna ta występuje w wielu gatunkach roślin, co ułatwia wprowadzenie jej do codziennej diety, a to z kolei ma znaczenie w profilaktyce chorób nowotworowych. Przytoczone w niniejszej pracy badania różnych grup badawczych dowodzą, że resweratrol wpływa na regulację procesów ekspresji genów (np. BRCA1 lub AR), hamuje powstawanie zmian przednowotworowych, zmniejsza stopień proliferacji komórek nieprawidłowych, jest zdolny do indukcji apoptozy, a także do zatrzymania cyklu komórkowego. Wyniki te są obiecujące, lecz konieczne są dalsze badania w tym kierunku. Mimo wysokiego stopnia wchłaniania resweratrolu, charakteryzuje się on niską biodostępnością, ze względu na jego szybki metabolizm, dlatego warto również prowadzić badania mające na celu zwiększenie jego biodostępności. Ponadto należy sprawdzić jaki wpływ na organizm ludzki ma długoterminowe zażywanie tej substancji w wyższych dawkach, gdyż dotychczasowe badania obejmowały krótki okres czasu.

Podziękowania

Dziękuję mojej rodzinie za wiarę we mnie oraz wsparcie, a także za pomoc w realizacji marzeń.

Składam również serdeczne podziękowania dr Ewie Boniewskiej-Bernackiej za poświęcony czas i cenne wskazówki.

Literatura

1. Cancer Research UK <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer> (dostęp: 10.01.2017 r.).
2. Chorąży M., Kostowski W. *Wybrane zagrożenia zdrowotne*, NAUKA, 4, (2010), s. 47-52.
3. Surh Y.J. *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*, Nature Reviews Cancer, 3, (2003), s. 768-780.
4. Kopeć A., Piątkowska E., Leszczyńska T., Biezanowska-Kopeć R. *Prozdrowotne właściwości resweratrolu*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 18(5(78)), (2011), s. 5-15.
5. Zalega J., Szostak-Węgierek D. *Żywność w profilaktyce nowotworów. Część I. Polifenole roślinne, karotenoidy, błonnik pokarmowy*, Problemy Higieny i Epidemiologii, 94(1), (2013), s. 41-49.
6. Zdrojewicz Z., Belowska-Bień K. *Resweratrol – działanie i znaczenie kliniczne*, Advances in Clinical and Experimental Medicine, 14(5), (2005), s. 1051-1056.
7. Przysławski J., Dzieciół M. *Resweratrol – aktualny stan wiedzy*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna. Tom 45. 4, (2012), s. 1166-1174.
8. Mikula-Pietrasik J., Kuczmarska A., Książek K. *Biologiczna wielofunkcyjność resweratrolu i jego pochodnych*, 61(4), (2015), s. 336-343.
9. Lu Y., Shao D., Shi J., Huang Q., Yang H., Jin M. *Strategies for enhancing resveratrol production and the expression of pathway enzymes*, Applied Microbiology and Biotechnology, 100(17), (2016), s. 7407-7421.
10. Mikulski D. *Teoretyczne badanie biofizykochemicznych właściwości resweratrolu i jego pochodnych*, (2010).
11. Pivera B., Fera M., Vitracb X., Merillonb J.M., Dreanoa Y., Berthoua F., Lucasa D. *Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes*, Biochemical Pharmacology, 68(4), (2004), s. 773-782.
12. Saikoa P., Szakmaryb A., Jaegerc W., Szekeres T. *Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?* Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 658(1-2), (2008), s. 68-94.
13. Piotrkowska H. *Działanie przeciwnowotworowe metylowych analogów resweratrolu*, (2011).
14. Krishna Moorthy H., Venugopal P. *Strategies for prostate cancer prevention: Review of the literature*, Indian Journal of Urology, 24(3), (2008), s. 295-302.
15. Cegiela U., Korzeniowska H., Wilk A. *Osteoporoza po stosowaniu hormonalnej terapii antyandrogenowej raka gruczołu krokowego*, Annales Academiae Medicae Silesiensis, 66(2), (2012), s. 49-54.
16. Dobruch J. *Wpływ testosteronu na rozwój raka gruczołu krokowego*, Przegląd Urologiczny, 2(42), (2007), s. 52.
17. Szliszka E. *Nowa era terapii hormonalnej w raku gruczołu krokowego: abirateron i inne inhibitory CYP17*, Przegląd Urologiczny, 4(80), (2013), s. 8-13

18. Mitchell S.H., Zhu W., Young C.Y.F. *Resveratrol Inhibits the Expression and Function of the Androgen Receptor in LNCaP Prostate Cancer Cells*, *Cancer Research*, 59(23), (1999), s. 5892-5895.
19. Wang Y., Romigh T., He X., Orloff M.S., Silverman R.H., Heston W.D., Eng C. *Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines*, *Human Molecular Genetics*, 19(22), (2010), s. 4319-4329.
20. Deptała A. *Leczenie interferujące z funkcją receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) u chorych na raka gruczołu krokowego*, *Onkologia w Praktyce Klinicznej*, 7(4), (2011), s. 208-214.
21. Krześlak A. *Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 64, (2010), s. 490-503.
22. Krajowy Rejestr Nowotworów <http://onkologia.org.pl> (dostęp: 10.01.2017 r.)
23. Biela A., Pacholska-Bogalska J. *Nowotwory hormonozależne u kobiet*, *Nowa Medycyna*, 4, (2012), s. 76-81.
24. Skibińska I. *Molekularne mechanizmy działania 17 β -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na plemniki ludzkie*, (2011).
25. Świtalska M., Strządała L. *Niegenomowe działanie estrogenów*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 61, (2007), s. 541-547.
26. Badora A., Kaleta B., Nowara E., Sikora-Jopek M., Budryk M., Smok-Ragankiewicz A. *Mnogie nowotwory pierwotne u kobiet nosicielek mutacji genu BRCA1 – dwa przypadki kliniczne*, *Ginekologia Polska*, 84, (2013), s. 892-896.
27. Zbucka M., Leśniewska M., Knapp P., Wołczyński S. *Czy można wpływać na ryzyko wystąpienia raka piersi?* *Przegląd Menopauzalny*, 6, (2005), s. 70-75.
28. King M.C., Marks J.H., Mandell J.B., The New York Breast Cancer Study Group. *Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2*, *Science*, 302(5645), (2003), s. 643-646.
29. Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. *Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes*, *Science*, 275(5297), (1997), s. 218-220.
30. Le Corre L., Fustier P., Chalabi N., Bignon Y.J., Bernard-Gallon D. *Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines*, *Clinica Chimica Acta*, 344(1-2), (2004), s. 115-121.
31. Pozo-Guisadoa E., Alvarez-Barrientosb A., Mulero-Navarroa S., Santiago-Josefata B., Fernandez-Salguero P.M. *The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle*, *Biochemical Pharmacology*, 64(9), (2002), s. 1375-1386.
32. Groblewska M., Mroczko B., Szmikowski M. *Rola wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów w rozwoju raka jelita grubego*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 64, (2010), s. 22-30.
33. Bosman F.T., Yan P. *Patologia molekularna raka jelita grubego*, *Polish Journal of Pathology*, 65(4) (suplement 1), (2014), s. S1-S11.
34. Worthley D.L., Whitehall V.L., Spring K.J., Leggett B.A. *Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer*, *World Journal of Gastroenterology*, 13(28), (2007), s. 3784-3791.
35. Klusek J., Głuszek S., Klusek J. *Wybrane mutacje związane z dużym ryzykiem wystąpienia nowotworów jelita grubego*, *Przegląd Gastroenterologiczny*, 7(1), (2012), s. 1-6.

36. Chachay V.S., Kirkpatrick C.M.J., Hickman I.J., Ferguson M., Prins J.B., Martin J.H. *Resveratrol – pills to replace a healthy diet?* British Journal of Clinical Pharmacology, 72(1), (2011), s. 27-38.
37. Kowalczyk M., Pesta W., Zinkiewicz K., Pedrycz A., Paśnik K., Siermontowski P., Orłowski M., Kurpiewski W., Juśkiewicz W., Kowalczyk I. *Endoskopowe, histopatologiczne i molekularne wykładniki aberrant crypt foci (ACF)*, Polish Hyperbaric Research, 3(44), (2013), s. 97-109.
38. Tokarz P., Błasiak J. *Znaczenie metylacji DNA profilu epigenetycznego komórek jelita grubego w ich transformacji nowotworowej*, Postępy Biochemii, 59(3), (2013), s. 267-279
39. Wolter F., Akoglu B., Clausnitzer A., Stein J. *Downregulation of the Cyclin D1/Cdk4 Complex Occurs during Resveratrol-Induced Cell Cycle Arrest in Colon Cancer Cell Lines*, Journal of Nutrition, 131(8), (2001), s. 2197-2203.
40. Joe A.K., Liu H., Suzui M., Vural M.E., Xiao D., Weinstein I.B. *Resveratrol Induces Growth Inhibition, S-phase Arrest, Apoptosis, and Changes in Biomarker Expression in Several Human Cancer Cell Lines*, Clinical Cancer Research, 8(3), (2002), s. 893-903.
41. Delmas D., Rébé C., Lacour S., Filomenko R., Athias A., Gambert P., Cherkaoui-Malki M., Jannin B., Dubrez-Daloz L., Latruffe N., Solary E. *Resveratrol-induced Apoptosis Is Associated with Fas Redistribution in the Rafts and the Formation of a Death-inducing Signaling Complex in Colon Cancer Cells*, The Journal of Biological Chemistry, 278, (2003), s. 41482-41490.
42. Jasiński M., Mazurkiewicz E., Rodziewicz P., Figlerowicz M. *Flawonoidy – budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem roślin motylkowatych*, Biotechnologia, 2(85), (2009), s. 81-94.
43. Gambini J., Inglés M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., Mas-Bargues C., Abdelaziz K.M., Gomez-Cabrera M.C., Vina J., Borrás C. *Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2015, Article ID 837042, (2015), s. 13.
44. Walle T. *Bioavailability of resveratrol*, Annals of the New York Academy of Science, 1215, (2011), s. 9-15.
45. Espín J.C., García-Conesa M.T., Tomás-Barberán F.A. *Nutraceuticals: Facts and fiction*, Phytochemistry, 68(22-24), (2007), s. 2986-3008.
46. Cottart C.H., Nivet-Antoine V., Laguillier-Morizot C., Beaudoux J.L. *Resveratrol bioavailability and toxicity in humans*, Molecular Nutrition Food Research, 54(1), (2010), s. 7-16.
47. Crowell J.A., Korytko P.J., Morrissey R.L., Booth T.D., Levine B.S. *Resveratrol-Associated Renal Toxicity*, Toxicological Sciences, 82(2), (2004), s. 614-619.

Chemoprewencyjne działanie i zastosowanie resweratrolu w terapii wybranych nowotworów

Streszczenie

Resweratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilben) jest fitoauksyną syntezowaną przez wiele gatunków roślin. Związek ten jest wytwarzany w tkankach roślinnych w odpowiedzi na zakażenia grzybicze, uszkodzenie tkanki bądź promieniowanie UV. Szeroki zakres występowania ułatwia wprowadzenie go do codziennej diety. Substancja, którą jest resweratrol, może być wykorzystywana zarówno w chemoprewencji jak i podczas terapii nowotworów, które stanowią obecnie problem na skalę światową. Badania przeprowadzone *in vitro* oraz *in vivo* świadczą o jego wysokiej aktywności biologicznej. Wykazuje on m.in. działanie przeciwzapalne, przeciwmutagenne, a także antyproliferacyjne. Resweratrol wpływa na regulację procesów ekspresji genów (np. BRCA1 lub AR), hamuje powstawanie zmian przednowotworowych, zmniejsza stopień proliferacji komórek nieprawidłowych, jest zdolny do indukcji apoptozy oraz do zatrzymania cyklu komórkowego. W niniejszym rozdziale zgromadzone zostały informacje na temat polifenolu roślinnego, jakim jest resweratrol, koncentrując się na jego zdolności do hamowania procesów nowotworowych.

Słowa kluczowe: resweratrol, chemoprewencja, nowotwór gruczołu krokowego, nowotwór gruczołu piersiowego, nowotwór jelita grubego

Chemopreventive activity and use of resveratrol in cancer therapy selected

Abstract

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is a phytoalexin, synthesized by many types of plants. This compound is produced in tissues in response to damage, fungal infestations and UV radiation. Broad range of occurrence makes it easier to include into ones daily diet. Resveratrol, can be used in preventive chemotherapy, as well as an aid in the treatment of tumors which are a worldwide issue. Research conducted *in vitro* and *in vivo* provides proof of its biological activity. Its action is of a anti-inflammatory, anti-mutagenic, anti-proliferative nature. Resveratrol contributes to the process of gene expression (e.g. BRCA1 or AR), inhibits the formation of precancerous changes and reduces the proliferation of abnormal cells. Its capable of inducing apoptosis and halting the cell cycle. Informations gathered in this chapter pertain to resveratrol, a plant-derived polyphenol and its capability for inhibiting tumor growth.

Key words: resveratrol, chemoprevention, prostate cancer, breast cancer, colon cancer

Przeciwzapalne działanie galaktolipidu – składnika czynnego z owoców dzikiej róży, w chorobach zwyrodnieniowych stawów

1. Wstęp

W rezultacie poprawy nawyków żywieniowych, rozwoju medycyny oraz działań profilaktycznych, mających na celu ochronę przed chorobami cywilizacyjnymi, współczesna medycyna staje przed nowymi problemami, związanymi z terapią chorób wieku starszego, w rezultacie wzrastającej długości życia. Należą do nich (obok m.in. nadciśnienia, cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych czy otyłości) choroby reumatologiczne, w szczególności zaś choroby zwyrodnieniowe stawów. Intensywny rozwój farmakoterapii umożliwia skuteczne ograniczanie wywoływanych przez nie dolegliwości poprzez leczenie objawowe. Jednak standardowo stosowane w terapii leki, w szczególności niesteroidowe leki przeciwzapalne, stanowiące nadal jeden z podstawowych filarów leczenia chorób zwyrodnieniowych, wywołują szereg działań niepożądanych, dodatkowo obciążających organizm pacjenta. Z tego względu nauka coraz częściej poszukuje nowych środków leczniczych wśród substancji pochodzenia naturalnego, charakteryzujących się nie tylko skutecznością, ale i bezpieczeństwem stosowania oraz pozbawionych efektów ubocznych leków syntetycznych. Jednym z odkrytych w ten sposób związków jest galaktolipid – składnik czynny owoców dzikiej róży.

2. Charakterystyka i właściwości

Galaktolipid (GOPO, GLGPG) [(2S)-1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-oktadeka-9,12,15-trienoilo]-3-O-β-D-galaktopiranozylo glicerol] został po raz pierwszy wyizolowany z frakcji dichlorometanowej, uzyskanej z owoców duńskiej odmiany *Rosa canina* (*Rosaceae*) przez Larsen i wsp. [1]. Już wówczas autorzy [1] zauważyli, że wydzielony związek istotnie hamuje chemotaksję neutrofilii, co skierowało uwagę świata nauki na potencjalną możliwość wykorzystania galaktolipidu w leczeniu. Dotychczas owoce róży stanowiły przede wszystkim składnik mieszanek stosowanych w terapii przeziębienia, z uwagi na znaczną zawartość witamin (szczególnie witaminy C) i stanowiły surowiec ogólnie wzmacniający, wskazany w okresie rekonwalescencji [2]. Interesującym jest, że w medycynie ludowej surowiec pozyskiwany jest z różnych gatunków dziko rosnących róż. Tymczasem udowodniono, że najwyższą zawartością witaminy C charakteryzuje się *R. canina* (w porównaniu do *R. pouzini*, *R. corymbifera*, *R. glauca*) [3]. Natomiast jej duńska odmiana stanowi matrycę bogatą w galaktolipid [4]. Jakkolwiek wiadomo, że zawartość związków czynnych zależy nie tylko od gatunku, lecz również od genotypu roślin [5]. Choć owoc róży (*Rosae fructus*) stosowany był w leczeniu od wieków, dopiero izolacja GOPO jako składnika odpowiedzialnego za

¹ basia.m.krol@gmail.com

działanie przeciwzapalne stanowiła przełomowe odkrycie i punkt wyjściowy do licznych badań aktywności zarówno wydzielonego związku, jak i surowca – *Rosae fructus*.

Galaktolipid zlokalizowany jest w owocach właściwych [2, 6], tzw. orzeszkach znajdujących się wewnątrz owocu pozornego – szupinki. W przeciwieństwie do witamin, które występują głównie w skórce i miąższu owocostanu [2, 7]. Zawartość GOPO w owocach różnych odmian dzikiej róży jest zmienna.

Udowodniono, że GOPO jest związkiem termolabilnym i ulega rozkładowi już w temperaturze 40°C [8]. W przypadku preparatów leczniczych, których głównym składnikiem aktywnym ma być galaktolipid, proces produkcyjny ma kluczowe znaczenie. Stosowanie standardowych metod ekstrakcji grozi termicznym rozkładem związku i w rezultacie - jego niskim stężeniem (lub nawet nieobecnością) w otrzymanym produkcie. Stąd możliwe różnice w obserwowanych efektach klinicznych (lub ich braku) wskutek podaży dostępnych, lecz nieprawidłowo przygotowanych preparatów z *Rosae fructus*. Należy również zwrócić uwagę, że z punktu widzenia zastosowania surowca w lecznictwie, uwzględniając termolabilne właściwości zarówno GOPO jak i witamin, sporządzanie naparów z owoców dzikiej róży nie jest właściwym sposobem dostarczenia tych związków do organizmu. Obecnie w przygotowaniu preparatów zawierających galaktolipid z owoców *R. canina* stosuje się nowoczesne technologie, głównie suszenie rozpyłowe, które zapewnia ochronę GOPO przed rozkładem, a tym samym – jego obecność w produkcie finalnym [4]. Dodatkowo, mając na uwadze wysoką jakość otrzymywanego preparatu, należy uwzględnić również selekcję nasion uprawnych, warunki wzrostu i zbioru [9].

3. Mechanizm działania

Działanie przeciwzapalne galaktolipidu oraz owoców dzikiej róży wynika z szeregu mechanizmów. W badaniach Nam i wsp. [10] przeprowadzonych na liniach szczu- rzych komórek chrzęstnych stwierdzono, że aplikacja wyciągów wodnych z *R. canina* powoduje obniżenie ekspresji genu COX-2 (cyklooksygenaza-2), podczas gdy ekspresja genu COX-1 (cyklooksygenaza-1) pozostaje bez zmian. Natomiast Jager i wsp. [11] w modelu *in vitro* potwierdzili inhibicję aktywności zarówno COX-1 jak i COX-2 oraz hamowanie kaskady kwasu arachidonowego przez wyciągi organiczne z owoców róży, przy czym najwyższą aktywnością charakteryzował się wyciąg metanolowy. W rezultacie działania ekstraktów wodnych z *R. canina* wzrastała ekspresja genów kolagenu typu I oraz agrekanu – proteoglikanu odpowiadającego za strukturę chrząstek. Jednocześnie obserwowano zahamowanie ekspresji czynników katabolicznych, takich jak metaloproteiny wewnątrzkomórkowe (MMP), szczególnie metaloproteiny 13 (MMP13) [10, 12]. Dodatkowo udowodniono, że w rezultacie złożonych mechanizmów aktywności *Rosae fructus* u pacjentów z osteoartrozą dochodzi do obniżenia poziomu białka ostrej fazy stanu zapalnego (CRP) oraz stężenia kreatyniny w osoczu [3, 4, 7]

Schwager i wsp.[12] ocenili wpływ zarówno galaktolipidu jak i owocu dzikiej róży na procesy zapalne indukowane lipopolisacharydem (LPS) lub interleukiną-1 w hodowlach komórek ludzkich limfocytów peryferialnych, mysich makrofagów WAR264.7, komórek chrzęstniakomięsaka SE1353 oraz ludzkich pierwotnych chon-

drocytów stawowych (pobranych ze stawu kolanowego). Zaprojektowany model badawczy *in vitro* odzwierciedlał procesy zapalne *in vivo* w przebiegu chorób zwyrodnieniowych stawów oraz reumatoidalnego zapalenia stawów. Autorzy udowodnili, że w rezultacie działania surowca i galaktolipidu, w makrofagach oraz limfocytach dochodzi do osłabienia procesów zapalnych, obniżenia wydzielania tlenu azotu (NO) i prostaglandyny-2 (PGE2). Ponadto obniżeniu uległa sekrecja cytokin (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12) oraz chemokin (CCL5 / RANTES, CXCL10 / IP-10). Natomiast w hodowli komórek SE1353 oraz pierwotnych chondrocytów ludzkich, obserwowano znaczący spadek poziomów białek prozapalnych, m.in. białek zapalnych makrofagów MIP-2, MIP-3 α , metaloproteinaz wewnątrzkomórkowych (MMP-1, MMP-3, MMP-13) oraz agrekanazy (ADAMTS-4) [12]. Autorzy podkreślają, że owoc róży charakteryzował się silniejszym działaniem w porównaniu do izolowanego galaktolipidu, co wskazuje na obecność w surowcu dodatkowych związków o aktywności przeciwzapalnej i chondro-ochronnej [12]. Również Wenzig i wsp. [13] oceniając działanie przeciwpalne całych owocostanów dzikiej róży w porównaniu do owocostanów pozbawionych owoców właściwych, doszli do wniosku, że w aktywność tę w sposób istotny włączają się lipofilowe składniki matrycy roślinnej, inne niż galaktolipid, m.in. nienasycone kwasy tłuszczowe. Natomiast w szeregu kolejnych prac [1, 14, 15], będących wynikiem badań prowadzonych w modelach *in vitro* oraz *in vivo* autorzy wskazują galaktolipid jako główny związek aktywny surowca, odpowiadający za hamowanie chemotaksji oraz chemoluminescencji peryferialnych leukocytów ludzkich.

Jeong i wsp. [16] w zwierzęcym modelu zapalenia stawów indukowanego jodooctanem monosodowym (MIA) potwierdzili, że sproszkowane owoce dzikiej róży (500 mg/kg m.c.) wykazują efekt przeciwpalny. Dodatkowo ocena chrząstek stawowych, prowadzona z użyciem mikrotomografii komputerowej (micro-CT) ujawniła, że w rezultacie 3-tygodniowej kuracji zmniejszeniu uległa liczba luk erozyjnych w tkance chrzęstnej, co dowodzi, że *Rosae fructus* posiada efekt ochronny wobec uszkodzeń chrząstek stawowych, powstających w wyniku rozwijającego się zapalenia stawów [16].

Istotny element mechanizmu działania stanowi aktywność przeciwutleniająca surowca i zawartych w nim związków czynnych [3, 4, 10, 17, 18]. W owocu róży obecne są liczne polifenole, w tym flawonoidy (m.in. kwercetyna) oraz katechiny [3, 19], jak również witamina C [2, 3]. Wysoka zawartość tych związków jest bezpośrednio związana z obserwowanym działaniem antyoksydacyjnym [3, 13]. Również galaktolipid posiada zdolność zmiatania wolnych rodników oraz nasilania aktywności enzymów anty-utleniających (m.in. dysmutazy nadtlenkowej oraz katalazy), co potwierdzono także w odniesieniu do całego surowca – *Rosae fructus* [17]. W rezultacie dochodzi do zahamowania stresu oksydacyjnego i ograniczenia wywołanych nim uszkodzeń komórek [17].

W badaniach *in-vivo* potwierdzono, że redukcja procesów zapalnych jest efektem synergistycznego wpływu zespołu związków czynnych z *Rosae fructus*, a siła działania surowca jest porównywalna z indometacyną – standardowym lekiem przeciwpalnym i przeciwbólowym z grupy niesteroidowych leków przeciwpalnych (NLPZ), stosowanym w terapii chorób reumatoidalnych [18].

4. Badania kliniczne

Zainteresowanie naukowców aktywnością przeciwzapalną galaktolipidu i owoców dzikiej róży, obiecujące wyniki badań *in vitro* i *in vivo* w modelach zwierzęcych oraz możliwość potencjalnego zastosowania w terapii chorób reumatoidalnych, zaowocowały szeregiem badań klinicznych.

Rein i wsp. [20] przeprowadzili ocenę działania preparatu Hyben Vital – standaryzowanego proszku z owoców duńskiej odmiany *R. canina* – na grupie 112 pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą zwyrodnieniową stawu biodrowego, kolanowego, barkowego lub stawów dłoni. Pacjentom podawano 5 x 0,5 g preparatu dziennie, w dwóch dawkach podzielonych. Po 3 miesiącach obserwowano znaczący spadek dolegliwości bólowych, sztywności stawu z jednoczesną poprawą nastroju i komfortu życia [20], natomiast w profilu biochemicznym – obniżenie stężenia białek ostrej fazy stanu zapalnego (CRP) [20].

Skuteczność standaryzowanego preparatu z owoców *R. canina* potwierdzono również na grupie 100 pacjentów w wieku 65 lat, cierpiących na zwyrodnieniową chorobę stawu kolanowego lub biodrowego w stadium zaawansowanym, oczekujących na zabieg wymiany stawu na endoprotezę [14]. Pacjenci otrzymywali sproszkowane owoce *R. canina* w postaci preparatu Hyben Vital przez 4 miesiące (5 x 0,5 g preparatu dziennie, w dwóch dawkach podzielonych). Po tym czasie stwierdzono wzrost ruchomości stawów o 40% oraz spadek dolegliwości bólowych (65,5%) [14].

Badania obejmujące 32 pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów dłoni, którym podawano preparat Hyben Vital przez 3 miesiące (5,0 g preparatu dziennie w dwóch dawkach podzielonych), wykazały znaczący spadek dolegliwości bólowych (88%) oraz wzrost ruchomości stawów dłoni o 38% (na podstawie oceny zdolności do wykonywania 15 różnych czynności) [12]. Pacjenci deklarowali również zmniejszenie sztywności stawów oraz uczucia dyskomfortu związanego z objawami choroby [12].

Kolejne badania obejmowały grupę 47 pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego lub biodrowego w stadium początkowym, którym podawano standaryzowany proszek z owoców róży (Litozin) (5,0 g preparatu dziennie w dwóch dawkach podzielonych) przez okres 3 miesięcy [8]. W porównaniu do grupy otrzymującej placebo, w grupie badanej obserwowano zmniejszenie dolegliwości bólowych, obniżenie dawkowania leków przeciwbólowych o 40%, zmniejszenie sztywności stawów oraz poprawę ich ruchomości [8]. Ponadto, według oceny pacjentów, stopień zaawansowania choroby uległ złagodzeniu, zaś komfort życia (zdolność do wykonywania czynności codziennych) – znaczącej poprawie [8].

Również ocena efektów działania złożonego preparatu roślinnego Rosaxan, zawierającego obok owoców dzikiej róży (*R. canina*), wyciąg z pokrzywy (*Urtica dioica*) oraz hakorośli (czarciego pazura, *Harphagophytum procumbens*), prowadzona na grupie pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych potwierdziła jego korzystny wpływ na jakość życia pacjentów [21].

Natomiast odmienne rezultaty otrzymali Kirkeskov i wsp. [22]. Autorzy przeprowadzili ocenę efektów działania sproszkowanego owocu dzikiej róży (10,5 g dziennie, standaryzowany preparat Litozin) na grupie 20 pacjentek cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów. Po 28 dniach terapii nie obserwowali zmian w poziomie białek ostrej fazy (CRP) oraz enzymów antyutelniających: dysmutazy nadtlenkowej,

peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej i katalazy [22]. Należy jednak zwrócić uwagę, że w porównaniu do pozostałych badań klinicznych [1, 8, 14, 20], czas trwania eksperymentu prowadzonego przez Kirkeskov i wsp. [22] był stosunkowo krótki. Udowodniono bowiem skuteczność preparatów z owocu dzikiej róży w długotrwałym stosowaniu: 3-4 miesiące [1, 8, 14, 20]. Natomiast rezultaty uzyskane przez Kirkeskov i wsp. [22] wskazują, że po 28 dniach terapii prawdopodobnie zespół związków czynnych *Rosae fructus* jeszcze nie rozwinął działania, co może potwierdzać konieczność długotrwałego stosowania surowca w celu osiągnięcia efektów klinicznych. Dodatkowo, obok oceny biochemicznej, autorzy [22] nie prowadzili subiektywnej obserwacji jakości życia pacjentów, istotnej w przypadku chorób reumatologicznych. Wiadomo, że ulega ona znaczącej poprawie po 3-4 miesiącach stosowania terapii [1, 8, 14, 20]. W świetle powyższych badań trudno natomiast określić moment, w którym jakość życia pacjentów zaczyna ulegać poprawie, niezależnie od wyników analizy biochemicznej.

Istotnym aspektem prowadzonych badań jest fakt, że preparaty zawierające sproszkowany owoc dzikiej róży charakteryzują się nie tylko wysoką skutecznością terapeutyczną w leczeniu chorób reumatoidalnych, lecz są również pozbawione działań niepożądanych, wywoływanych przez standardowo stosowane w farmakoterapii niesteroidowe leki przeciwzapalne [17]. Metaanaliza badań klinicznych potwierdziła, że w przeciwieństwie do NLPZ, *Rosae fructus* nie działa drażniąco wobec śluzówki żołądka i nie prowadzi do rozwoju choroby wrzodowej. Składniki czynne surowca nie wpływają także na krzepliwość krwi, nie hamują agregacji płytek krwi, pozostając również bez wpływu na fibrynolizę [17]. W rezultacie są skuteczne i doskonale tolerowane przez pacjentów [17, 23]. Mogą być stosowane u osób, które nie chcą/nie mogą stosować standardowego leczenia syntetycznymi preparatami. Ponadto u pacjentów stosujących leczenie z użyciem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, włączenie jako wspomagających roślinnych preparatów leczniczych, zawierających owoce *R. canina* skutkuje obniżeniem ich dawek [17, 23].

5. Podsumowanie

Badania aktywności biologicznej związków czynnych obecnych w owocach *R. canina*, prowadzone w modelach *in vitro* oraz *in vivo* potwierdziły możliwość skutecznego stosowania odpowiednio przygotowanych, standaryzowanych preparatów z surowca w leczeniu chorób zwyrodnieniowych stawów. Istotę efektywnej terapii stanowi synergistyczny wpływ różnych metabolitów wtórnych obecnych w *R. canina*, a siła działania ujawnia się w długotrwałym stosowaniu. Udowodniono, że zespół związków czynnych owocu dzikiej róży charakteryzuje się nie tylko wysoką skutecznością ale i bezpieczeństwem stosowania, stanowiąc ważną alternatywę dla standardowej farmakoterapii chorób reumatologicznych, opartej na lekach syntetycznych.

Literatura

1. Larsen E., Kharazmi A., Christensen L.P., Christensen S.B. *An antiinflammatory galactolipid from rose hip (Rosa canina) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro*. Journal of Natural Products 66 (2003), str. 994-995.
2. Matławska I. *Farmakognozja*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (2006).

3. Jiménez S., Jiménez-Moreno N., Luquin A., Laguna M., Rodríguez-Yoldi M.J., Ancín-Azpilicueta C. *Chemical composition of rosehips from different Rosa species: an alternative source of antioxidants for the food industry*. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment (2017), str. 1-10.
4. Kharazmi A. *Laboratory and preclinical studies on the anti-inflammatory and anti-oxidant properties of rosehip powder - Identification and characterization of the active component GOPO®*. Osteoarthritis and Cartilage 16 (2008), str. 5-7.
5. Bhave A., Schulzova V., Chmelarova H., Mrnka L., Hajslova J.. *Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds*. Journal of Food and Drug Analysis (2016), str. 681-690.
6. Gawron-Gzella A., Dudek-Makuch M. *Róża – źródło witamin i innych związków biologicznie czynnych*. Herba Polonica 53 (2) (2007), str. 139-140.
7. Kohlmunzer S. *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL(2000).
8. Winther K., Apel K., Thamsborg G. *A powder made from seeds and shells of a rose-hip subspecies (Rosa canina) reduces symptoms of knee and hip osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. Scandinavian Journal of Rheumatology 34 (2005), str. 302-308.
9. Nybom H., Werlemark G. *Realizing the potential of health-promoting rosehips from dogroses (Rosa sect. caninae)*. Current Bioactive Compounds 13 (2017), str. 3-17.
10. Nam D.E., Lee M.J., Kang N., Park G., Lee J. *A comparative study of rose hip extracts on osteoarthritis in cartilage cells*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 41 (2012), str. 1663-1670.
11. Jäger A.K., Eldeen I.M.S., Van Staden J. *COX-1 and -2 activity of rose hip*. Phytotherapy Research 21 (2007), str. 1251-1252.
12. Schwager J., Hoeller U., Wolfram S., Richard N. *Rose hip and its constituent galactolipids confer cartilage protection by modulating cytokine, and chemokine expression*. BMC Complementary and Alternative Medicine 11 (2011), str. 105-119.
13. Wenzig E.M., Widowitz U., Kunert O., Chrubasik S., Bucar F., Knauder E., Bauer R. *Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (Rosa canina L.) preparations*. Phytomedicine 15 (2008), str. 826-35.
14. Warholm O., Skaar S., Hedman E., Mølmen H.M., Eik L.. *The effects of a standardized herbal remedy made from a subtype of Rosa canina in patients with osteoarthritis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial*. Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental 64 (2003), str. 21-31.
15. Winther K., Kharazmi A., Hansen A.S.V, Falk-Rønne J. *A randomised placebo controlled double blind study on the effect of subspecies of rose hip (Rosa canina) on the immune system, working capacity and behaviour of horses*, p. 283-287. W: Ellis A.D., Longland A.C., Coenen M., Miraglia N., editors. *The Impact of Nutrition on the Health and Welfare of Horses*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers (2010). ISBN 978-90-8686-155-2.
16. Jeong C., Bae D., Lim H., Lee M., Kang N., Kim S.. *Ameliorative effects of green tea seed extract with rose hip powder (Rosa canina L.) on regulation of pain and inflammatory cytokines in a rat model of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis*. Animal Cells and Systems 19 (2015), str. 69-77.
17. M. Cohen. *Rosehip: An evidence based herbal medicine for inflammation and arthritis*. Australian Family Physician 41 (2012), str. 495-8.
18. Lattanzio F., Greco E., Carretta D., Cervellati R., Govoni P., Speroni E.. *In vivo anti-inflammatory effect of Rosa canina L. extract*. Journal of Ethnopharmacology 137 (2011), str. 880-885.

19. Türkben C., Uylaşer V., Incedayi B., Çelikkol I.. *Effects of different maturity periods and processes on nutritional components of rose hip (Rosa canina L.)*. Journal of Food, Agriculture and Environment 8 (2010), str. 26-30.
20. Rein E., Kharazmi A., Winther K. *A herbal remedy, Hyben Vital (stand. powder of a subspecies of Rosa canina fruits), reduces pain and improves general wellbeing in patients with osteoarthritis - A double-blind, placebo-controlled, randomised trial*. Phytomedicine 11 (2004), str. 383-91.
21. Moré M., Gruenwald J., Pohl U, Uebelhack R. *A Rosa canina – Urtica dioica – Harpagophytum procumbens/zeyheri Combination Significantly Reduces Gonarthrosis Symptoms in a Randomized, Placebo-Controlled Double-Blind Study*. Planta Medica (2017), in press
22. Kirkeskov B., Christensen R., Bügel S., Bliddal H., B. Danneskiold-Samsøe, L.P. Christensen, et al. *The effects of rose hip (Rosa canina) on plasma antioxidative activity and C-reactive protein in patients with rheumatoid arthritis and normal controls: A prospective cohort study*. Phytomedicine 18 (2011) 953-8.
23. Schüllner F., Mur E. *Phytotherapy in rheumatology*. Phytotherapie in der Rheumatologie 33 (2012), str. 158-67.

Przeciwpalające działanie galaktolipidu – składnika czynnego owoców dzikiej róży w chorobach zwyrodnieniowych stawów

Streszczenie

Galaktolipid (GOPO) to składnik aktywny owoców dzikiej róży, po raz pierwszy wyizolowany z duńskiej odmiany *Rosa canina* (*Rosaceae*). W toku badań prowadzonych na przestrzeni lat ujawniono, że posiada on silne działanie przeciwpalające, zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo*. Rozpoznano mechanizmy obserwowanej aktywności, obejmujące m.in. hamowanie aktywności cyklooksygenaz (COX-1 i COX-2), hamowanie kaskady kwasu arachidonowego, produkcji mediatorów prozapalnych oraz chemotaksji leukocytów. Synergistyczne działanie przeciwpalające galaktolipidu i innych związków czynnych, zawartych w owocach *Rosa canina* jest porównywalne z niesteroidowymi lekami przeciwpalającymi (NLPZ), pozbawione jednak wywoływanych przez nie licznych działań niepożądanych. Badania kliniczne prowadzone na grupach pacjentów z chorobami zwyrodnieniowymi stawów udowodniły, że stosowanie preparatów z owoców dzikiej róży skutkuje zmniejszeniem odczuwania bólu, poprawą ruchomości stawów a tym samym – komfortu życia pacjentów. Umożliwia również zmniejszenie dawkowania NLPZ stosowanych w terapii chorób zwyrodnieniowych.

Słowa kluczowe: galaktolipid, *Rosa canina*, aktywność przeciwpalająca, mechanizm działania, choroby zwyrodnieniowe stawów

Anti-inflammatory activity of galactolipid – the active compound from *Rosae fructus* in rheumatoid arthritis

Abstract

Galactolipid (GOPO) is the active compound present in dog rose hips. It was firstly reported and isolated from Denmark *Rosa canina* (*Rosaceae*). Experiments revealed that GOPO possess significant anti-inflammatory activity, reported in both *in vitro* and *in vivo*. The mechanisms of action were recognised. GOPO as well as rosehips inhibit COX-1 and COX-2 activity, arachidonic acid cascade, production of pro-inflammatory mediators and leucocytes chemotaxy. Synergistic effect of galactolipid and other active compounds from rosehips is comparable with NSAIDs, but with no severe side effects caused by synthetic drugs. Clinical trials on the patients with osteoarthritis proved that application of rosehips preparations results in lowering the pain, improved joint mobility and thus – quality of life. It also enabled decreasing the dosage of NSAIDs.

Key words: galactolipid, rosehip, anti-inflammatory activity, mechanism, osteoarthritis

Antrachinony **– związki o wielokierunkowej aktywności biologicznej**

1. Wstęp

W ostatnich latach przedmiotem częstych badań są związki pochodzenia roślinnego. Dzięki rozwojowi wiedzy oraz techniki, fitoterapia wykorzystując surowce roślinne do izolacji licznych naturalnych substancji leczniczych, stała się ważną gałęzią medycyny. Związki roślinne różniące się od siebie budową chemiczną, mechanizmem działania, a zwłaszcza cytotoksycznością, mogą być wykorzystane między innymi w leczeniu onkologicznym.

Obecnie szczególnie dużą uwagę skupia się na antrachinonach występujących w roślinach z rodzin: *Polygonaceae*, *Rhamnaceae*, *Liliaceae* oraz *Fabacea*. Związane jest to z faktem, że posiadają one liczne właściwości biologiczne, które były doceniane już w starożytności. Niniejsza praca zawiera przegląd istotnych wyników badań *in vitro* i *in vivo* nad antrachinonami oraz próbę odpowiedzi na pytanie czy mogą one stanowić nową grupę związków o szerokim zastosowaniu farmakologicznym.

2. Budowa i występowanie antrachinonów

Antrachinony są pochodnymi trójpierścieniowego związku aromatycznego antracenu, różniące się grupami bocznymi (Rysunek 1) [1].

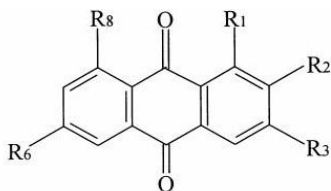
Do podstawników wchodzących w skład budowy szkieletu antrachinonów należą między innymi grupy hydroksylowe, metylowe oraz karboksylowe. Antrachinony są substancjami stałymi, występującymi najczęściej w postaci pomarańczowych kryształów (Fotografia 1), w formie glikozydów. Część cukrową stanowi glukoza lub ramnoza. Działanie antrachinonów zależy od różnic w ich budowie chemicznej takich jak obecność grupy hydroksylowej przyłączonej w pozycjach C-1 i C-8 pierścienia aromatycznego, podstawnika w pozycji C-3 lub liczby cząsteczek cukru [2 -4].

¹ wojciech.trybus@ujk.edu.pl, Zakład Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

² tkrol@cj.k.pl, Zakład Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

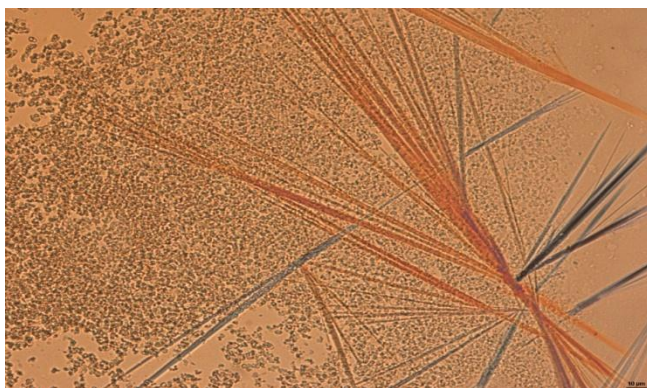
³ ewa.trybus@ujk.edu.pl, Zakład Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

⁴ anna.kopacz-bednarska@ujk.edu.pl, Zakład Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach



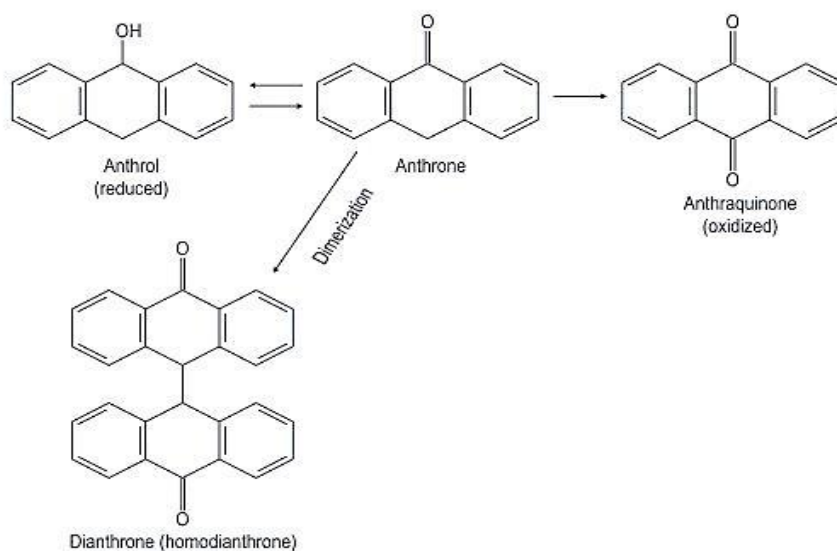
Anthraquinone	$R_1=R_2=R_3=R_6=R_8=H$
Alizarin	$R_1=R_2=OH, R_3=R_6=R_8=H$
Aloe-emodin	$R_1=R_8=OH, R_2=R_6=H, R_3=CH_2OH$
Chrysophanol	$R_1=R_8=OH, R_2=R_6=H, R_3=CH_3$
Emodin	$R_1=R_6=R_8=OH, R_2=H, R_3=CH_3$
Rhein	$R_1=R_8=OH, R_2=R_6=H, R_3=COOH$

Rysunek 1. Wzór strukturalny antrachinonów [12]



Fotografia 1. Krystaliczna struktura antrachinonów obserwowana w soku Aloe barbadensis przy użyciu kontrastu Nomarskiego (Mikroskop Nikon Eclipse 80i) (Fot. W. Trybus) pow. 400×

Charakterystyczną cechą antrachinonów jest duża zdolność do ulegania przemianom oksydacyjnym (Rysunek 2), które zachodzą zarówno podczas suszenia, jak i przechowywania materiału roślinnego, co sprawia że związki te mogą występować w surowcach roślinnych na różnych stopniach utlenienia [3, 4].



Rysunek 2. Schemat utleniania i redukcji antrachinonów [5]

Antrachinony występują w liściach, korzeniach i kłączach roślin wyższych z rodziny *Polygonaceae*, których przykładem jest Rzewień lekarski – *Rheum officinale* Baill., Rdest japoński – *Polygonum cuspidatum* Houtt., Szczaw żółty – *Rumex patientia* L. [6 - 8], czy Rzewień dłoniasty – *Rheum palmatum* L. Występują także w roślinach z rodziny *Rhamnaceae* Szakłaku pospolitym (*Rhamnus cathartica* L.), Kruszynie pospolitej (*Rhamnus frangula* L.) [2,9], *Liliaceae* (Aloes zwyczajny – *Aloe barbadensis* Mill., Aloes drzewkowaty – *Aloe arborescens* Mill.) [10,11], *Fabaceae* (Strączyniec – *Cassia tora* L.) [12]. Zidentyfikowano je również w roślinach z rodzin motylkowatych i astrowatych m.in. w Sałacie siewnej (*Lactuca sativa* L.), Grochu zwyczajnym (*Pisum sativum* L.), Fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) [13] oraz Astrze tatarskim (*Aster tataricus* L.) [14]. Są również produkowane jako wtórne metabolity przez pleśnie (*Penicillium islandicum* Sopp, Kropidlak zielony (*Aspergillus glaucus* L., *Aspergillus wentii* Wehmer) i grzyby wyższe [15,16].

Przykładem roślin których surowce szeroko są stosowane w przemyśle farmaceutycznym jest *Aloe barbadensis* i *Aloe arborescens*, *Rhamnus frangula*, *Rheum palmatum*, *Polygonum cuspidatum* oraz *Rumex patientia*. Stanowią one jedne z najstarszych i najbardziej znanych roślin stosowanych już od starożytności w medycynie [15]. Rośliny te różnią się zarówno składem, jak i stężeniem poszczególnych antrachinonów, a rośliną szczególnie bogatą w omawiane związki jest aloes. Wykazano, że około 40% soku aloesu stanowi aloina A i B, aloe-emodyna (Rysunek 2A) (produkt degradacji aloiny) oraz emodyna (Rysunek 2B) [10]. W żelu aloesowym związki te występują zaledwie w śladowych ilościach [17].

Stosując metody ultracytochemiczne stwierdzono, że aloina produkowana jest w plastydach miększu asymilacyjnego, a następnie transportowana do cytoplazmy, gdzie gromadzona jest w wakuolach [18]. Badania Li i wsp. [19] oraz Wang'a i wsp. [20] wykazały, że związki te magazynowane są głównie w komórkach wiązki przewodzącej (Fotografia 2). Aloina zlokalizowana w epidermie liści aloesu naturalnie występuje w postaci mieszaniny diastereoizomerów aloiny A i B [21], z których wytwarzana jest aloina B, a jej przekształcenie do aloiny A zachodzi głównie nieenzymatycznie [22]. Aloe-emodyna występuje zazwyczaj w połączeniu z glikozydami lub w postaci formy zredukowanej [17,23], jako aktywny metabolit aloiny występuje w świeżym materiale w bardzo małych ilościach. Wyższą koncentrację aloiny w liściach aloesu zaobserwowano w czasie zwiększonej ich konsumpcji przez owady i zwierzęta wyższe oraz w czasie poprzedzającym bezpośrednio okres kwitnienia [22, 24].

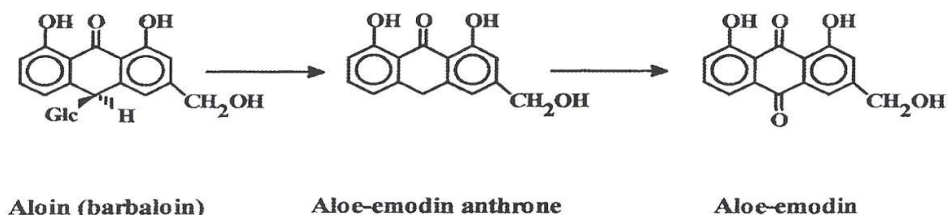


Fotografia 2. Przekrój poprzeczny przez liść *Aloe barbadensis* (Fot. E. i W. Trybus). Pow. $10 \times$
1 – epiderma, 2 – komórki miększu asymilacyjnego, 3 – wiązki naczyniowe – miejsce gromadzenia aloiny,
4 – komórki miększu wodnego

Obecnie dominuje pogląd, że glikozydy antrachinonowe stanowią swoiste proleki, które pod wpływem flory bakteryjnej jelit uwalniają antrony, a te silnie stymulują syntezę prostaglandyn w jelitach. Ponadto można im przypisać działanie cytotoksyczne porównywalne z działaniem cytostatyków [1].

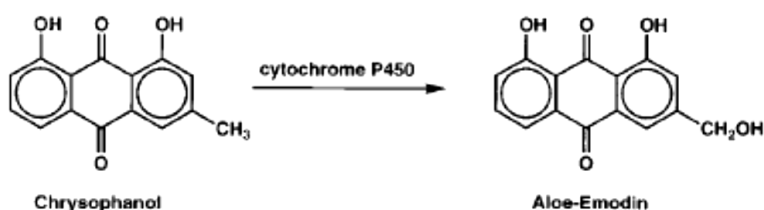
3. Metabolizm antrachinonów

Od dawna związki izolowane z aloesu oraz kruszyny ze względu na zawartość antrachinonów (m.in. aloinę, aloe-emodynę i emodynę) są powszechnie wykorzystywane w farmakologii jako związki o właściwościach wspomagających pracę układu pokarmowego [25]. W badaniach na zwierzętach wykazano, że podana doustnie aloina A (barbaloina) jest słabo absorbowana w jelitach, ale ulega przekształceniu przy aktywnym współdziałaniu flory bakteryjnej jelit (*Eubacterium spp.*) do formy pośredniej aloe-emodyny w formie antronu, która w wyniku dalszych zmian (Rysunek 3) jest aloe-emodyną w formie chinonowej ulegającą absorpcji [26 -30].



Rysunek 3. Przepuszczalna droga degradacji aloiny [28]

Stwierdzono, że aloe-emodyna powstaje także w jelitach w wyniku oksydacji chrysofanolu (1,8-dihydroksy-3-hydroksymetyloantrachinon) przy udziale cytochromu P450 [31] (Rysunek 4).



Rysunek 4. Proponowana droga metabolizmu chrysofanolu do aloe-emodyny zależna od cytochromu P450 [31]

W wyniku działania flory bakteryjnej jelit następuje także przekształcenie emodyny do aglikonu, który jest absorbowany w jelitach. Następuje wówczas zahamowanie wchłaniania jonów sodowych, a tym samym wody ze światła przewodu pokarmowego, co prowadzi do wzrostu zawartości wody w masach kałowych. Sekrecja wody do światła jelita odbywa się poprzez wpływ na prostaglandyny pobudzające sekrecję oraz mięśniówkę jelit [27,28]. W badaniach *in vivo* wykazano również, iż emodyna pobudza skurcze mięśni gładkich jelit poprzez stymulację komórek jelita do produkcji motyliny oraz obniżenie stężenia somatostatyny [32]. Stwierdzono również, że ani barbaloina, ani powstała z niej antrapochoдна, same w sobie nie przyspieszają ruchu robaczkowego jelit. Warto zaznaczyć, że badania *in vitro* wypadły pozytywnie i dochodziło do przekształcenia aloiny A do aloe-emodyny w hodowli [22].

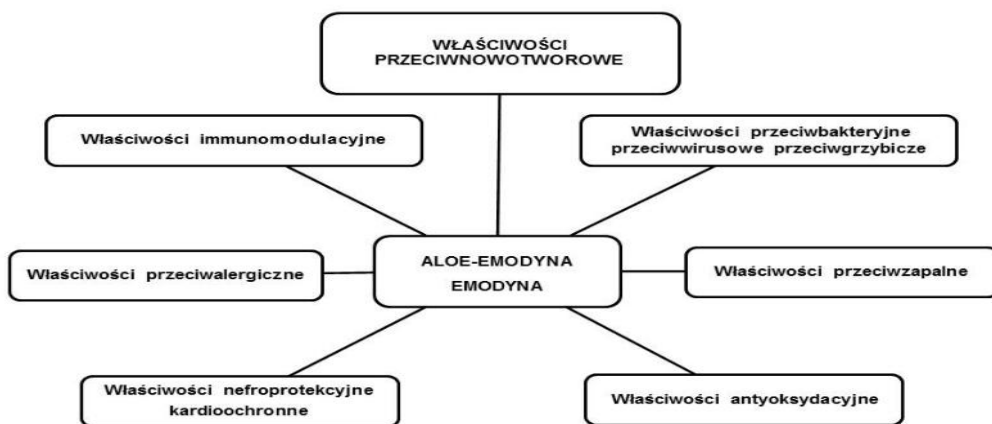
4. Skutki uboczne stosowania antrachinonów

Długotrwałe (wielomiesięczne) stosowanie antrachinonów może powodować działania niepożądane, do których należy zaliczyć zapalenie jelit, przekrwienie narządów jamy brzusznej (możliwość poronienia), czy zapalenie nerek [3,4]. Stosowanie środków wspomagających perystaltykę jelit zawierających glikozydy antrachinonowe wpływa na powstawanie w jelicie grubym zmian o charakterze melanozy (łac. *Pseudomelanosis coli*) ustępujących po zakończeniu suplementacji antrachinonów [15, 33, 34]. Glikozydy antrachinonowe zawarte w środkach wspomagających pracę przewodu pokarmowego prawdopodobnie powodują apoptozę komórek

nabłonkowych jelita grubego. Stwierdzono znaczący wzrost liczby ciałek apoptycznych towarzyszący melanozie jelit, czego następstwem jest nasilenie fagocytozy i akumulacja niestrawionych w lizosomach resztek struktur komórkowych, co makroskopowo daje obraz ciemno zabarwionej błony śluzowej jelit [1, 35].

5. Charakterystyka właściwości farmakologicznych

Spośród antrachinonów największą aktywność biologiczną wykazują: aloe-emodyna, emodyna, chryzofanol, fiscjon i reina. Największą uwagę skupia się na aloe-emodynie (1,8-dihydroksy-3-hydroksymetylo-9,10-antrachinon) oraz emodynie (1,3,8-trihydroksy-6-metylo-antrachinon) ze względu na ich liczne właściwości, co może stanowić podstawę do szerokiego zastosowania ich w farmakologii (Rysunek 4) [8].



Rysunek 4. Właściwości farmakologiczne aloe-emodyny oraz emodyny [opracowanie własne na podst. Srinivas i wsp. [15], Agarwal i wsp. [47], Arosio i wsp. [56], Pecere i wsp., Tian i Hua [65], Lee i wsp. [66].

Antrachinony są związkami wykazującymi liczne właściwości farmakologiczne m.in. przeciwdrobnoustrojowe, immunomodulacyjne, przeciwalergiczne, antyoksydacyjne, przeciwzapalne, ochronne w stosunku do wątroby, nerek, czy serca oraz potencjalne właściwości przeciwnowotworowe. Wielokierunkowość ich działania budzi wielkie nadzieje na przyszłość.

5.1. Właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe

Antrachinony wykazują właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [36]. W badaniach *in vitro* wykazano, że aloe-emodyna oraz emodyna może hamować aktywność N-acetylotransferazy, kolagenazy oraz nukleaz prowadząc do uszkodzenia DNA [37]. Powyżej wspomniane antrachinony są inhibitorami wzrostu bakterii, takich jak: *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

Helicobacter pylori, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhimurium* [38-44]. Są również silnymi środkami bakteriostatycznymi w stosunku do *Streptococcus viridans*, czy *Streptococcus mutans* [43, 45], a jak wynika z piśmiennictwa te właściwości emodyny są znacznie silniejsze od znanego antybiotyku aminoglikozydowego-neomycyny [43]. Właściwości antybiotyczne emodyny można wiązać ze zdolnością do hamowania przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym między ubichinonem i cytochromem c [15].

Zarówno sok, żel, jak i wyizolowane z aloesu antrachinony posiadają również właściwości przeciwgrzybicze wobec: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* [46-48], *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme* [49], *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* [50], *Microsporium gypseum* [51]. Emodyna wykazuje także działanie przeciwgrzybicze w stosunku do mączniaka zbożowego (*Erysiphe graminis*), zarazy ziemniaczanej (*Phytophthora infestans*) oraz *Alternaria alternata* [50,51].

Antrachinony to związki o właściwościach przeciwwirusowych. Emodyna wykazuje aktywność przeciwwirusową m.in. poprzez inhibicję replikacji Herpeswirusów tj. cytomegalowirusa – CMV (ang. *Cytomegalovirus*), wirusa opryszczki typu 1 i 2: HSV-1 i HSV-2 (ang. *Herpes Simplex Virus*), wirusa ospy wietrznej/półpaśca VZV (ang. *Varicella Zoster Virus*). Ponadto z innych patogenów wirusowych hamowanych przez emodynę wymienia się wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, wirusa paragrypy – *Paramyxovirus* (wirus grypy rzekomej) [52], wirusa z grupy Coronawirusów – SARS (ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome*) [53,54]. Działanie przeciwwirusowe wykazywał zarówno żel, jak i sok liści *Aloe barbadensis* [55]. Mając na względzie, że są to wirusy osłonkowe to według danych działanie przeciwwirusowe polega na bezpośrednim wpływie na osłonkę wirusa (wrażliwego na antrachinon), przez co zapobiega adsorpcji do komórek gospodarza, a co za tym idzie – wnikanii i dalszej replikacji wirusa [11].

Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe antrachinonów mogą być wykorzystane w medycynie, zwłaszcza że jednym z niepokojących problemów jest stale rosnąca wielolekowa oporność mikroorganizmów na antybiotyki.

5.2. Właściwości hepatochronne

W licznych badaniach [56 -59] wykazano hepatochronne właściwości zarówno aloe-emodyny, emodyny, jak i wodnego ekstraktu roślinnego (z całości liścia *Aloe barbadensis*) w stosunku do czterochlorku węgla (CCl₄), acetaminofenu, czy 1,4-naftochinonu, tj. związków wykazujących wysoką zdolność do uszkodzenia wątroby. Prawdopodobnie hepatochronne działanie antrachinonów oparte jest na właściwościach antyoksydacyjnych, na co wskazuje brak wzrostu peroksydacji lipidów oraz utrzymanie właściwego poziomu glutationu, jak również obniżenie aktywacji i proliferacji komórek gwiazdzistych [60]. Hepatochronne właściwości emodyny wynikają także ze zdolności do hamowania proliferacji limfocytów oraz procesu nekrozy [61], na co wskazuje ujawnione w badaniach obniżenie aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT), kwaśnej fosfatazy (AcP), wzrost stężenia białka

całkowitego oraz zmniejszone stężenie kwasu hialuronowego, lamininy oraz hydroksyproliny [62]. W badaniach *in vivo* na szczurach wykazano, że emodyna może mieć także właściwości regenerujące wątrobę, gdyż po jej transplantacji obserwowano stymulujący wpływ antrachinonu na przywrócenie jej funkcji (głównie poprzez stymulację proliferacji hepatocytów) [63].

Prezentowane wyniki badań są bardzo obiecujące, wymagają jednak poszerzenia, z uwagi na brak danych odnośnie wywoływania podobnych efektów terapeutycznych u ludzi.

5.3. Właściwości antyoksydacyjne

Związki te wykazują także działanie antyoksydacyjne. Bardzo wysoka aktywność antronu wynika z jego silnych właściwości redukujących oraz zdolności do zmiatania rodników hydroksylowych, a także z obecności grupy ketonowej w pozycji C-9 oraz C-10 pierścienia antrachinonu [12,64]. *Tian i Hau* [65] stwierdzili, że aloe-emodyna zależnie od zastosowanego stężenia może posiadać zarówno charakter antyoksydacyjny, jak i prooksydacyjny, może to być związane z aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej [66]. Właściwości antyoksydacyjne emodyny mogą wynikać z uruchamiania w komórce różnych mechanizmów takich jak: hamowanie tworzenia i zmiatania wolnych rodników, inhibicję peroksydacji lipidów, czy też poprzez wzmocnienie układu ochrony antyoksydacyjnej [7,14,67-69].

W badaniach *Yen'a* i wsp. wykazano, że emodyna posiada dużą zdolność do hamowania procesu utleniania kwasu linolenowego, wyższą nawet w porównaniu z α -tokoferolem [67]. Hamowanie peroksydacji lipidów związane jest z budową emodyny, a mianowicie z obecnością dwóch grup hydroksylowych w pozycji orto- i meta-pierścienia aromatycznego [67,68]. W badaniach na liniach nowotworowych stwierdzono natomiast działanie prooksydacyjne antrachinonów, to może być związane jest z generowaniem reaktywnych form tlenu, które indukują apoptozę komórek nowotworowych [70-76].

Właściwości antyoksydacyjne antrachinonów mogą odgrywać istotną rolę w ochronie prawidłowych komórek organizmu przed szkodliwym wpływem wolnych rodników, natomiast prooksydacyjne działanie wobec komórek nowotworowych może stanowić jeden z mechanizmów proapoptotycznego oddziaływania tych związków jako strategii walki z nowotworem.

5.4. Właściwości przeciwzapalne i immunomodulacyjne

Z właściwościami antyoksydacyjnymi oraz zdolnością do zmiatania wolnych rodników przez antrachinony wiązać należy ich właściwości przeciwzapalne oraz immunomodulacyjne. Omawiane antrachinony wykazują modulacyjny wpływ na komórki krwi obwodowej (limfocyty i monocyty), proliferację komórek CD4⁺, zdolność do sekrecji interferonu gamma – IFN- γ , wzrostu poziomu interleukiny 10 (IL-10) oraz czynnika martwicy nowotworu – TNF- α [77].

Na działanie przeciwzapalne antrachinonów może wskazywać zdolność do obniżenia żywotności leukocytów, aktywacji komórek NK (ang. Natural Killer), jak

również hamowania fagocytozy [78]. W badaniach *Harhaji* i wsp. [79] udowodniono, że aloe-emodyna hamuje cytotoksyczny efekt cytokiny propazapalnej jaką jest TNF- α w komórkach włókniało-mięsaka myszy (linia L929) oraz w ludzkich komórkach glejaka (linia U251). Natomiast *Wang* i wsp. [80], w swoich wynikach łączą działanie przeciwzapalne emodyny ze zdolnością do inhibicji produkcji tlenu azotu, redukcji syntezy cytokin przez ludzkie limfocyty T oraz komórki endotelialne [6,81], a także redukcji syntezy prostaglandyn [82]. Emodyna redukuje produkcję interleukiny 1 (IL-1) i 2 (IL-2) oraz ekspresję receptora dla IL-2, a wywoływany efekt może być skutkiem wytwarzania przez ten związek nadtlenu wodoru z semichinonu, jak również regulowania przemian kwasu arachidonowego i jego pochodnych. Najbardziej przypuszczalny mechanizm przeciwzapalnego działania emodyny wiązać można z jej zdolnością do inhibicji czynnika NF-kB [81, 82] oraz z budową antrachinonów, tj. wolnymi grupami hydroksylowymi w pozycji *beta* [83,84]. Analiza histologiczna komórek wątroby obciążonych aloe-emodyną pozwoliła natomiast stwierdzić zmniejszenie nacieku zapalnego limfocytów oraz komórek Kupffera [60].

Terapeutyczny efekt emodyny, która w połączeniu z baikaleiną (flawonoid *Plantago major*) chroni przed ostrym zapaleniem trzustki poprzez obniżenie poziomu cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6) oraz aktywności amylazy [85]. Natomiast *Lou* i wsp. [86] donieśli, że remodeling oraz „naprawa” komórek trzustki z udziałem emodyny, odbywa się poprzez zwiększenie ekspresji transformującego czynnika wzrostu beta (TGF)-beta 1. Według *Kitano* i wsp. [87] emodyna (badania *in vitro*) tłumy czynnik martwicy nowotworu TNF- α , indukuje migrację fibroblastów i odkładanie fibronektyny, biorącej udział w procesach naprawczych zachodzących po uszkodzeniu tkanki.

5.5. Właściwości przeciwalergiczne

Alergia jest jednym z głównych problemów zdrowotnych XXI wieku. Raporty Światowej Organizacji Zdrowia wskazują, że skala tego zjawiska systematycznie rośnie. Oprócz standardowych terapii przeciwalergicznycch obejmujących stosowanie leków przeciw-histaminowych i steroidowych, czy metod odczulania zwraca się również uwagę na możliwość stosowania fitoterapii. Właściwości przeciwalergiczne wykazują m.in. surowce roślinne bogate w flawonoidy, czy antocyjany. Takimi związkami mogą również być antrachinony.

Wang i wsp. [84] prowadząc badania na komórkach białaczki zasadochłonnej (linii 2H3 RBL-2H3) wykazali, że antrachinony posiadają właściwości przeciwalergiczne oparte na hamowaniu beta-heksazaminidazy (markera degranulacji bazofili) oraz wzroście wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, odpowiadającego za ich degranulację (mechanizm zależny od Ca²⁺). Jednocześnie stwierdzono, że aloe-emodyna miała najwyższą cytotoksyczność (IC₅₀=9,7 μ M) w stosunku do badanej linii komórkowej, w odniesieniu do reiny (IC₅₀=18 μ M), emodyny (IC₅₀=66 μ M), czy fiscjonu (IC₅₀ >100 μ M). Analizując te wyniki najwyższą cytotoksyczność aloe-emodyny można by powiązać z obecnością w jej strukturze grupy CH₂OH w pozycji 3 łańcucha.

5.6. Właściwości kardioprotekcyjne i nefroprotekcyjne

Wskaźnik śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych wzrasta, stąd w różnych produktach upatruje się substancji, które zahamują m.in. agregację płytek krwi. Dużą rolę w tym względzie spełniają polifenole należące do flawonoidów, szczególnie resweratrol spotykany w dużych ilościach w winoroślach (forma *trans*). Jak się okazuje podobne zadania mogą spełniać antrachinony. Jak wskazują Sato i wsp. [7] antrachinony wspomagały działanie kardioprotekcyjne resweratrolu. Szczurom z wywołanym zawałem serca, podawano emodynę w połączeniu z resweratrolem i wpłynęło to na zmniejszenie rozległości zawału, czego wyrazem była poprawa funkcji serca po niedokrwieniu lewej komory oraz poprawa przepływu aortalnego. Działanie kardioprotekcyjne emodyny można wiązać z jej silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Również ekstrakt z *Polygonum multiflorum* zawierający frakcję antrachinonów wykazał w badaniach *in vivo* działanie kardioochronne, na co wskazuje obniżenie stężenia dehydrogenazy mleczanowej LDH (ang. *Lactate Dehydrogenase*), utrzymanie wysokiego stężenia glutationu w tkance mięśnia sercowego oraz poprawa siły jego skurczu [69].

Kolejną funkcję jaką może spełniać emodyna to działanie nerkoochronne, tzw. nefroprotekcyjne. Indukuje ona proliferację komórek mezangialnych nerek oraz pobudza je do produkcji macierzy wewnątrzkomórkowej poprzez tłumienie działania interleukiny-1-beta. Emodyna obniżając produkcję fibronektyny oraz kolagenu IV poprzez mezangiocyty poprawia niewydolność nerek i wskazuje na potencjalną rolę ochronną [88].

5.7. Działanie mutagenne

Doniesienia naukowe zawierają informacje dotyczące mutagennego działania antrachinonów. W badaniach *in vitro* prowadzonych na różnych liniach komórek nowotworowych udowodniono, że antrachinony działają mutagennie [89], czego wyrazem są aberracje chromosomów powodujące wzrost częstości występowania mikrojąder [90,91]. Liczne badania prowadzone na komórkach prokariotycznych pokazują, że emodyna działa mutagennie m.in. na wybrane bakteryjne szczepy *Salmonella typhimurium* [92]. Można to wiązać z obecnością w jej cząsteczce podstawników hydroksylowych [55] oraz z biotransformacją do 2-hydroksyemodyny (1,2,3,8-tetrahydroksy-6-metylo-antrachinonu), która jako jeden z produktów metabolizmu wykazuje bezpośrednie działanie mutagenne [89,93]. Emodyna jest również inhibitorem białka 1A1, 1B1, cytochromu P450, przez co nasila efekt mutageny [94,95]. Mutagenność ta pozwala na ukierunkowanie działania antrachinonów w celu walki z patogenami, czy chorobami nowotworowymi.

5.8. Interakcja z DNA

Badania *in vitro* prowadzone na komórkach nowotworowych wskazują także na działanie genotoksyczne antrachinonów. Związane jest to z ich zdolnością przenikania do cytoplazmy, a następnie do jądra komórkowego i interakcji z DNA, czego konsekwencją jest powstanie kompleksu antrachinon-DNA. Zdolność do wiązania się z DNA

łączyć należy z płaską strukturą budowy, dzięki której następuje wsuwanie ich między sąsiadujące ze sobą pary zasad [96-98]. Utworzenie kompleksu nie odbywa się na zasadzie oddziaływania elektrostatycznego między antrachinonem i DNA [99], lecz związane jest ze zdolnością do tworzenia wiązań niekowalencyjnych. Natomiast ich zdolność do inhibicji aktywności katalitycznej topoisomerazy II, może powodować uszkodzenie DNA [100, 101] i hamować podziały komórek nowotworowych poprzez inhibicję replikacji DNA [91, 93, 100]. Jakkolwiek nie wyklucza się również genotoksycznego mechanizmu działania antrachinonów poprzez generowanie reaktywnych produktów utleniania [102]. Należy zaznaczyć, że interakcja z DNA występuje także w odniesieniu do innych antrachinonów takich jak chryzofanol i fiscjon [97]. Jak wynika z dostępnego piśmiennictwa dotychczasowe badania *in vivo* nie potwierdziły aktywności genotoksycznej aloe-emodyny oraz emodyny [90, 94].

5.9. Właściwości przeciwnowotworowe

Spośród prezentowanych właściwości antrachinonów najistotniejsze z punktu widzenia farmakologii wydają się potencjalne właściwości przeciwnowotworowe. Przeciwnowotworowy mechanizm działania antrachinonów, a co za tym idzie stopień ich aktywności cytotoksycznej zależy od typu komórki nowotworowej, zastosowanego stężenia oraz czasu ich działania. Właściwości przeciwnowotworowe wiązać można z ich zdolnością do hamowania cyklu komórkowego oraz indukowania w komórkach nie tylko procesu apoptozy, ale również alternatywnych rodzajów śmierci komórkowych tj. autofagii, katastrofy mitotycznej, czy lizosomalnej ścieżki śmierci [103-105].

Kierowanie komórek nowotworowych na drogę apoptozy zachodzi poprzez modulację białek pro- i antyapoptotycznych [106, 107]. Właściwości te zostały opisane na różnych liniach komórek nowotworowych, m.in. raka wątroby (HepG2) [70, 107], układu krwiotwórczego (leukemia) (HL-60, K562) [106, 108, 109], centralnego układu nerwowego (glioma) (C6, U-373MG, SVG, U-373MG) [110, 111], raka płuc (CH27, H460, Calu-1) [112, 113], raka żołądka (AGS, NCI-N87) [114], raka nerki (Vero) [115], raka jamy ustnej (SCC-4, HSC-2, HSG) [116], raka piersi (BCap-37) [117], czy raka szyjki macicy (HeLa) [103-105].

5.9.1. Działanie proapoptotyczne

Antrachinony indukują apoptozę zależną od kaspaz poprzez modulację ekspresji białek rodziny Bcl-2, takich jak Bcl-XL, Bag-1 i Bak, co związane jest z przemieszczeniem białek Bak i Bax z cytoplazmy do innych przedziałów komórkowych. W komórkach eksponowanych na ich działanie następuje wzrost ilości cytochromu c w wyniku jego uwalniania z mitochondriów, co aktywuje ważną dla tego procesu kaskadę kaspaz (3, 8 i 9) [70, 72, 108, 113, 116-119].

Również w badaniach własnych dotyczących emodyny i aloe-emodyny prowadzonych na komórkach nowotworowych linii HeLa przy zastosowaniu mikroskopii elektronowej i fluorescencyjnej (barwienie DAPI) wykazano zmiany kształtu i struktury jądra, marginalizację i fragmentację chromatyny oraz tworzenie ciałek apoptotycznych [103-105, 120, 121]. Działanie proapoptotyczne antrachinonów

związane jest z generowaniem reaktywnych form tlenu, które przyczyniają się do wywołania stresu oksydacyjnego w komórkach [70], co z kolei wpływa na dysfunkcję mitochondriów poprzez obniżenie ich potencjału transbłonowego i rozpoczęcie procesu apoptozy [71, 72, 75].

Wpływ antrachinonów na remodeling mitochondriów w komórkach nowotworowych obserwowano także przy zastosowaniu transmisyjnej mikroskopii elektronowej [103, 104]. Mitochondria charakteryzowały się obrzmieniem wysokiej amplitudy oraz znacznym uszkodzeniem grzebieni, z tworzeniem się megamitochondriów włącznie. Wskazuje to na generowanie reaktywnych form tlenu przez antrachinony. Nadmierne stężenie w/w związków w cytoplazmie komórki wpływa na uszkodzenie błon mitochondrialnych w wyniku czego następuje wzrost ich przepuszczalności, uwolnienie cytochromu c oraz aktywacja procesu apoptozy. Uszkodzenie mitochondriów potwierdzono również testem MTT, gdzie stwierdzono zależnie od stężenia badanego związku, obniżenie żywotności komórek, a to mogło być konsekwencją uszkodzenia łańcucha oddechowego [103, 104, 122].

Jak wynika z licznych badań, proapoptotyczne działanie omawianych związków może zachodzić także poprzez aktywację jądrowego czynnika NF- κ B oraz proteiny 1 [73, 75, 76].

Oprócz stresu oksydacyjnego antrachinony wywołują w komórkach nowotworowych stres siateczki śródplazmatycznej oraz zaburzenie komórkowej homeostazy jonów wapnia [116, 123]. Świadczy o tym wzrost ekspresji proapoptotycznych białek tj. białka regulowanego glukozą GRP78, białka GADD153 [116, 119] oraz białkowej izomerazy disiarczkowej [108]. Morfologicznym wyznacznikiem stresu siateczki śródplazmatycznej jest natomiast silne obrzmienie kanałów widoczne w komórkach nowotworowych, zarówno po zastosowaniu aloë-emodyny oraz emodyny [103,104]. Zmiany te wpływają na aktywację kaskady kaspaz (kaspazy 12, 9 oraz 3) i rozpoczęcie procesu apoptozy [116, 123]. Doniesienia mówią, że uwalnianie jonów wapnia oraz znaczne obrzmienie siateczki to zmiany, które są wynikiem stresu i mogą być uznane za mediatory rozpoczynającego się procesu apoptozy [124].

Kluczową rolę w kierowaniu komórek na drogę apoptozy odgrywa również zdolność aloë-emodyny oraz emodyny do obniżania ekspresji kinazy białkowej C (PKC) [110, 113], kinazy II [114], kinazy tyrozynowej (PTK) [115] oraz kinazy tyrozynowej Lck (p56lck).

5.9.2. Działanie antyproliferacyjne

Antrachinony wpływają na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1, G2/M, S poprzez ekspresję białka p53, której towarzyszy indukcja ekspresji białka p27, białka p21, a w konsekwencji inhibicja cykliny B1, Cdc2 oraz CDK1 (białka odpowiedzialnego za tworzenie mikrotubul) [106, 116, 124]. Hamowanie podziałów komórek w cyklu odbywa się również poprzez wpływ na obniżenie poziomu tyrozynowo-treoninowych fosfatyz Cdc25A oraz cykliny E i CDK2 odpowiedzialnych za wprowadzenie komórki do fazy S [111, 126].

5.9.3. Działanie antyangiogenne

W badaniach *in vivo* stwierdzono, że właściwości przeciwnowotworowe antrachinonów związane są także z działaniem antyangiogennym. Zahamowanie nowotworzenia naczyń krwionośnych ogranicza wzrost guza, a mechanizm ten oparty jest na inhibicji proliferacji, indukcji apoptozy w komórkach endotelialnych [23, 127] oraz inhibicji ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) [128], który stymuluje proces mitozy komórek śródbłonna i ich migrację. Działanie antyangiogenne związane jest także z inhibicją syntezy tlenu azotu, inicjatora angiogenezy [80]. W warunkach *in vitro* i *in vivo* właściwości antyangiogenne emodyny polegają również na hamowaniu aktywności kinazy ERK, która odpowiada za regulację proliferacji i różnicowania komórek, jak również obniżenie ekspresji metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) tj. kolagenazy typu IV odpowiedzialnej za angiogenezę i rozwój nowotworu [127, 129]. Regulacja procesu angiogenezy oparta jest na zdolności emodyny do inhibicji kinazy kazeinowej CK2 [130], enzymu biorącego udział w regulacji większości procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach (proliferaacji, różnicowania, embriogenezy, apoptozy, czy transformacji nowotworowej). Nieprawidłowości w działaniu kinazy białkowej CK2 powodują bowiem rozwój chorób nowotworowych [130].

Innym mechanizmem przeciwnowotworowego działania antrachinonów może być inhibicja produkcji tlenu azotu przez komórki nowotworowe [131]. Antrachinony potęgują również proapoptotyczny efekt trójtlenku arsenu [75,76] oraz uwrażliwiają komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków takich jak: cisplatyna, doksorubicyna, etopozyd, czy paklitaksel poprzez hamowanie nadekspresji białka HER2/neu odgrywającego znaczącą rolę w transformacji nowotworowej i w procesie rozrostu wielu nowotworów [132]. Jednocześnie aloe-emodyna redukuje aktywność cytotoksyczną cisplatyny [111]. Zhang i wsp. [133] podają, że emodyna uwrażliwia komórki nowotworowe odporne na chemioterapię poprzez inhibicję kinazy tyrozynowej p185. Ostatnie badania sugerują, że związek ten w połączeniu z celekoksybem wpływa na tłumienie wzrostu komórek nowotworowych oraz ich apoptozę poprzez zwiększone hamowanie kinazy Akt (antyapoptycznego białka).

5.9.4. Modulacja przedziału lizosomalnego

W badaniach własnych na komórkach nowotworowych linii HeLa stwierdzono, że zarówno aloe-emodyna, jak i emodyna wpływają modulująco na przedział lizosomalny, czego wyrazem jest wzrost liczby lizosomów oraz wakuol autofagowych w stadium tworzenia się oraz wakuol zawierających materiał w różnych stadiach degradacji. Wykazane w badaniach morfologicznych zmiany mogą być odzwierciedleniem zachodzącej w komórkach HeLa degradacji wewnątrzkomórkowej [103-105, 134]. Aktywację układu lizosomalnego w komórkach nowotworowych potwierdzono również przy zastosowaniu testu pochłaniania czerwieni obojętnej przez lizosomy oraz przy zastosowaniu barwienia lizosomów oranżem akrydyny [103-105, 134]. W przeprowadzonych badaniach biochemicznych oraz morfologicznych zauważono, że wraz ze wzrostem zastosowanych stężeń antrachinonów dochodzi

w komórkach nowotworowych do zwiększenia przepuszczalności ich błon lizosomalnych. Wskazuje to na wysoką kumulację antrachinonów w lizosomach, ich cytotoksyczne działanie w odniesieniu do omawianych organelli oraz na indukcję lizosomalnej ścieżki śmierci [103-105, 134].

5.9.5. Indukcja śmierci mitotycznej

Antrachinony mogą indukować katastrofę mitotyczną (nieprawidłową mitozę), czego wyrazem jest zwiększona liczba komórek z mikrojądrami, komórek zatrzymanych w stadium metafazy, komórek wielojądrzastych oraz olbrzymich, których głównym mechanizmem przyczyniającym się do ich tworzenia jest dysfunkcja aparatu mitotycznego [103].

5.9.6. Interakcje z lekami przeciwnowotworowymi oraz ich nośnikami

Obecnie próbuje się również wykorzystać antrachinony w terapii przeciwnowotworowej w połączeniu z innymi cytostatykami. Stwierdzono, że aloe-emodyna oraz emodyna w wyniku połączenia z cisplatyną, doksorubicyną, czy 5-fluorouracyłem [135] potęguje ich wyższe działanie antyproliferacyjne, niż przy zastosowaniu tych związków osobno. Działanie antyproliferacyjne badanych antrachinonów uznać należy za jedną z cech świadczących, że zarówno aloe-emodyna jak i emodyna mogą stanowić nową grupę związków antymitotycznych mogących znaleźć zastosowanie w chemioterapii.

Aloe-emodyna oraz emodyna dają interakcję z ludzką albuminą, białkiem osocza posiadającym zdolność przyłączania oraz transportu do tkanek docelowych, m.in. metali ciężkich i niektórych leków [136]. Może stanowić to dodatkową podstawę wykorzystania omawianych związków do syntezy nowych leków przeciwnowotworowych. Analogiczne badania prowadzono m.in. z erlotinibem [137], czy paklitaksemem [138], który w połączeniu z albuminą stanowi nową terapię przeciwnowotworową.

Jednocześnie należy nadmienić, że antybiotyki antracyklinowe, które w budowie zawierają szkielet antrachinonu (podobnie jak aloe-emodyna i emodyna) znalazły już praktyczne zastosowanie w chemioterapii. Antracykliny spośród których najbardziej znana jest daunorubicyna oraz doksorubicyna stosowane są m.in. w leczeniu chłoniaków złośliwych, białaczek limfoblastycznych i mieloblastycznych, nowotworów piersi, mięsaków tkanek miękkich. Jednakże mimo dużej skuteczności w leczeniu podawanie ich jest ograniczone z powodu kardiotoksyczności. Stąd badania skupiają się na poszukiwaniu nowych pochodnych antracyklin, które okazałyby się lepsze w działaniu oraz mniej toksyczne [139].

6. Podsumowanie

Antrachinony, w tym aloe-emodyna oraz emodyna są związkami pochodzenia roślinnego o wielokierunkowej aktywności biologicznej, to sugeruje, że mogą mieć również szerokie zastosowanie terapeutyczne. Szczególną nadzieję wiąże się z tym, że antrachinony indukują różne rodzaje śmierci komórkowej, procesu, który leży

u podstaw terapii przeciwnowotworowej. Należałoby zatem rozważyć rozszerzenie zakresu badań *in vitro* i *in vivo* na poziomie molekularnym, jak i ultrastrukturalnym, a w dalszej kolejności przeprowadzenie badań klinicznych tych bardzo interesujących związków.

Literatura

1. Stępką M., *Melanoza jelita grubego*. Terapia., 6 (2003), s. 50-52.
2. Liang JL., Chang Cha H., Lee SH., Son JH., Chang HW., Eom JE., Kwon Y., Jahng YA. *Facile Synthesis of Emodin Derivatives, Emodin Carbaldehyde, Citreosein, and Their 10-Deoxygenated Derivatives and Their Inhibitory Activities on μ -Calpain*, Archives of pharmacal research., 35 (2012), s. 447-454.
3. Kohlmunzer S., *Farmakognozja-podręcznik dla studentów farmacji*, 2013, Wyd. PZWL, W-wa.
4. Lamer-Zarawska EM., Kowal-Gierczak B., *Fitoterapia i leki roślinne*, 2012, Wyd. PZWL, W-wa.
5. Bone K., Mills S., *Principles and Practice of Phytotherapy 2nd Edition*, 2013, Wyd. Churchill Livingstone.
6. Kuo YC., Meng HC., Tsai WJ. *Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from Polygonum hypoleucum Ohwi*, Inflammation Research., 50 (2001), s. 73-82.
7. Sato M., Maulik G., Bagchi D., Das DK. *Myocardial protection by protykin, a novel extract of transresveratrol and emodin*, Free Radical Research., 32 (2000), s. 135-144.
8. Zhang LM., Xie WG., Wen TT., Zhao X. *Thermal behavior of five free anthraquinones from rhubarb*, Journal of thermal analysis and calorimetry., 100 (2010), s. 215-218.
9. Kovacevic N., Subotic A., Budimir S., Grubišić D. *Comparative study of anthraquinones from embryogenic callus tissue and zygotic embryos of Frangula alnus and Rhamnus catharticus*, Pharmaceutical biology., 38 (2000), s. 321-325.
10. Choi S., Chung MH. *A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects*, Seminars in Integrative Medicine., 1 (2003), s. 53-62.
11. Sydiskis RJ., Owen DG., Lohr JL., Rosler KH., Blomster RN. *Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants*, Antimicrobial agents and chemotherapy., 35 (1991), s. 2463-6.
12. Yen GC., Duh PD., Chuang DY., *Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone*, Food chemistry., 70 (2000), s. 437-441.
13. Ocho-Anin A., Brou K.B., Kouakou T.H., Kouadio Y.J., Gnagri D. *Screening for antidiabetic activity and phytochemical constituents of common bean (Phaseolus vulgaris L.) seeds*, Journal of Medicinal Plants Research., 4 (2010), s. 1757-1761.
14. Ng TB., Liu F., Lu Y., Cheng CH, Wang Z. *Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb Aster tataricus*, Comparative biochemistry and physiology. Toxicology&pharmacology:CBP., 136 (2003), s. 109-115.
15. Srinivas G., Babykutty S., Sathiadevan PP., Srinivas P. *Molecular Mechanism of Emodin Action: Transition from Laxative Ingredient to an Antitumor Agent*, Medicinal research reviews., 27 (2007), s. 591-608.
16. Nagashima H., Nakamura K., Goto T. *Possible anti-atherogenic effects of emodin [mycotoxin], an anthraquinone from Chinese herbs and Aspergillus and Penicillium fungi*, Mycotoxins., 52 (2002), s. 23-27.

17. Jambor J., Horoszkiewicz-Hassan M., Krawczyk A. *Znaczenie aloesu w dermatologii i kosmetyce*, Postępy Fitoterapii., 3 (2002), s. 50-52.
18. Liao HM., Shen ZG., Sheng XY., Hu ZH. *Ultracytochemical studies of aloin in Aloe arborescens leaves*, Fen zi xi bao sheng wu xue bao., 39 (2006), s. 55-60.
19. Li JY., Wang TX., Shen ZG., Hu ZH. *Relationship between leaf structure and aloin content in six species of Aloe L.*, Acta botanica Sinica, 45 (2003), s. 594-600.
20. Wang TX., Li JY., Shen ZG., Hu ZH. *Development of aloin cells and accumulation of anthraquinone in aloe leaf*, Shi Yan Sheng Wu Xue Bao., 36 (2003), s. 361-7.
21. Koch A. *Metabolism of aloin the influence of nutrition*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis., 14 (1996), s. 1335-1338.
22. Wamer W.G., Vath P., Falvey D.E. *In vitro studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A*, Free radical biology & medicine., 34 (2003), s. 233-242.
23. Cárdenas C., Quesada AR., Medina MA. *Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin*, Cellular and molecular life sciences:CMLS., 63 (2006), s. 3083-3089.
24. Gutterman, Y., Chauser-Volfson, E. *The distribution of the phenolic metabolites carbaloin, aloeresin and aloenin as a peripheral defense strategy in the succulent leaf parts of Aloe arborescens*, Biochemical systematics and ecology., 28 (2000), s. 825-838.
25. Chang XL., Wang Ch., Feng Y., Liu Z. *Effects of heat treatments on the stabilities of polysaccharides substances and barbaloin in gel juice from Aloe vera Miller*, Journal of food engineering., 75 (2006), s. 245-251.
26. Ishii Y., Tanizawa H., Takino Y. *Studies of aloe. IV: Mechanism of cathartic effect (3)*, Biological & pharmaceutical bulletin., 17 (1994a), s. 495-497.
27. Ishii Y., Tanizawa H., Takino Y. *Studies of aloe. V: Mechanism of cathartic effect (4)*, Biological & pharmaceutical bulletin., 17 (1994b), s. 651-653.
28. Chung JH., Cheong JC., Lee JY., Roh HK., Cha YN. *Acceleration of the alcohol oxidation rate in rats with aloin, a quinone derivative of Aloe*, Biochemical pharmacology., 52 (1996), s. 1461-8.
29. Avila H., Rivero J., Herrera F., Fraile G. *Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) gel*, Toxicol., 35 (1997), s. 1423-1430.
30. Koch A. *Metabolism of aloin the influence of nutrition*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis., 14 (1996), s. 1335-1338.
31. Mueller SO., Stopper H., Dekant W. *Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes*, Drug metabolism and disposition : the biological fate of chemicals., 26 (1998a), s. 540-546.
32. Zhang HQ., Zhou ChH., Wu YuQ. *Effect of emodin on small intestinal peristalsis of mice and relevant mechanism*, World journal of gastroenterology., 28 (2005), s. 3147-3150.
33. Matsuda Y., Yokohira M., Suzuki S., Hosokawa K., Yamakawa K., Zeng Y., Ninomiya F., Saoo K., Kuno T., Imaida K. *One-year chronic toxicity study of Aloe arborescens Miller var. natalensis Berger in Wistar Hannover rats. A pilot study*, Food and chemical toxicology., 46 (2008), s. 733-739.
34. Willems M., van Buuren H.R., de Krijger R. *Anthranoid self-medication causing rapid development of melanosis coli*, The Netherlands Journal of Medicine., 61 (2003), s. 22-24.
35. Ahasan HN., Khan MAI, Mahbub MS., Alam MB., Miah MT., Gupta RD, Arif KM. *Melanosis Coli-An Atypical Presentation*, Journal of Medicine., 11(2010), s.183-185.
36. Bashir A., Saeed B., Mujahid TY., Jehan N. *Comparative study of antimicrobial activities of Aloe vera extracts and antibiotics against isolates from skin infections*, African journal of biotechnology., 10 (2011), s. 3835-3840.

37. Coenye T., Honraet, Rigole P., Jimenez PN., Nelis HJ. *In Vitro Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Formation on Hydroxyapatite by Subinhibitory Concentrations of Anthraquinones*, Antimicrobial agents and chemotherapy., 51 (2007), s. 1541-1544.
38. Alemdar S., Agaoglu S. *Investigation of In vitro Antimicrobial Activity of Aloe vera Juice*, Asian journal of animal and veterinary advances., 8 (2009), s. 99-102.
39. Antonisamy MA., Renisheya Joy Jeba Malar T., Johnson M, Nancy Beaulah S, Laju R S, Anupriya G, Renola Joy Jeba Ethal T. *Anti-bacterial and antifungal activity of Aloe vera gel extract*, International Journal of Biomedical and Advance Research., 03 (2012), s. 184-187.
40. Coopoosamy RM., Magwa ML. *Antibacterial activity of aloe emodin and aloin A isolated from Aloe excels*, African Journal of Biotechnology., 5 (2006), s. 1092-1094.
41. Wang HH., Chung JG., Ho CC., Wu CT., Chang SH. *Aloe-emodin effects on arylamine N-acetyl transferase activity in the bacteria Helicobacter pylori*, Planta medica, 64 (1998), s. 176-178.
42. Alves DS., Pe´rez-Fons L., Estepa A., Micol V. *Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin*, Biochemical pharmacology., 68 (2004), s. 549-561.
43. Chukwujekwu JC., Coombes PH., Mullholand DA., Van Staden J. *Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of Cassia occidentalis*, South African journal of botany., 72 (2006), s. 295-297.
44. Chung JG., Wang HH., Wu LT., Chang SS., Chang WC. *Inhibitory actions of emodin on arylamine N-acetyltransferase activity in strains of Helicobacter pylori from peptic ulcer patients*, Food and chemical toxicology., 35(1997), s. 1001-1007.
45. Coenye T., Honraet, Rigole P., Jimenez PN., Nelis HJ. *In Vitro Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Formation on Hydroxyapatite by Subinhibitory Concentrations of Anthraquinones*, Antimicrobial agents and chemotherapy., 51 (2007), s. 1541-1544.
46. Agarwal SK., Singh SS., Verma S., Kumar S. *Antifungal activity of anthraquinone derivatives from Rheum emodi*, Journal of ethnopharmacology., 72 (2000), s. 43-47.
47. Agarry OO., Olaleye MT., Bello-Michael CO. *Comparative antimicrobial activities of Aloe vera gel and leaf*, African journal of biotechnology., 4 (2005), s. 1413-1414.
48. Castillo S., Navarrob D., Zapataa P.J., Guilléna F., Valeroa D., Serranob M., Martínez-Romero D. *Antifungal efficacy of Aloe vera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality*, Postharvest Biology and Technology., 57 (2010), s. 183-188.
49. Ali MI., Shalaby NM., Elgamal MH., Mousa AS. *Antifungal effects of different plant extracts and their major components of selected aloe species*, Phytotherapy research., 13 (1999), s. 401-7.
50. Kim YM., Lee CH., Kim HG., Lee HS. *Anthraquinones isolated from Cassia tora (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi*, Journal of agricultural and food chemistry., 52 (2004), s. 6096-6100.
51. Kremer D., Kosalec I., Locatelli M., Epifano F., Genovese S., Carlucci G., Zovko Konc´ic´ M. *Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of Frangula rupestris (Scop.) Schur and Frangula alnus Mill. Bark*, Food Chemistry., 131 (2012), s. 1174-1180.
52. Barnard DL., Huffman JH., Morris JL., Wood SG., Hughes BG., Sidwell RW. *Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus*, Antiviral Research., 17 (1992), s. 63-77.

53. Schwarz S., Wang K., Yu W., Sun B., Schwarz W. *Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein*, Antiviral Research., 90 (2011), s. 64-9
54. Xiong HR., Luo J., Hou W., Xiao H., Yang ZQ. *The effect of emodin, an anthraquinone derivative extracted from the roots of Rheum tanguticum, against herpes simplex virus in vitro and in vivo*, Journal of ethnopharmacology., 133 (2011), s. 718-23.
55. Smolarz HD., Wegiera M. *Antrachinony-składniki roślinne o właściwościach nie tylko przeczyszczających*, Postępy Fitoterapii., 14 (2004), s. 169-172.
56. Arosio B., Gagliano N., Fusaro LM., Parmeggiani L., Tagliabue J., Galetti P., De Castri D., Moscheni C., Annoni G. *Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride*, Pharmacology and toxicology., 87 (2000), s. 229-33.
57. Norikura T., Kennedy DO., Nyarko AK., Kojima A., Matsui-Yuasa I. *Protective Effect of Aloe Extract against the Cytotoxicity of 1,4-Naphthoquinone in Isolated Rat Hepatocytes Involves Modulations in Cellular Thiol Levels*, Pharmacology and toxicology., 90 (2002), s. 278-284.
58. Lee BH., Huang YY., Duh PD., Wu SC. *Hepatoprotection of emodin and Polygonum multiflorum against CCl(4)-induced liver injury*, Pharmaceutical biology., 3 (2012), s. 351-9.
59. Bhadauria M. *Dose-dependent hepatoprotective effect of emodin against acetaminophen-induced acute damage in rats*, Experimental and toxicologic pathology., 62 (2010), s. 627-35.
60. Woo S.W., Nan J.X., Lee S.H., Park E.J., Zhao Y.Z., Sohn D.H. *Aloe emodin suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture*, Pharmacology and toxicology., 90 (2002), s. 193-8.
61. Lin CC., Chang CH., Yang JJ., Namba T., Hattori M. *Hepatoprotective effects of emodin from Ventilago leiocarpa*, J Ethnopharmacol., 52 (1996), s. 107-11.
62. Zhan Y., Li D., Wei H., Wang Z., Huang X., Xu Q., Lu H. *Emodin on hepatic fibrosis in rats*, Chinese medical journal., 113 (2000), s. 599-601.
63. Meng KW., Lv Y., Yu L., Wu SL., Pan CE. *Effects of emodin and double blood supplies on liver regeneration of reduced size graft liver in rat model*, World Journal of gastroenterology., 11 (2005), s. 2941-2944.
64. Malterud KE., Farbotr TL., Huse AE., Sund RB. *Antioxidant and radical-scavenging effects of anthraquinones and anthrones*. Pharmacology., 47 (1993), s. 77-85.
65. Tian B., Hua Y. *Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA*, Food Chemistry., 91 (2005), s. 413-418.
66. Lee HZ., Lin CJ., Yang WH., Leung WCh., Chang SP., *Aloe-emodin induced DNA damage through generation of reactive oxygen species in human lung carcinoma cells*, Cancer Letter., 239 (2006), s. 55-63.
67. Choi JS, Chung HY, Jung HA, Park HJ, Yokozawa T. *Comparative evaluation of antioxidant potential of alaternin (2-hydroxyemodin) and emodin*, Journal of agricultural and food Chemistry., 48 (2000), s. 6347-6351.
68. Huang SS, Yeh SF, Hong CY. *Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: Structure-activity relationship.*, Journal of natural products., 58 (1995), s. 1365-1371.
69. Yim TK., Wu WK., Mak DH., Ko KM. *Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of Polygonum multiflorum ex vivo*, Planta medica., 64 (1998), s. 607-11.
70. Jing X., Ueki N., Cheng J., Imanishi H., Hada T. *Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin*, Japanese journal of cancer research, 93 (2002), s. 874-882.

71. Jing YW., Yi J., Chen YY., Hu QS., Shi GY., Li H., Tang XM. *Dicoumarol alters cellular redox state and inhibits nuclear factor kappa B to enhance arsenic trioxide-induced apoptosis*, Acta biochimica et biophysica Sinica (Shanghai), 36 (2004), s. 235-242.
72. Su YT., Chang HL., Shyue SK., Hsu SL. *Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway*, Biochemistry & pharmacology., 70 (2005), s. 229-241.
73. Wang XJ., Yang J., Cang H., Zou YQ., Yi J. *Gene expression alteration during redox-dependent enhancement of arsenic cytotoxicity by emodin in HeLa cells*, Cell Research, 15 (2005), s. 511-522.
74. Wang X., Zou Y., Sun A., Xu D., Niu Y., Wang S., Wang K., Ge J. *Emodin Induces Growth Arrest and Death of Human Vascular Smooth Muscle Cells Through Reactive Oxygen Species and p53*, J Journal of cardiovascular pharmacology., 49 (2007), s. 253-260.
75. Yi J., Yang J., He R., Gao F., Sang H., Tang X., Ye RD. *Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling*, Cancer Research., 64 (2004), s. 108-116.
76. Yang J., Li H., Chen Y.Y., Wang X.J., Shi G.Y., Hu Q.S., Kang X.L., Lu Y., Tang X.M., Guo Q.S., Yi J. *Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity in vitro and in vivo via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis*, Free radical biology & medicine., 37 (2004), s. 2027-2041.
77. Cherng JM., Chiang W., Wang JH., Lin ChM., Lee ChJ., Shih ChM., Chiang LCh. *Anthraquinones of edible wild vegetable Cassia tora stimulate proliferation of human CD4+ T lymphocytes and secretion of interferon-gamma or interleukin 10*, Food Chemistry., 107 (2008), s. 1576-1580.
78. Yu CS., Yu FS., Chan JK., Li TM., Lin SS., Chen SC., Hsia TC., Chang YH., Chung JG. *Aloe-emodin affects the levels of cytokines and functions of leukocytes from Sprague-Dawley rats*, In Vivo., 20 (2006), s. 505-9.
79. Harhaji L., Isakovic A., Raicevic N., Markovic Z., Todorovic-Markovic B., Nikolic N., Vranjes-Djuric S., Markovic I., Trajkovic V. *Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene*, European journal of pharmacology., 568 (2007), s. 89-98.
80. Wang CC., Huang YJ., Chen LG., Lee LT., Yang LL. *Inducible nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs III. Rheum palmatum*, Planta medica., 68 (2002), s. 869-874.
81. Kumar A., Dhawan S., Aggarwal BB. *Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxy-anthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells*, Oncogene, 17 (1998), s. 913-8.
82. Li HL., Chen HL., Li H., Zhang KL., Chen XY., Wang XW., Kong QY., Liu J. *Regulatory effects of emodin on NF-kappaB activation and inflammatory cytokine expression in RAW264.7 macrophages*, International journal of molecular medicine., 16 (2005), s. 41-47.
83. Huang HC., Chang JH., Tung SF., Wu RT., Foegh ML., Chu SH. *Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator*, European journal of pharmacology., 18 (1992), s. 359-64.
84. Wang Q., Yuan D., Matsuda H, Yoshikawa M. *Inhibitory effects of Rheum officinale and anthraquinone aglycones on antigen-induced degranulation in RBL-2H3 cells*, Asian Journal of Traditional Medicines., 2 (2007), s. 189-197.

85. Zhang XP., Li ZF., Liu XG., Wu YT., Wang JX., Wang KM., Zhou YF. *Effects of emodin and baicalein on rats with severe acute Pancreatitis*, World Journal of gastroenterology., 11 (2005), s. 2095-2100.
86. Lou KX., Gong ZH., Yuan YZ. *Study on effect of emodin on TGF beta 1 expression in pancreatic tissue of rats suffering from acute pancreatitis*, Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 21 (2001), s. 433-436.
87. Kitano A., Saika S., Yamanaka O., Ikeda K., Okada Y., Shirai K., Reinach PS. *Emodin Suppression of Ocular Surface Inflammatory Reaction*, Investigative ophthalmology & visual science., 48 (2007), s. 513-522.
88. Wang R., Wan Q., Zhang Y., Huang F., Yu K., Xu D., Wang Q., Sun J. *Emodin suppresses interleukin-1 β induced mesangial cells proliferation and extracellular matrix production via inhibiting P38 MAPK*, Life Sciences., 80 (2007), s. 2481-2488.
89. Westendorf J., Marquardt H., Poginsky B., Dominiak M., Schmidt J., Marquardt H. *Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones*, Mutation Research., 240 (1990), s. 1-12.
90. Heidemann A., Volkner W., Mengs U. *Genototoxicity of aloe-emodin in vitro and in vivo*, Mutation Research., 367 (1996), s. 123-133.
91. Müller SO., Eckert I., Lutz WK., Stopper H. *Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated?*, Mutation Research., 371 (1996), s. 165-173.
92. Krivobok S., Seigle-Murandi F., Steiman R., Marzin DR., Betina V. *Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system*, Mutation Research., 279 (1992), s. 1-8.
93. Mueller SO., Lutz WK., Stopper H. *Factors affecting the genotoxic potency ranking of natural anthraquinones in mammalian cell culture systems*, Mutation Research, 414 (1998b), s. 125-129.
94. Mengs U., Krumbiegel G., Völkner W. *Lack of emodin genotoxicity in the mouse micronucleus assay*, Mutation Research., 393 (1997), s. 289-293.
95. Sun M., Sakakibara H., Ashida H., Danno G., Kanazawa K., *Cytochrome P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationship*, Bioscience, biotechnology, and biochemistry., 64 (2000), s. 1373-1378.
96. Lin XH., Wan HY., Zhang YF., Chen JH. *Studies of the interaction between Aloe-emodin and DNA and preparation of DNA biosensor for detection of PML-RAR fusion gene in acute promyelocytic leukemia*, Talanta., 74 (2008), s. 944-950.
97. Qiao Ch., Bi S., Sun Y., Song D., Zhang H., Zhou W. *Study of interactions of anthraquinones with DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe*, Spectrochimica acta. Part A: Molecular spectroscopy., 70 (2008), s. 136-143.
98. Bi S., Zhang H., Qiao Ch., Sun Y., Liu Ch. *Studies of interaction of emodin and DNA in the presence of ethidium bromide by spectroscopic method*, Spectrochimica acta. Part A: Molecular spectroscopy., 69 (2008), s. 123-129.
99. Wang L., Lin L., Ye B. *Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis., 42 (2006), s. 625-629.
100. Mueller SO., Stopper H. *Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells*, Biochimica et biophysica acta., 1428 (1999), s. 406-414.
101. van Gorkom BA., Timmer-Bosscha H., de Jong S., van der Kolk DM., Kleibeuker JH., de Vries EGE. *Cytotoxicity of rhein, the active metabolite of sennoside laxatives, is reduced*

- by multidrug resistance-associated protein 1, *British journal of cancer.*, 86 (2002), s. 1494-1500.
102. Lown JW. *Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments*, *Pharmacology & therapeutics.*, 60 (1993), s. 185-214.
103. Trybus W. *Efekty działania wybranych antrachinonów na komórki prawidłowe i nowotworowe*, 2015, UJK, Kielce.
104. Trybus W., T. Król, E. Trybus, A. Kopacz-Bednarska, Stachurska A. *The effects of some of antraquinones on morphological and biochemical changes in normal cells and cancer cells*. *Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism* (red. H. Lach)., 2015, s. 22-25.
105. Trybus W., Król T., Trybus E., Kopacz-Bednarska A., Król G., Karpowicz E. *Changes in the lysosomal system of cervical cancer cells induced by emodin action*. *Anticancer Research.*, 2017 [przyjęta do druku].
106. Chen HC., Hsieh WT., Chang WC., Chung JG., *Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells*, *Food and chemical toxicology.*, 42 (2004), s. 1251-1257.
107. Lu GD., Shen HM., Ong CN., Chung MC. *Anticancer effects of aloe-emodin on HepG2 cells: cellular and proteomic studies.*, *Proteomics. Clinical applications.*, 1 (2007), s. 410-419.
108. Chen YC., Shen SC., Lee WR., Hsu FL., Lin HY., Ko CH., Tseng SW. *Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production*, *Biochemistry & pharmacology.*, 64 (2002), s. 1713-1724.
109. Kuo YC., Sun CM., Ou JC., Tsai WJ. *A tumor cell growth inhibitor from Polygonum hypoleucum Ohwi.*, *Life Sciences.*, 61 (1997), s. 2335-44.
110. Acevedo-Duncan M., Russell C., Patel S., Patel R. *Aloe-emodin modulates PKC isoenzymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells*, *International immunopharmacology.*, 4 (2004), s. 1775-1784.
111. Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic D., Radovic J., Miljkovic D., Kaludjerovic G.N., Sabo T.J., Trajkovic V. *Aloe-emodin decreases the ERK-dependent anticancer activity of cisplatin*, *Cellular and molecular life sciences.*, 62 (2005b), s. 1275-1282.
112. Lai MY., Hour MJ., Leung WCh., Yang WH., Lee HZ. *Chaperones are the target in aloe-emodin-induced human lung nonsmall carcinoma H460 cell apoptosis*, *European journal of pharmacology*, 573 (2007), s. 1-10.
113. Lee HZ. *Protein kinase C involvement in aloe-emodin and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell*, *British journal of pharmacology.*, 134 (2001), s. 1093-1103.
114. Chen SH., Lin KY., Chang ChCh., Fang ChL., Lin ChP., *Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells*, *Food and chemical toxicology.*, 45 (2007), s. 2296-2303.
115. Kuo YC., Sun CM., Ou JC., Tsai WJ. *A tumor cell growth inhibitor from Polygonum hypoleucum Ohwi.*, *Life Science.*, 61 (1997), s. 2335-44.
116. Lin SY., Lai WW., Ho ChCh., Yu FS., Chen GW., Yang JS., Liu KCh., Lin ML., Wu PP, Fan MJ., Chung JG. *Emodin Induces Apoptosis of Human Tongue Squamous Cancer SCC-4 Cells through Reactive Oxygen Species and Mitochondria-dependent Pathways*, *Anticancer Research.*, 29 (2009), s. 327-336.
117. Huang Z., Chen G., Shi P. *Emodin-induced Apoptosis in Human Breast Cancer BCap-37 Cells through the Mitochondrial Signaling Pathway*, *Archives of pharmacal research.*, 31 (2008), s. 742-748.

118. Khemkaran A., Sanmati K. J. *Aloe-emodin novel anticancer Herbal Drug*, International Journal of Phytomedicine., 3 (2011), s. 27-31.
119. Kuo TC., Yang JS., Lin MW., Hsu Sch., Lin JJ., Lin HJ., Hsia Tch., Liao ChL., Yang MD., Fan MJ., Wood WG., Chung JG. *Emodin Has Cytotoxic and Protective Effects in Rat C6 Glioma Cells: Roles of Mdr1a and Nuclear Factor kB in Cell Survival*, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics., 330 (2009), s. 736-44.
120. Trybus W., Król T., Trybus E., Bednarska A. *Biologicznie aktywne związki występujące w liściach Aloe barbadensis*. V Ogólnopolska Konferencja naukowa oddziału Białostockiego PTB. Różnorodność biologiczna-od komórki do ekosystemu, 2016, s. 31.
121. Trybus W., T. Król, E. Trybus, A. Kopacz-Bednarska, E. Karpowicz, Kołaczek K. *Zmiany ultrastrukturalne w komórkach linii HeLa wywołane działaniem emodyny*. Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych (red. H. Lach), 2016, s. 121-122.
122. Trybus W., T. Król, E. Trybus, A. Kopacz-Bednarska, *Badanie wpływu emodyny na komórki linii HeLa*. Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych (red. H. Lach), 2017, s. 85-87.
123. Chiu TH., Lai WW., Hsia TCH., Yang JS., Lai TY., Wu PP., Ma CHY., Yeh CHCH., Ho CHCH., Lu HF., Wood W.G, Chung JG. *Aloe-emodin Induces Cell Death through S-Phase Arrest and Caspase-dependent Pathways in Human Tongue Squamous Cancer SCC-4 Cells*, Anticancer Research., 29 (2009), s. 4503-4512.
124. Pallepati P., Averill-Bates DA. *Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: protective role of mild heat preconditioning at 40 degrees*, C. Biochimica et biophysica acta., 1813 (2011), s. 1987-1999.
125. Hsu ChM., Hsu YA., Tsai Y., Shieh FK., Huang SH., Wana L., Tsai FJ. *Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: Finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells*, Biochemical and biophysical research communications., 392 (2010), s. 473-478.
126. Chiu TH., Lai WW., Hsia TCH., Yang JS., Lai TY., Wu PP., Ma CHY., Yeh CHCH., Ho CHCH., Lu HF., Wood W.G, Chung JG. *Aloe-emodin Induces Cell Death through S-Phase Arrest and Caspase-dependent Pathways in Human Tongue Squamous Cancer SCC-4 Cells*, Anticancer Research., 29 (2009), s. 4503-4512.
127. Kaneshiro T., Morioka T., Inamine M., Kinjo T., Arakaki J., Chiba I., Sunagawa N., Suzui M., Yoshimi N. *Anthraquinone derivative emodin inhibits tumor-associated angiogenesis through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation*, European journal of pharmacology., 553 (2006), s. 46-53.
128. Suboj P., Suboj B., Gopi DRV, Nair R.S., Srinivas P., Srinivas G. *Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF- κ B*, European journal of pharmaceutical sciences., 4 (2012), s. 581-591.
129. Handsley MM., Edwards DR. *Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis*, International Journal of Cancer 115 (2005), s. 849-860.
130. Ljubimov AV., Caballero S., Aoki AM., Pinna LA., Grant MB., Castellon R. *Involvement of protein kinase CK2 in angiogenesis and retinal neovascularization*, Investigative ophthalmology & visual science., 45 (2004), s. 4583-4591.
131. Mijatovic S., Maksimovic-Ivanica D., Radovica J., Popadic D., Momcilovica M., Harhajia L., Miljkovic D., V.Trajkovic. *Aloe-emodin prevents cytokine-induced tumor cell death: the inhibition of auto-toxic nitric oxide release as a potential mechanism*, Cellular and molecular life sciences. 61 (2004), s. 1805-1815.
132. Wang SC., Zhang L., Hortobagyi GN., Hung MC. *Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients*, Seminars in oncology, 28 (2001), s. 21-9.

133. Zhang L., Lau YK., Xia W., Hortobagyi GN., Hung MCh, *Tyrosine Kinase Inhibitor Emodin Suppresses Growth of HER-2/neu-overexpressing Breast Cancer Cells in Athymic Mice and Sensitizes These Cells to the Inhibitory Effect of Paclitaxel*, *Clinical cancer research*, 5 (1999), s. 343-353.
134. Trybus W., T. Król, E. Trybus, A. Kopacz-Bednarska, Stachurska A. *Aloe-emodin induces autophagy in HeLa cells*. *Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism* (red. H. Lach), 2016, s. 75-76.
135. Fenig E., Nordenberg J., Beery E., Sulkes J., Wasserman L. *Combined effect of aloe-emodin and chemotherapeutic agents on the proliferation of an adherent variant cell line of Merkel cell carcinoma*, *Oncology Reports*, 11 (2004), s. 213-217.
136. Vargas F., Rivas C., Medrano M. *Interaction of emodin, aloe-emodin, and rhein with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study*, *Toxicol Mech Methods.*, 14 (2004), s. 227-31.
137. Ye ZW., Ying Y., Yang X.L., Zheng ZQ., Shi JN., Sun YF., Huang P. *A spectroscopic study on the interaction between the anticancer drug erlotinib and human serum albumin*, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.*, 78 (2014), s. 405-413
138. Yang X., Ye Z., Yuan Y., Zheng Z., Shi J., Ying Y. *Insights into the binding of paclitaxel to human serum albumin: multispectroscopic studies and Ping Huang*, *Luminescence.*, 28 (2013), s. 427-434.
139. Szulawska A., Czyż M. *Molekularne mechanizmy działania antracyklin*, *Postepy Hig Med Dosw.*, 60 (2006), s. 78-100

Antrachinony – związki o wielokierunkowej aktywności biologicznej

Streszczenie

Liczne badania wskazują, że stosowanie nowych związków pochodzenia roślinnego może mieć istotne znaczenie dla rozwoju medycyny klinicznej, zwłaszcza przy stosowaniu ich w terapii onkologicznej. Takimi związkami mogą być antrachinony występujące w wielu roślinach. Spośród antrachinonów największą aktywność biologiczną wykazują: aloe-emodyna, emodyna, chryzofanol, fycjon i reina. Związki te działają przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, przeciwgrzybiczo, antyoksydacyjnie, przeciwzapalnie, przeciwalergicznie, hepatoochronnie, nefroprotekcynnie, kardioochronnie oraz immunomodulacyjnie. Antrachinony mogą być również rozważane jako potencjalnie związki przeciwnowotworowe działające poprzez modulację cyklu komórkowego oraz indukcję różnego rodzaju śmierci komórkowych. Wpływają także na zmiany w kompartmentcie lizosomalnym, czego wyrazem jest indukcja procesów degradacyjnych oraz lizosomalnej śmierci komórkowej. Z uwagi, że antrachinony to związki o wielokierunkowej aktywności biologicznej, mogą być w przyszłości wykorzystane w medycynie onkologicznej.

Słowa kluczowe: antrachinony, aloe-emodyna, emodyna, związki przeciwnowotworowe

Antraquinones – compounds with multidirectional biological activity

Abstract

Numerous studies indicate that the use of new plant-derived compounds may be important for the development of clinical medicine, especially when used in oncological therapy. Such compounds may be anthraquinones found in many plants. Of the anthraquinones, ones of the highest biological activity are: aloe-emodin, emodin, chrysofanol, physcion and rhein. These compounds are antimicrobial, antiviral, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory, antiallergic, hepatoprotective, nephroprotective, cardio-protective and immunomodulatory. Anthraquinones may also be considered as potential antitumor compounds that act by modulating the cell cycle and inducing various types of cell death. They also affect changes in the lysosomal compartment, reflected in the induction of degradation processes and lysosomal cell death. Anthraquinones, as compounds with multidirectional biological activity, can be used in the future in oncological medicine.

Key words: anthraquinones, aloe-emodin, emodin, antitumor compounds

Zastosowanie ozonowanych olejów roślinnych w profilaktyce i terapii

1. Wprowadzenie

Obecnie ludzkość zmagą się z narastającymi problemami związanymi ze wzrostem liczby ludności, z szybkim starzeniem się społeczeństwa oraz chorobami cywilizacyjnymi (takimi jak otyłość czy cukrzyca) występującymi na skutek nieprawidłowego sposobu odżywiania i niewłaściwego trybu życia. Problemy te w połączeniu z niedostatecznymi programami ochrony zdrowia ujawniają trudne do rozwiązania komplikacje w leczeniu pacjentów cierpiących z powodu zakażeń skóry i błon śluzowych wywołanych przez mikroorganizmy patogenne, a także przez dysfunkcje metaboliczne [1, 2]. Występują poważne trudności podczas leczenia stopy cukrzycowej (wrzody z martwicą), odleżyn, owrzodzeń pourazowych lub po oparzeniach, przewlekłych infekcji wirusowych spowodowanych wirusem opryszczki I i II, lub ludzkiego wirusa papilloma, infekcji pochwy z powodu zakażeń *Candida*, *Trichomonas* i *Chlamidia*, zakażeń błony śluzowej odbytnicy, ropni z przetoką lub owrzodzeń jamy ustnej zwanych aftami. Zakażenia te z reguły nie zagrażają życiu pacjentów, jednak są dla nich uciążliwe, a zwłaszcza dla tych, którzy cierpią z powodu cukrzycy lub chorób naczyniowych związanych z niedotlenieniem tkanek, pacjentów lekoopornych po immunosupresji lub z towarzyszącym zakażeniem HIV. Konwencjonalna medycyna oferuje wiele, kosztownych i często mało skutecznych produktów leczniczych, ponieważ występujące infekcje są powodowane przez metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA) lub *Pseudomonas aeruginosa*, które charakteryzują się lekoopornością. Częste przyjmowanie leków jest dla pacjentów bardzo uciążliwe, zwłaszcza, że są oni dodatkowo zniechęceni brakiem efektów stosowanej terapii [1, 3]. Gojenie się ran to wielofazowy proces obejmujący kaskadę krzepnięcia krwi, stan zapalny, rozrost tkanek i ich przebudowę [4]. Jednakże w przypadku osób z cukrzycą, otyłych czy w podeszłym wieku ich układ odpornościowy nie działa w prawidłowy sposób i często mamy do czynienia z przewlekłymi, trudnymi do wyleczenia zakażeniami. Jest to jeden z powodów wyjaśniających niepowodzenie terapii i gojenia silnie zanieczyszczonych owrzodzeń [5,6].

W ostatnich kilku latach dużą nadzieję w leczeniu trudnych do wyleczenia ran i owrzodzeń, a także innych schorzeń wiąże się z zastosowaniem ozonu (O₃). Ozon przede wszystkim ma działanie bójcze wobec drobnoustrojów patogennych, a następnie, poprzez uwalnianie tlenu cząsteczkowego (O₂), pobudza proliferację

¹ monijach@kul.lublin.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Jana Pawła II, ul. Konstantynów 1i, 20-708 Lublin, <http://www.kul.pl/wydzial-biotechnologii-i-nauk-o-srodowisku,14.html>

² Koło Naukowe Studentów Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Jana Pawła II, ul. Konstantynów 1i, 20-708 Lublin, email: podstawkinga@o2.pl, <http://www.kul.pl/wydzial-biotechnologii-i-nauk-o-srodowisku,14.html>

fibroblastów, wspierając odbudowę macierzy międzykomórkowej dzięki czemu powoduje ozdrowienie [1]. Istnieje wiele dowodów naukowych potwierdzających, że ozonoterapia i ozonowane produkty pochodne są bardzo skuteczne w leczeniu wielu trudnych do wyleczenia schorzeń [7], zwłaszcza w połączeniu z terapią miejscową przy zastosowaniu ozonowanych olejów roślinnych dzięki którym następuje przenikanie i kontrolowane uwalnianie aktywnych form tlenu do warstw skóry [8]. Dlatego stosowanie ozonowanych olejów roślinnych jest obecnie najszybciej rozwijającą się metodą terapii ozonowej.

Najbardziej znanym typem olejów używanych do ozonowania jest oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia, jakkolwiek każdy rodzaj nienasyconych olejów roślinnych może być zastosowany do ozonowania. To interesujące połączenie olejów roślinnych i ozonu zostało przybliżone w niniejszej monografii. Niniejsza praca stanowi przegląd bibliograficzny zastosowania ozonu i olejów ozonowych, syntezę ozonoidów, charakterystykę fizykochemiczną ozonu, właściwości terapeutyczne a także aktywność przeciwbakteryjną ozonowanych olejów roślinnych. Przedstawiono również problemy związane z jakością ozonowanych olejów roślinnych.

2. Ozon

2.1. Co to jest ozon?

W normalnych warunkach ozon występuje w przyrodzie jako naturalny składnik atmosfery. Jest to alotropowa odmiana tlenu i w odróżnieniu od tlenu cząsteczkowego (O_2), ozon składa się z trzech atomów tlenu (O_3). Ozon jest wytwarzany w stratosferze na wysokości około 30 km w sposób ciągły w wyniku działania promieniowania ultrafioletowego (UV) o długości fali do 185 nm na tlen atmosferyczny lub w niższych warstwach podczas wyładowania elektrycznego [9, 10]. Ozon jest wyczuwalny podczas burzy, ponieważ elektryczne wyładowania piorunów między chmurami a ziemią katalizują powstawanie ozonu z atmosferycznego tlenu [7]. Ozon występujący naturalnie w stratosferze (ozonosferze), nad ziemią określany jest jako warstwa ozonowa lub ozon stratosferyczny. Warstwa ozonowa chroni powierzchnię Ziemi i organizmy żywe przed szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym i zapobiega stratom ciepła z powierzchni [11]. W związku z tym, ozon jest niezbędnym składnikiem stratosfery, absorbując promienie słoneczne, warunkuje tym samym istnienie życia na ziemi.

Chociaż ozon nie jest rodnikiem, jest o wiele bardziej reaktywny niż tlen cząsteczkowy (O_2) [9]. Pomimo, że tlen atmosferyczny składa się tylko z dwóch atomów tlenu, jest bardziej stabilny niż ozon [7]. Ponadto, ozon jest trzecim najsilniejszym czynnikiem utleniającym po fluorze i nadsiarce. Ozon ma zdolność do utleniania zarówno związków organicznych i / lub nieorganicznych, reagując z nimi w sposób natychmiastowy. Zatem ozon może utleniać błony cytoplazmatyczne wszystkich mikroorganizmów, w tym wirusy, bakterie oraz grzyby, i ostatecznie zniszczyć te mikroorganizmy. Dlatego też od wielu lat stosowany jest jako środek dezynfekujący [9]. Ozon ma zapach podobny do zapachu świeżo ściętej trawy. Ten podobny zapach może być wyczuwalny we wszystkich materiałach mających kontakt z ozonem [12].

2.2. Historia odkrycia ozonu i pierwszych jego zastosowań

Ozon został odkryty w 1840 r. przez Christiana Friedricha Schonbein (1799-1868) podczas jego pracy z ogniwem woltanicznym w obecności tlenu. Schonbein zauważył pojawienie się gazu o „elektrycznym i ostrym zapachu”, który mógłby być rodzajem „superaktywnego tlenu” [7]. Schonbein nowo odkryty przez siebie gaz ze względu na szczególnie zapach nazwał ozonem od greckiego słowa oznaczającego zapach – ozein [10]. Z kolei twierdzenie, iż ozon pochodzi z tlenu, zostało wprowadzone i w praktyce zastosowane przez chemika Wernera von Siemens, który w 1857 r. wymyślił tak zwaną rurkę super indukcji (rurkę Siemens), składającą się z dwóch elektrod płytowych umieszczonych pod wysokim napięciem, które w obecności tlenu wytwarzały ozon [7]. Był to pierwszy, laboratoryjny generator ozonu. Generatory ozonu dały możliwość sztucznego wytwarzania ozonu co z kolei pozwoliło scharakteryzować cząsteczkę ozonu oraz prowadzić badania nad wpływem ozonu na żywe organizmy, w tym na mikroorganizmy patogenne.

W 1856 r., zaledwie 16 lat po odkryciu, ozon został po raz pierwszy wykorzystywany w Stanach Zjednoczonych w placówce opieki zdrowotnej do dezynfekcji pomieszczeń operacyjnych i sterylizacji instrumentów chirurgicznych przez homeopatę Josepha Lloyda Martina [13, 14]. W tym samym roku ukazało się pierwsze doniesienie naukowe na temat zastosowania ozonowanego oleju [15].

Pod koniec XIX wieku stosowanie ozonu do dezynfekcji wody pitnej zanieczyszczonej bakteriami i wirusami było już dobrze znane w Europie. Ozon został zidentyfikowany jako silny bakteriobójczy gaz. W 1892 r. w czasopiśmie *The Lancet* ukazał się artykuł opisujący stosowanie ozonu w leczeniu gruźlicy [13].

W 1896 r. genialny konstruktor Nikola Tesla opatentował w USA pierwszy generator ozonu i następnie założył firmę „Tesla Ozone Co”, w której produkowano ozonowaną oliwę z oliwek pod nazwą „Glycozone”. Tesla wytwarzał ozonowany olej przez przepuszczanie ozonu przez czystą oliwę z oliwek w obecności pola magnetycznego przez osiem tygodni [13, 16]. W 1902 r. został opublikowany kolejny artykuł dotyczący skutecznego leczenia ozonem przewlekłej głuchoty ucha środkowego [16]. Ozon był także używany podczas pierwszej Wojny Światowej w celu dezynfekcji ran [17]. Stosowano go, u niemieckich żołnierzy, do leczenia zgorzeli gazowej spowodowanej przez zakażenie ran beztlenowymi laseczkami *Clostridium* [8]. W trakcie tej wojny niemieccy lekarze używali także ozonowanej oliwy z oliwek do opatrywania ran oraz leczenia tzw. stopy okopowej [18, 19]. W 1915 roku niemiecki lekarz dr Albert Wolff używał preparatów ozonowych w terapii raka jelita grubego i raka szyjki macicy [20]. Z kolei, w latach 30-tych XX w. w Niemczech, ozon w postaci ozonowanej oliwy z oliwek był przedmiotem wielu badań, w których był z powodzeniem stosowany w terapiach pacjentów cierpiących z powodu chorób zapalnych jelit, wrzodziejącego zapalenia okrężnicy, choroby Crohna i przewlekłej biegunki bakteryjnej [19].

W kolejnych latach, w Berlinie powstaje Instytut Terapii Tlenowej, a w Nowym Jorku rozpoczyna swoją praktykę założyciel naturopatii, dr Benedict Lust, który publikuje wiele artykułów dotyczących ozonu. Leczenie ozonem staje się bardzo popularne w Niemczech. A w 1959 roku zostaje opatentowana przez dr Joachima Hanslera pierwsza niemiecka maszyna do ozonowania nazywana „Ozonosan” stanowiąca podstawę do rozwoju niemieckiej terapii ozonowej [13, 16].

W 1971 r. zostaje utworzony Międzynarodowy Instytut Ozonowy (International Ozone Institute, w skrócie IOI), przemianowany w 1973 r. na towarzystwo naukowe o nazwie: International Ozone Associations (IOA) działające do dzisiaj. Powstanie tych instytucji miało na celu służyć rozwojowi myśli i technologii związanych z wieloaspektowymi zastosowaniami ozonu w przemyśle i medycynie. IOA przez lata swojej działalności wprowadziła szereg ogólnościatowych programów zajmujących się m.in. następującymi zagadnieniami: zastosowanie ozonu w dezynfekcji wody i ścieków, w produkcji i przetwórstwie żywności oraz badanie medycznych zastosowań ozonu [10].

2.3. Właściwości fizyczne i chemiczne ozonu

Ozon, jako trójatomiczna forma tlenu, jest gazem cięższym od powietrza. Posiada charakterystyczny ostry zapach. W postaci gazowej jest bezbarwny, w grubszych warstwach ma kolor jasnoniebieski. Gazowy ozon skrapla się poniżej temperatury $-111,9^{\circ}\text{C}$, a zestala poniżej $-192,7^{\circ}\text{C}$ [21]. W stanie ciekłym jest prawie nieprzezroczysty o zabarwieniu intensywnie ciemnoniebieskim. Jest bardzo silnym utleniaczem. Utlenia wszystkie metale (oprócz złota i grupy platyny), szereg innych pierwiastków, rozkłada halogenowe połączenia (oprócz fluorowodoru) i niektóre sole. Przekształca niższe tlenki na wyższe. W reakcji z nadtlenkiem wodoru zachowuje się jak reduktor [21]. Ozon reagując ze związkami organicznymi powoduje ich utlenienie, w skutek czego niszczy mikroorganizmy, sterylizuje powietrze i wodę oraz niweluje nieprzyjemne zapachy [7, 21-23].

Ozon jest bardzo reaktywnym, ale niestabilnym i trudno przechowywalnym gazem, który musi być wyprodukowany z tlenu „tuż przed użyciem” i zastosowany natychmiast. Nie można więc wytwarzać ozonu na zapas. Ozon w stanie gazowym jest nietrwałym termicznie gazem który po utlenieniu zamienia się w tlen [7]. Rozpuszczalność ozonu w wodzie jest 10 razy większa niż tlenu. Wraz z ze wzrostem temperatury wody rozpuszczalność ozonu maleje. Z kolei w niskich temperaturach i stężeniach ozon rozkłada się wolno. W wyższych temperaturach szybkość rozkładu wzrasta. Mechanizm rozkładu ozonu jest dosyć złożony. Mogą go przyspieszać niektóre gazy (tlenek azotu, chlor) i metale (platyna) oraz tlenki srebra, miedzi, żelaza, chromu i niklu. Przy dużych stężeniach ozonu proces rozpadu przebiega wybuchowo, dlatego w stanie ciekłym i stałym może być stosowany jako materiał wybuchowy i inicjujący [21].

2.4. Toksyczność ozonu

Wdychanie ozonu przez człowieka może powodować poważne problemy zdrowotne jeśli jego stężenie we wdychanym powietrzu przekroczy bezpieczną wartość. Toksyczność ozonu jest zależna od jego stężenia, czasu ekspozycji i sposobu podania do organizmu. Podczas wdychania ozonu mogą pojawiać się nieodwracalne zmiany w komórkach rzęskowych płuc, zmieniając strukturę ich błon komórkowych, często doprowadzając do zwłóknienia płuc. Po dostaniu się do komórek ozon może hamować działanie enzymów komórkowych, wstrzymując oddychanie wewnątrzkomórkowe [10, 24]. W tabeli 1 przedstawiono dopuszczalne limity dla poziomów ozonu w powietrzu.

Ozon jest gazem drażniącym dlatego jego obecność w warstwie atmosfery przy powierzchni czyli w troposferze ma negatywny wpływ na zdrowie ludzkie i roślinność. W odróżnieniu od tzw. dobrego ozonu występującego naturalnie w warstwie ozonowej stratosfery ozon troposferyczny lub przyziemny jest zwykle nazywany złym ozonem. Jest jednym ze składników smogu fotochemicznego, powstającego głównie latem przy wysokich temperaturach i ciśnieniu w miastach o bardzo dużym ruchu samochodowym, ale najwyższe stężenia mogą występować na obszarach pozamiejskich dokąd transportowane są prekursorzy ozonu z miasta. Poziom docelowy stężenia 8-godzinnego dla ozonu wynosi $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ i może być przekraczany nie więcej niż 25 dni w ciągu roku. Poziom informowania społeczeństwa wynosi $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$, a poziom alarmowy $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Ozon występujący w troposferze przy powierzchni Ziemi to zanieczyszczenie wtórne [11, 25] związane z działalnością przemysłową. Powstaje on na skutek przemian fotochemicznych w powietrzu, powodowanych między innymi przez obecność takich prekursorów jak tlenki azotu, węglowodory i tlenki węgla. Ozon może powodować chwilowe zaburzenia funkcji oddechowych, szybki i płytki oddech oraz bóle głowy, zwłaszcza przy większym wysiłku fizycznym. Wysokie stężenia ozonu mogą z kolei powodować podrażnienia górnego odcinka dróg oddechowych, kaszel i napady duszności. Możliwe są podrażnienia i swędzenie oczu, bóle klatki piersiowej, podrażnienia śluzówki, a także choroby dróg oddechowych (nosa, gardła i płuc) [11, 25]. Badania na zwierzętach potwierdziły szkodliwe działanie wdychania ozonu na układ oddechowy, procesy odpornościowe oraz wykazały jego genotoksyczność [10, 24].

Tabela 1. Oddziaływanie ozonu troposferycznego wdychanego drogą oddechową na żywe organizmy [25, 26]

Oddziaływanie	Wartość stężenia O_3 [ppm]	Wartość w przeliczeniu na $[\text{mg}/\text{m}^3]$
Dopuszczalne stężenie ozonu na stanowisku pracy przy ekspozycji 8 h	0,05-0,1	0,107 - 0,2
Wyczuwalność zapachu - średnia	0,02	0,04
Wyczuwalność zapachu - w zależności od właściwości organizmu	0,01-0,04	0,02-0,086
Minimalne stężenie wywołujące podrażnienie oczu, nosa, gardła, ból głowy, skrócenie oddechu	od 0,1	od 0,2
Zaburzenia oddychania, zmniejszenie przyswajania tlenu, zaburzenia oddychania, ogólne zmęczenie i ból w piersiach, suchy kaszel	0,5-1,00	1,07-2,14
Ból głowy, zaburzenia oddychania, senność, ciężkie zapalenie płuc przy dłuższej ekspozycji	1-10	2,14- 21,4
Niebezpieczeństwo dla życia i zdrowia	10	21,4
Stężenie śmiertelne dla małych zwierząt w ciągu 2 godzin	15-20	32,1-42,8
Śmiertelne stężenie w ciągu kilku minut	powyżej 1700	powyżej 3 638

Źródło: Wojewódzki Inspektorat Środowiska w Warszawie [25, 26]

Jednakże należy podkreślić, iż inne formy podania ozonu niż wziewna, zwłaszcza w postaci preparatów bakteriobójczych, stosowanych zgodnie z zaleceniami medycznymi i w sposób prawidłowy są metodami bezpiecznymi i nietoksycznymi [10, 27, 28].

2.4.1. Mechanizm działania ozonu w komórce

Ozon jako czynnik egzogenny wyzwalający aktywne formy tlenu odpowiada za szereg efektów biologicznych [24]. Ozon w postaci rodnikowej przenika przez błony komórkowe drobnoustrojów. Mikroorganizmy tlenowe posiadają systemy obronne inaktywujące reaktywne formy tlenu. Jednak te możliwości komórki są ograniczone i ich wyczerpanie może skutkować drastycznym wzrostem stężenia rodników tlenowych. W badaniach *in vitro* wykazano, że w wyniku działania ozonu dochodzi do pęknięć połączeń pomiędzy pętlami podwójnej nici DNA jak i białkami. Jednakże w warunkach *in vivo* ten dramatyczny proces uszkodzeń DNA może być szybko usuwany przez istniejące w komórce systemy naprawcze oraz stężenie samego ozonu w żywej komórce może być niższe [10, 24].

W pierwszym etapie działania ozonu na mikroorganizm dochodzi do szybkiego przzerwania ściany komórkowej bakterii. Następnie reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów wchodzących w skład błony cytoplazmatycznej ulegają peroksydacji, co prowadzi do powstania nadtlenuków tych związków. Produkty peroksydacji zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych. Powodują ich depolaryzację, hamują aktywność enzymów błonowych i białek transportowych. Ponadto, w reakcjach z silnymi utleniaczami takim jak ozon dochodzi do utlenienia aminokwasów, białek i kwasów nukleinowych [10, 23]. Rodniki rozkładają strukturę wewnątrzkomórkową mikroorganizmu. Proces niszczenia np. *Escherichia coli* za pomocą ozonu przebiega tysiącrotnie szybciej niż w przypadku użycia chloru [21].

Inaktywacja bakterii ozonem jest procesem złożonym. Ozon „atakuję” liczne składniki komórkowe, w tym białka, nienasycone kwasy tłuszczowe i enzymy oddechowe w błonach komórkowych, peptydoglikany w ścianie komórkowej, enzymy i kwasy nukleinowe w cytoplazmie oraz białka i peptydoglikan w komórkach zarodników i kapsułach wirusów. Niektórzy autorzy twierdzą, że ozon w cząsteczce jest głównym dezaktywatorem mikroorganizmów, inni z kolei podkreślają aktywność przeciwbakteryjną reaktywnych produktów ubocznych rozkładu ozonu, takich jak OH^- , O_2^- i OH [8].

2.4.2. Zastosowania ozonu

Dzięki wykazaniu silnej i szerokiej aktywności bakteriobójczej ozonu oraz zbudowaniu przemysłowych generatorów nastąpiło szybkie wykorzystanie ozonu w przemyśle do dezynfekcji wody. Przemysłowy sposób otrzymywania ozonu polega na przepuszczeniu powietrza (tlenu) przez urządzenia zwane ozonatorami, w których zachodzą powierzchniowe wyładowania elektryczne. Efektywność tego procesu zależy od takich czynników jak rodzaj gazu (powietrze, czysty tlen), siła pola elektrycznego i typ generatora [21]. Na świecie jest ponad 3000 obiektów komunalnych, które

wykorzystują ozon do dezynfekcji. Ponieważ wzrasta globalne zapotrzebowanie na wodę ozon stał się niezbędny w zapobieganiu rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych [7].

Działalność bakteriobójcza ozonu jest około 50-krotnie skuteczniejsza i 3000 razy szybsza niż chloru. Dlatego szeroko stosuje się ozon nie tylko do dezynfekcji wody do picia ale także wody w basenach, wody przemysłowej, wody do celów chłodniczych oraz ścieków. W badaniach porównawczych aktywności ozonu i podchlorynu sodu wobec bakterii pochodzących ze ścieków szpitalnych (głównie *Enterococcus*) wykazano zdecydowanie wyższą skuteczność bakteriobójczą ozonu, nawet wobec enterokoków opornych na wankomycynę, w znacznie krótszym czasie [10, 29-31].

Obecnie ozon jest także wykorzystywany do dezynfekcji powietrza w ośrodkach użyteczności publicznej takich jak teatry, kasyna czy szpitale oraz pomieszczeń mieszkalnych zwłaszcza w celu ich odgrzybienia, najczęściej z gatunków *Stachybotrys chartarum* lub *Aspergillus versicolor* [29]. Po zakończonym procesie sterylizacji ozonem pomieszczenia mogą być użytkowane dopiero po odpowiedniej wentylacji, gdy resztki ozonu ulegną usunięciu lub rozkładowi [10] (patrz Tabela 1).

Ozon zaczyna być także stosowany w przemyśle spożywczym. Może być dodawany do płynów używanych do mycia warzyw, owoców, ryb czy mięsa w celu ich dezynfekcji i co za tym idzie przedłużenia trwałości tych produktów [32, 33].

Ozon ma również zastosowanie w stomatologii, jednakże nie jest to jeszcze zjawisko powszechne. Aktualnie dostępne są na rynku nowoczesne zestawy stomatologicznych generatorów ozonu pozwalające na precyzyjną i bezpieczną aplikację ozonu w obrębie jamy ustnej. Dzięki temu możliwe jest leczenie zapalenia dziąseł i przyzębia, afty, opryszczki oraz kandydozy jamy ustnej, leczenia próchnicy oraz zakażeń miazgi zęba. Zakażone i trudno gojące się rany w obrębie jamy ustnej są także z sukcesem leczone za pomocą ozonu, który jest stosowany w implantologii i chirurgii stomatologicznej [23]. Bardzo dobre właściwości przeciwdrobnoustrojowe ma zastosowanie ozonowanej wody o stężeniu ozonu do 5 $\mu\text{g/ml}$, podobnie jak podchlorynu sodu i diglukonianu chlorheksydyny, w porównaniu do mniej skutecznych gazowego ozonu o stężeniu 1mg/ml i nadtlenu wodoru [34, 35].

2.4.3. Ozonoterapia

Wykorzystanie ozonu nie tylko do celów dezynfekcyjno-profilaktycznych ale także terapeutycznych jest ciągle badane. Pojawia się coraz więcej zwolenników tzw. terapii tlenowych lub ozonowych czyli ozonoterapii. Terapie te wykorzystują na wiele różnych sposobów tlen, ozon lub nadtlenek wodoru, które w formie gazowej, poprzez wodę lub olej roślinny są stosowane w celu zabicia mikroorganizmów patogennych, poprawienia funkcji komórkowej i promowania gojenia uszkodzonych tkanek [13, 36].

Tlen jest najważniejszym składnikiem niezbędnym do życia ludzkiego i jest kluczem do dobrego stanu zdrowia. Najlepszym sposobem na optymalizację zdrowia jest natlenianie każdej komórki w naszym ciele. Im więcej tlenu mamy w naszym systemie komórkowym, tym więcej energii możemy wytwarzać i efektywniej możemy wyeliminować produkty odpadowe naszego metabolizmu. W związku z tym, że ozon jest cząsteczką z dodatkowym tlenem, powinien być wprowadzany w dużych ilościach

do organizmu, tak aby pojedyncza cząsteczka tlenu, niezależnie i swobodnie krążąca, mogła atakować wszystkie niedojrzałe, chore i zdeformowane komórki, obce ciała, takie jak wirusy, bakterie czy grzyby itp., zwiększając stabilność prawidłowych, zdrowych komórek w organizmie [13].

Jednym z obszarów stosowania ozonu jest leczenie ozonem medycznym. Początek badań naukowych dotyczących terapii ozonowej zaczyna się w latach pięćdziesiątych XX w. Duża część danych dotyczących tej terapii wynika z doświadczeń specjalnych centrów ozonowych lub indywidualnych obserwacji praktyków zainteresowanych ozonoterapią [12]. Liczne prace kliniczne potwierdzają skuteczność stosowania ozonu w profilaktyce i leczeniu zakażeń w ortopedii i traumatologii narządu ruchu. Ozonoterapię stosowano w profilaktyce zakażeń szpitalnych po planowanych, rekonstrukcyjnych zabiegach ortopedycznych oraz do leczenia przewlekłych ran, owrzodzeń tkanek miękkich, zakażonych ran pourazowych [10, 37-39]. Także z dużą skutecznością zastosowano ozon w leczeniu zapalenia otrzewnej i ropnych zapaleń w obrębie miednicy mniejszej [40, 41]. Jednakże nadal brakuje medycznych wskazań dla ozonoterapii podpartych odpowiednio przeprowadzonymi kontrolowanymi badaniami eksperymentalnymi i klinicznymi [10, 12]. Mimo to, miliony ludzi obu płci i różnych grup wiekowych są poddawani ozonoterapii każdego dnia [12].

W ozonoterapii medycznej ozon wytwarza się przez przekształcanie tlenu dostarczonego z butli zawierającej tlen medyczny o czystości 100% do ozonu za pomocą generatora. Ozon łatwiej rozpuszcza się w płynach, w tym w osoczu, niż tlen, a gdy krew jest ozonowana, ozon reaguje z rozpuszczalnymi przeciwutleniaczami, wolnymi kwasami tłuszczowymi i białkami w osoczu [40].

Ozonoterapia z zastosowaniem ozonowanych olejów roślinnych jest ciekawą alternatywą dla powyższych zastosowań ozonu. Dostępność olejów roślinnych oraz łatwość ich uzyskiwania, oprócz niskich kosztów eksploatacji pozwalają na stosowanie ozonu i pokrewnych produktów w leczeniu różnych chorób, zwłaszcza przewlekłych ran [8]. Dodatkowym argumentem za stosowaniem olejów roślinnych jako nośnika dla ozonu jest fakt, że wytworzony w generatorze gaz ozonowy szybko ulega rozkładowi w atmosferze. Ozonizacja olejów roślinnych wydaje się więc zwiększać jego stabilność w zastosowaniach klinicznych, utrzymując aktywność ozonu przez okres do 2-3 lat [8, 41]. Materiały ozonowane, w których cząsteczka ozonu jest stabilizowana jako ozonid w oleju, mają zdolność do dostarczania powstającego tlenu głęboko w obszar poddany działaniu preparatu bez powodowania podrażnień [1].

3. Ozonowane oleje roślinne

Zauważono, że w trakcie ozonowania krwi, ozon reaguje ze wszystkimi rozpuszczalnymi antyutleniaczami i wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi i tlenkami [42]. Mechanizm ten zasugerował, że niektóre oleje płynne mogą być stosowane w leczeniu różnych schorzeń po ich ozonowaniu. Potencjał zastosowania w terapii olejów ciekłych występuje dzięki obecności w ich kwasach tłuszczowych nienasyconych wiązań, które byłyby ozonowane. W wyniku reakcji z ozonem, dochodzi do utlenienia podwójnych wiązań i jeden atom tlenu łączy się z nienasyconymi pod-

wólnymi wiązaniami. Ozonowane oleje są stosowane w wielu chorobach, takich jak schorzenia stawowe i skórne [43]. Ozonowane oleje, zawierające pierścienie 1,2,4-trioksolanowe utworzone w nienasyconym łańcuchu kwasów tłuszczowych, można więc uznać za substancję czynną, a jednocześnie nośnik, zwiększając absorpcję i penetrację skóry [8].

3.1. Proces ozonowania olejów roślinnych

Oleje roślinne zawierają 97-98% trójglicerydów. W zależności od ich pochodzenia i natury mają zmienną kompozycję nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych związanych z szkieletem glicerynowym [44]. Olej do ozonowania można otrzymać z różnych roślin m.in. z oliwek, nasion słonecznika czy lnu itd. Pomimo, że każda z tych substancji jest nazywana olejem to bardzo różnią się między sobą budową i składem. Mają różne zawartości jakościowo-ilościowe kwasów tłuszczowych. Na przykład oliwa z oliwek zawiera dużą ilość kwasu oleinowego (65% - 85%), natomiast olej ze słonecznika zawiera tego kwasu zaledwie od 14% do 39%. Oprócz tego oliwa zawiera także kwas linolowy w ilości 48-74%. Nienasycone kwasy tłuszczowe nadają olejom wiele korzystnych właściwości. Połączenie z ozonem tych olejów zachodzi tylko za pomocą podwójnego wiązania węgiel-węgiel nienasyconych kwasów tłuszczowych. Reakcja ta powoduje tworzenie się związków chemicznych, takich jak ozonidy, wodoronadtlenki, nadtlenki polimeru i inne nadtlenki organiczne [45]. Nadtlenki są najważniejszymi produktami i prawdopodobnie są odpowiedzialne za szeroką aktywność biologiczną opisanych ozonowanych olejów roślinnych [46]. Ozonidy i nadtlenki są również odpowiedzialne za działanie bakteriobójcze, a także właściwości stymulowania naprawy i regeneracji tkanek [47].

Utlenianie podwójnych wiązań powoduje rozszczepienie łańcucha alkilowego lub nadanie mu dodatkowych funkcji [48]. Ważnym przykładem procesu ozonowania olejów jest oksydacyjne rozszczepianie podwójnych wiązań przy użyciu reakcji ozonolizy. Ozonoliza jest wygodną i wysoce skuteczną metodą ozonowania ze względu na całkowitą reakcję ozonu z materiałem wyjściowym [8]. Mechanizm ozonolizy opisał Criegee w 1975 roku [49].

Reakcje chemiczne zachodzące podczas przepuszczania ozonu przez olej są bardzo złożone. Analiza tych reakcji dostarcza informacji o zmianie grupy funkcyjnej podczas ozonowania, a także może służyć do identyfikacji produktów bez użycia uprzednich technik separacyjnych [8]. Wydajność uzyskania produktów ozonowanych zależy od warunków reakcji, takich jak temperatura, czas, typ generatora ozonu i stężenie ozonu [47]. Proces ozonolizy, zbadano dla takich olejów jak oliwa z oliwek [50], rzepakowy [51], słonecznikowy [8, 46, 50, 52], sezamowy [47, 53] i kokosowy [54].

Analizy widm FT-IR, NMR ¹H i ¹³C potwierdzają zmiany strukturalne, które zachodzą w olejach podczas ozonowania. W czasie trwania reakcji ozonowania intensywność pasm odpowiadająca podwójnym wiązaniami (C = C) maleje, a pasmo identyfikujące powstawanie ozonidów wzrasta [47, 55, 56].

Główną reakcją utleniania przez ozon nienasyconych kwasów tłuszczowych jest powstawanie pierścieni 1,2,4-trioksolanowych, które można zidentyfikować za pomocą sygnałów obserwowanych na widmie ¹H NMR o charakterystycznych przesunięciach chemicznych [53, 57].

Ozonowanie oleju kokosowego w obecności wody prowadzi do tworzenia się wyższych ozonidów. Gdy do reakcji oleju kokosowego z ozonem dodaje się etanol, następuje wyższy rozkład nadtlenu, a to sprzyja tworzeniu się kwasów i aldehydu [54].

Badanie właściwości fizyko-chemicznych ozonowanych olejów roślinnych ma duże znaczenie dla ich charakterystyki i identyfikacji. W celu określenia jakości produktów ozonowanych, zwykle przeprowadza się metody analityczne, takie jak wartość nadtlenna, kwasowość i wartość jodowa [47, 58]. Wartość nadtlenna (PV) określa ilość nadtlenu w próbce; wartość kwasowa (AV) reprezentuje obecność wolnych kwasów; a wartość jodu (IV) jest miarą całkowitej liczby podwójnych wiązań w próbce. Wymienione metody są opisane w odpowiednich monografiach farmakopei europejskiej [59-61].

Zgodnie z patentem kubańskim (patent USA nr PI 0309256-1 A), opublikowanym w 2005 r., reakcję ozonolizy prowadzono aż do uzyskania wartości nadtlenkowej pomiędzy 600-800 jednostek i wartością kwasowości mniejszą niż 15 mg/g dla oleju słonecznikowego. Wartość nadtlenna pomiędzy 1000-1200 jednostek i wartość kwasowości poniżej 30 mg/g uzyskano w odniesieniu do oleju kakaowego, stosowanego przy wytwarzaniu kremów terapeutycznych i kosmetycznych [62].

Wartość kwasowa ozonowanych olejów nie wskazuje bezpośrednio na jakość oleju lub proces zjełczenia tłuszczu [47]. Wzrost wartości kwasowej zanotowano w kilku pracach jako wydłużenie czasu reakcji [47, 51, 53], co może wynikać z tworzenia się kwasu podczas ozonowania oraz z powodu rozkładu nadtlenu [8].

W przypadku ozonowanych olejów wartość jodowa wykazała spadek w stosunku do stosowanej dawki ozonu. Działanie ozonu na nienasycone kwasy tłuszczowe doprowadziła do szybkiego spadku wartości jodowej [47, 51].

3.2. Wchłanianie preparatów olejowych przez skórę i błony śluzowe

Skóra zapewnia mikrobiologiczną, fizyczną i biologiczną barierę przed zewnętrznymi czynnikami i jest powierzchnią do penetracji kosmetyków lub aktywnych farmaceutyków [63]. Warstwy skórne składają się z: warstwy rogowej (10-20 μm), żywego naskórka (50-100 μm), tkanki skóry właściwej (1-2 mm) i warstwy podskórnej. Każda warstwa spełnia określone funkcje [64].

Substancja aktywna może zostać uwolniona i wchłonięta przez organizm w wyniku różnych ścieżek penetracji. Jedną z nich jest wchłonięcie przez skórę lub błony śluzowe [63]. Oleje roślinne mogą ułatwiać przenikanie przez skórę dzięki trzem różnym mechanizmom: zwiększenie okluzji, poszerzenie szlaku biegunowego i poszerzenie szlaku niepolarnego [65]. Ponadto stwierdzono, że oleje roślinne praktycznie nie powodują podrażnień skóry ani problemów uczulających [66, 67].

Wchłanianie i przenikanie składników aktywnych produktów do skóry jest zależne zarówno od stanu skóry jak i składu produktu. Najlepszymi środkami zwiększającymi wchłanianie i penetrację skóry są oleje z dużą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak kwas oleinowy (omega 9), kwas linolowy (omega 6) i kwas linolenowy (omega 3), ale głównie kwasy oleinowe i linolowe [8].

3.3. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe ozonowanych olejów roślinnych

Działanie bójcze ozonu zostało udowodnione dla szerokiej grupy mikroorganizmów, w tym bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz zarodników grzybów i komórkach wegetatywnych [68]. Bakteriobójcze, grzybobójcze i wirusobójcze właściwości ozonu są przypisywane jego zdolności do zniszczenia wielu struktur enzymatycznych. Należy podkreślić, że każdy mikroorganizm ma specyficzną wrażliwość na ozon. Bakterie są bardziej wrażliwe niż drożdże i grzyby. W wyniku różnic w strukturze ścian komórek bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe na ozon niż Gram-ujemne [69-70]. Prawdopodobnie, gdy ozonid w formie stałej ma kontakt z raną z wysiękiem, powoli ulega rozkładowi do różnych nadtlenków, co może wyjaśnić przedłużoną aktywność przeciwbakteryjną i stymulującą naprawę tkanek [1].

Ozonowane oleje z oliwek i oleju słonecznikowego wykazują aktywność przeciw *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ozonowana oliwa z oliwek i olej słonecznikowy o liczbie nadtlenkowej równym 2439 i 2506 mmol – ekwiwalent kg^{-1} wykazywały minimalne stężenia hamujące (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) wynoszące 0,95 mg/ml dla wszystkich badanych bakterii [8]. Najnowsze badania potwierdzają skuteczność przeciwdrobnoustrojową ozonowanej oliwy z oliwek wobec cyst *Giardia lamblia* [71], *Leishmania major* [72], *Corinebacterium minutissimum* [73] oraz w drożdżycy dopochwowej [74].

Ozonowany olej słonecznikowy ma szerokie spektrum przeciwbakteryjne, wykazujące bakteriobójczą aktywność wobec bakterii zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych odpornych na antybiotyki, na przykład wobec gatunków *Mycobacterium*, drożdży *Candida* i niektórych pierwotniaków, takich jak *Giardia lamblia*, a także wielooporne Gram-dodatnie (paciorkowce, gronkowce, enterokoki) i Gram-ujemne bakterie (*P. aeruginosa* i *E. coli*), izolowane z różnych miejsc i materiałów (oczy, skóra, ropa, kał) [75, 76]. Wartości MIC (z wyłączeniem *Mycobacterium*) mieściły się w granicach: 1,18–9,5 mg/ml. Badania wykazały, że spośród badanych szczepów najbardziej wrażliwe były *Mycobacterium* spp. (MIC: 0,95–2,37 mg/ml) [10, 75]. Zauważono, że im wyższa zawartość nadtlenków tym wyższa aktywność przeciwbakteryjna ozonowanego oleju słonecznikowego [51].

Ze względu na właściwości przeciwbakteryjne ozonowanych olejów roślinnych istnieje wiele patentów opisujących ich zastosowanie w leczeniu chorób zakaźnych, takich jak zapalenie skóry, trądzik, owrzodzenia, oparzenia i inne zmiany skórne [77-80]. Ozonowane oleje są stosowane jako środek przeczyszczający i do leczenia zakażeń jelitowych, gdzie działają przeciw patogennym mikroorganizmom jelit [81] oraz w leczeniu zakażeń *Giardia lamblia* [82]. Ostatnio opisano ich zastosowanie w leczeniu zakażeń wywołanych przez owsika ludzkiego, opryszczkę narządów płciowych, wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) i grzyby, z rodzaju *Candida* [83].

Dzięki działaniu ozonowanej oliwy na rany, nastąpiło łagodniejsze i szybsze gojenie się ran. Potwierdzono to w kontrolowanym badaniu klinicznym z pojedynczą ślepą próbą. W badaniu uczestniczyło 18 pacjentów podzielonych na grupę badaną (n=8)

i grupę placebo (n=10). Zauważono znaczącą poprawę w zmniejszeniu wielkości rany podniebiennej i gojeniu nabłonka po zaaplikowaniu ozonowanej oliwy w porównaniu do grupy z podawanym placebo [84]. Wyniki te potwierdza najnowszy eksperyment medyczny przeprowadzony na grupie 50 pacjentów z schorzeniami jamy ustnej (afty, opryszczka wargowa, kandydioza jamy ustnej czy liszaj płaski). Każdy z pacjentów przez co najmniej 6 miesięcy miał dwa razy dziennie aplikowaną ozonowaną oliwę z oliwek. U każdego pacjenta zanotowano poprawę lub całkowite wyleczenie. U żadnego z pacjentów nie zaobserwowano objawów toksyczności ani działań niepożądanych po zastosowaniu oliwy z oliwek [85].

Kolejne kontrolowane badanie kliniczne z pojedynczą ślepą próbą przeprowadzono na 30 pacjentach, których podzielono na trzy równe grupy. Jedna grupa przyjmowała ozonowany olej sezamowy, druga grupa olej sezamowy a trzecia – placebo. W tym badaniu wykazano znaczącą redukcję wielkości wrzodu i rumienia a także znaczące zmniejszenie objawów bólowych u pacjentów, którym podawano ozonowany olej sezamowy w porównaniu do grupy z zastosowanym placebo [86]. Zespół Solovastru i wsp [87] przeprowadził randomizowane badania kliniczne na grupie 29 pacjentów z chronicznymi żylakami i owrzodzeniami nóg. Pacjenci w grupie badanej przez 30 dni stosowali spray zawierający ozonowany olej z dodatkiem α -bisabololu. Wyniki tych badań dają nadzieję na skuteczne stosowanie połączenia ozonowanego oleju i α -bisabololu do leczenia owrzodzeń żylnych.

3.4. Preparaty ozonowanych olejów roślinnych dostępne na rynku

Ozonowany olej jest naturalnym preparatem dostępnym w wielu krajach na świecie [8]. Ozonowany olej słonecznikowy (Oleozon®) został przetestowany i wykazuje znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko wirusom, bakteriom i grzybom [51, 74, 88].

Na rynku dostępne są także ozonowane oleje pochodzące z innych roślin, na przykład wykonane z oleju kokosowego (maść Cocozone, Wielka Brytania), z oliwy z oliwek (maść Ozonized Olive Oil, Kanada; maść O2-Zap, USA; kapsułki Ozolife Softgels, Hiszpania; płyn Ozonella, Polska) czy z oleju lnianego (płyn Ozonella Len, Polska) [8, 89, 90].

Produkty dostępne na rynku mogą występować w formie stałej jako maść, w formie płynnej lub też w postaci doustnej kapsułki miękkiej. Maści i płyny są najczęściej produkowane jako preparaty kosmetyczne do stosowania zewnętrznego. Preparaty w kapsułkach są zwykle kwalifikowane jako suplementy diety.

Ozonowana oliwa z oliwek w formie maści jest przygotowywana przy użyciu ozonu przepuszczanego przez naturalną, czystą oliwę z oliwek z pierwszego tłoczenia do momentu uzyskania gęstej maści podobnej do wazeliny. Ozonowanie może trwać dwa dni, aż dojdzie do zestalania się [91].

Z powodu złożoności mieszanin związków powstających podczas reakcji ozonowania jest mało danych na temat składu chemicznego ozonowanych olejów. Ten aspekt jest głównym ograniczeniem do rejestracji tych preparatów jako produktów leczniczych [8].

3.5. Problemy z ozonowanymi olejami roślinnymi

Pomimo szybkiego wzrostu sprzedaży ozonowanych olejów, w tym sprzedaży bezpośredniej przez internet, ich jakość i skuteczność nadal nie są odpowiednio potwierdzone. Jeśli chcemy uzyskać ozonowane oleje o odpowiedniej jakości i skuteczności, należy wziąć pod uwagę przede wszystkim następujące cechy organoleptyczne [12]:

- Wygląd,
- Zapach,
- Materiał opakowaniowy.

Dla przykładu, oliwa z oliwek (extra virgin) może mieć kolor w różnych odcieniach zieleni. Kiedy oliwa z oliwek jest prawidłowo ozonowana i utwardzona, traci swój oryginalny pierwotny kolor i ostatecznie staje się bezbarwna, podobnie jak woda. Zmiana barwy pokazuje nasycenie tlenem podwójnych wiązań nienasyconych kwasów tłuszczowych. Dodatkowo ozonowany olej jest bardziej przezroczysty i lepki niż oliwa z oliwek. Gęstość oleju jest zależna od czasu ozonowania. Ozonowana oliwa z oliwek będzie stopniowo wraz z efektem utleniania podwójnych wiązań kwasów tłuszczowych bardziej przezroczysta i lepka niż nieozonowana oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia. Jeśli ozonowany olej nie jest bezbarwny i przezroczysty oznacza to jego niewystarczające ozonowanie [53].

Ozonowane oleje należy wprowadzać do obrotu w butelkach z ciemnego szkła, aby uniknąć działania światła słonecznego. Niestety przez ciemne szkło nie można zobaczyć koloru oleju, stąd klient może mieć problem z określeniem jakości ozonowanego oleju. W takiej sytuacji kolor produktu powinien być określony przez otwarcie butelki.

Jak wspomniano powyżej, ozon ma niepowtarzalny zapach, a zapach ozonowanych olejów może być podobny do zapachu ozonu. Ten zapach ogranicza jego użycie przez niektórych wrażliwych użytkowników. Dlatego niektórzy producenci opracowali produkty dla odbiorców wrażliwych na zapachy poprzez dodanie niewielkiej ilości aromatu do ozonowanego oleju. Nawet jeśli naturalny zapach ozonu został zamaskowany aromatem, powinno się dać wyczuć przebijający ostry zapach ozonu. Ta cecha może być dobrym wskaźnikiem do określania jakości oleju. Jednakże dodanie barwnego aromatu zapachowego może doprowadzić do zmiany kolorystycznej bezbarwnego i przejrzystego oleju ozonowanego, przez co można wyciągnąć fałszywy wniosek i założyć, że produkt nie był ozonowany. W takim przypadku należy zwrócić się do producenta lub sprzedawcy o wyjaśnienie cech produktu [12].

4. Podsumowanie

Ozonoterapia za pomocą ozonowanych olejów roślinnych jest obiecującą i ciekawą alternatywą dla tradycyjnych terapii przeciwdrobnoustrojowych, a także może służyć przełamaniu trudności związanych z leczeniem trudno gojących się ran i owrzodzeń. Stosowanie ozonowanych olejów wydaje się być bezpieczne, nie powoduje podrażnień skóry i skutków ubocznych. Producenci ozonowanych olejów powinny potwierdzać ich jakość i skuteczność odpowiednimi badaniami.

Literatura

1. Travagli V., Zanardi I., Valacchi G., Bocci V. *Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review*. Mediators of Inflammation., DOI:10.1155/2010/610418. (2010), s. 1-9.
2. Mandelbaum, S. H.; Di Santis, E. P.; Mandelbaum, M. H. S. *Cicatrization: current concepts and auxiliary resources -Part I*. Anais Brasileiros de Dermatologia., 78 (2003), s. 393-410.
3. Werdin F., Tenenhaus M., Rennekampff H.-O. *Chronic wound care* The Lancet, 372, (2008), s. 1860-1862.
4. Martin P. *Wound healing-aiming for perfect skin regeneration*. Science, 276 (1997), s. 75-81.
5. Yamada N., Li W., Li W. *Platelet-derived endothelial cell growth factor gene therapy for limb ischemia*. Journal of Vascular Surgery., 44 (2006), s. 1322-1328.
6. Papanas N., Maltezos E. *Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers: new technologies, any promises?* The International Journal of Lower Extremity Wounds., 6 (2007), s. 37-53.
7. Bocci V.A. *Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art*. Archives of Medical Research., 37 (2006), s. 425-435.
8. de Almeida N.R., Beatriz A., Micheletti A.C., de Arruda E.J. *Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review*. Orbital The Electronic Journal of Chemistry., 4 (2012), s. 313-326.
9. Bocci V., Borrelli E., Travagli V., Zanardi I. *The ozone paradox: Ozon eis a strong oxidant as well as a medical drug*. Medicinal Research Reviews., 29 (2009), s. 646-682.
10. Białoszewski D., Bocian E., Tyski S. *Ozonoterapia oraz zastosowanie ozonu w dezynfekcji*. Postępy Mikrobiologii., 51 (2012), s. 177-184.
11. <https://www.gdansk.wios.gov.pl/wios/aktualnosci/23-a2015/327-wplyw-ozonu-i-promieniowania-uv-na-zdrowie-czlowieka.html> (pobrano dn. 30.03.2017 r.)
12. Uysal B. *Ozonated olive oils and the troubles*. Journal of International Ethnopharmacology., 3 (2014), s. 49-50.
13. Jani P., Patel G., Yadav P., Sant L., Jain H. *Ozone therapy: The alternative medicine of future*. The International Journal of Pharma and Bio Sciences., 2 (2012), s. 196-203.
14. McCabe E. *The abbreviated history and suppression of ozone therapy in the USA*. McCabe 1994.
15. Thompson T. *Observation on the medical administration of ozonized oils*. Medico-chirurgical transactions., 42 (1859), s. 349-360.
16. *The Internal Administration of Ozone in the Treatment of Phthisis*, Lancet II., 19 (1892), s. 1180-1181.
17. Stoker G., *Ozone in chronic middle ear deafness*. Lancet II., (1902), s. 1187-1188.
18. <http://goodhealthnaturally.com/products/Ozonated-Olive-Oil> (pobrano dn. 30.03.2017 r.)
19. http://www.oxygenhealingtherapies.com/ozone_oxygen_therapies.html (pobrano dn. 30.03.2017 r.)
20. <http://ozolifecosmetics.com/nutricion/> (pobrano dn. 30.03.2017 r.)
21. Makles Z., Galwas-Zakrzewska M. *Ozon – bezpieczeństwo ludzi i środowiska*. Bezpieczeństwo Pracy., 6 (2004), 25-28.
22. Kunz A., Freire R.S., Rowedler J.J.R., Mansilla H., Rodriguez J., Duran N. *Assembly and optimization of a system for ozone utilization in laboratory scale*. Química Nova., 22 (1999), s. 425.
23. Iwanek P. *Biologiczne podstawy działania ozonu na florę jamy ustnej*. Annales Academiae Medicae Stetinensis., 53 (2007), s. 41-44.

24. Szaflik J. *Ozon – wróg czy przyjaciel?* Biuletyn Informacyjny Stowarzyszenia Retina AMD Polska., 1 (2001).
25. <https://sojp.wios.warszawa.pl/?page=03> (pobrano dn. 30.03.2017 r.)
26. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 24 sierpnia 2012 r. w sprawie poziomów niektórych substancji w powietrzu (Dz.U. z 2012, poz. 1031)
27. Bocci V.A. *Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma.* Toxicology and Applied Pharmacology., 216 (2006), s. 493-504.
28. Ikonomidis S., Tsaousis P., Fyntasis A., Iliakis E.M. *New data regarding the use of ozone therapy in the former Soviet Union Countries.* Rivista Italian di Ossigeno-Ozonoterapia. 4 (2005), s. 40-43.
29. Skalska K., Ledakowicz S. *Rozwój dezynfekcji chemicznej – perspektywy wykorzystania ozonu.* Laboratorium., 10 (2007), s. 10-13.
30. Ignatowicz S. *Ozon, jego właściwości i możliwości zastosowania w zabiegach dezodoryzacji i dezynfekcji i nie tylko.* Polskie drobiarstwo., 20 (2013) s.32-35.
31. Mirabal J.M., Menéndez S.A.C., Ledea O.E.L., Gómez M.F.D., Rubi W.F.D., Garcia L.A.F., Lastre I.L.M. L. Patent No BR 0309246-1A, 2005.
32. Mahapatra A.K., Muthukumarappan K., Julson J.L. *Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition., 45 (2005), s. 447-461.
33. Muszańska R. *Zastosowanie technologii ozonowania w przemyśle spożywczym i napojowym.* Agro Przemysł., 3 (2007), s. 27-29.
34. Bocci V.A. *Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine?* Journal of Biomedical Science., 56 (1999), s.270-275.
35. Huth K.C., Quirling M., Maier S., Kamereck K., Alkhayer M., Paschos E. *Effectiveness of ozone against endontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model.* International Endodontic Journal., 42 (2009), s. 3-13.
36. Giunta R., Coppola A., Luongo C., Sammartino A., Guastafierro S., Grassia G., Giunta L., Mascolo L., Tirelli A., Coppola L. *Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease.* Annals of Hematology., 80 (2001), s. 745-748.
37. Kim H.S., Noh S.U., Han Y.W., Kim K.M., Kang H., Kim H.O., Park Y.M. *Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing.* Journal of Korean Medical Science., 24 (2009), s. 368-374.
38. Shah P., Shyam A.K., Shah S. *Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia.* Indian Journal of Orthopaedics., 45 (2011), s. 376-379.
39. Wainstein J., Feldbrin Z., Boaz M., Harman-Boehm I. *Efficiency of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers.* Diabetes technology & therapeutics., 13 (2011), s. 1255-1260.
40. Gracer R.I., Bocci V. *Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process?* Medical Hypotheses., 65 (2005), s. 752-759.
41. Sánchez G.M., Re L., Perez-Davison G., Delaporte R.H. *Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización.* Revista Espanola de Ozonoterapia., 2 (2012), s. 121-139.
42. Cataldo F., Gentilini L. *Chemical kinetics measurements on the reaction between blood and ozone.* International Journal of Biological Macromolecules., 36 (2005), s. 61-65.
43. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. *The dual action of ozone on the skin.* British Journal of Dermatology., 153 (2005), s. 1096-1100.

44. Firestone D. *Physical and chemical characteristics of oils*. Fats and Waxes, 2th. AOCS, 2006.
45. Tellez G.M., Lozano L.O., Gomes M.F.D. *Measurement of peroxidic species in ozonized sunflower oil*. Ozone Science & Engineering., 28 (2006), s. 181-185.
46. Díaz, M.F., Gavín J.A., Gómez M., Curtielles V., Hernández F. *Study of ozonated sunflower oil using ¹H NMR and microbiological analysis*. Ozone Science & Engineering., 28 (2006), s. 59-63.
47. Zanardi I., Travagli V., Gabbrielli A., Chiasserine L., Bocci, V. *Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives*. Lipids., 43 (2008), s. 877-886.
48. Scrimgeour C. *Chemistry of fatty acids*. In: *Bailey's industrial oil and fat products*. 6 ed. vol 1. John Wiley & Sons, Inc. 2005.
49. Criegee, R. *Mechanism of ozonolysis*. Angewandte Chemie International Edition., 14 (1975), s. 745-752.
50. Díaz M.F., Hernández R., Martínez, G., Vital G., Gómez M., Fernández H., Garcés, R. *Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil*. The Journal of the Brazilian Chemical Society., 17 (2006), s. 403-407.
51. Bailey, P. S. *Ozonation in organic chemistry*. Vol. 1, Olefinic Compounds. New York: Academic Press, 1978, p220.
52. Díaz, M.F., Sazortoni J.A.G., Ledea O., Hernandez F., Alaiz M., Garces R. *Spectroscopic characterization of ozonated sunflower oil*. Ozone Science & Engineering., 27 (2005), s. 247-253.
53. Segá A., Zanardi I., Chiasserini L., Gabbrielli A., Bocci V., Travagli V. *Properties of sesame oil by detailed ¹H and ¹³C NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value, peroxide value, and viscosity measurements*. Chem Phys Lipids. 163 (2010), s. 148-56.
54. Díaz M. F., Núñez, N., Quincose, D., Díaz, W.; Hernández, F. *Study of Three Systems of Ozonized Coconut Oil*. Ozone Science & Engineering., 27 (2005), s. 153-157.
55. Soriano Jr. N.U.; Migo V.P.; Matsumura M. *Ozonation of sunflower oil: Spectroscopic monitoring of the degree of unsaturation*. Journal of the American Oil Chemists' Society., 80 (2003), s. 997-1001.
56. Soriano Jr. N.U., Migo V.P., Matsumura M. *Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR*. Chemistry and Physics of Lipids., 126 (2003), s. 133-140.
57. Richaud E., Farcas F., Fayolle B., Andouin L. *Hydroperoxide titration by DSC in thermally oxidized polypropylene*. Polymer testing., 25 (2006), s. 829-838.
58. Sadowska J., Johansson B., Johannessen E., Friman R., Braniarz-Press L., Kosenholm J.B. *Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods*. Chemistry and Physics of Lipids., 151 (2008), s. 85-91.
59. European pharmacopoeia. Acid Value. Council of Europe, 5th edn. Strasbourg Cedex, France, pp 127.
60. European pharmacopoeia. Iodine Value. Council of Europe, 5th edn. Strasbourg Cedex, France, pp 127-128.
61. European pharmacopoeia. Peroxide Value. Council of Europe, 5th edn. Strasbourg Cedex, France, pp 128-129.
62. Mirabal, J. M.; Menéndez, S. A. C.; Ledea, O. E. L.; Gómez, M. F. D.; Rubi, W. F. D.; Garcia, L. A. F.; Lastre, I. L. M. L. Patent No BR 0309246-1A, 2005.
63. Kranc R., Farbiszewski R. *Kosmetologia Podstawy naukowe*. MedPharm Polska, 2016.

64. Adamski Z., Kaszuba A. *Dermatologia dla kosmetologów*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 2012.
65. Robinson J.R., Lee V.H. *Transdermal therapeutic systems*. 2nd ed. 29, 1987.
66. Patel H.R., Patel R.B., Patel G.N., Patel M.M. *The influence and compatibility of vegetable oils and other additives on release of ketoprofen from transdermal films*. East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences., 13 (2010), s. 19-24.
67. Noszczyk M. *Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska*. Państwowe Zakłady Wydawnictw Lekarskich, 2013.
68. Guzel-Seydim Z.B., Greene A.K. Seydim A.C. *Use of ozone in the food industry*. Food Science and Technology., 37 (2004), s. 453-460.
69. Skalska K., Ledakwicz S., Perkowski J., Sencio B. *Germicidal properties of ozonated sunflower oil*. Ozone: Science & Engineering., 31 (2009), s. 232-237.
70. Pascoal A., Llorca I., Canut A. *Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities*. Trends in Food Science & Technology., 18 (2007), s. S29-S35.
71. Boland-Nazar N.S., Eslamirad Z., Sarmadian H., Ghasemikhah R. *An in vitro Evaluation of ozonized organic extra-vergin olive oil on Giardia Lambia Cysts*. Jundishapur of Microbiology., doi:10.5812/jjm.40839. 9 (2016), s. 1-5.
72. Rajabi O., Sazgarnia A., Abbasi F., Layegh P. *The activity of ozonated olive oil against Leishmania major promastigotes*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences., 18 (2015), s. 915-919.
73. Ramirez-Hobak L., Moreno-Coutino G., Arenas-Guzman R., Gorzelewski A., Fernandez-Martinez R. *Treatment of interdigital foot Erythrasma with ozonated olive oil*. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social., 54 (2016), s. 458-468.
74. Tara F., Zand-Kargar Z., Rajabi O., Berenji F., Akhlaghi F., Shakeri M.T., Azizi H. *The effects of ozonated olive oil and clotrimazole cream for treatment of vulvovaginal candidiasis*. Alternative Therapies, Health and Medicine., 22 (2016), s. 44-49.
75. Sechi L.A., Lezcano I., Nunez N., Espim M., Duprè I., Pinna A., Moliccotti P., Fadda G., Zanetti S.: *Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone)*. J. Appl. Microbiol. 90 (2001), s. 279–284.
76. Moureu S., Violleau F., Ali Haimound-Lekhal D., Calmon A. *Ozonation of sunflower oils: impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils*. Chemistry and Physics of Lipids., 186 (2015), s. 79-85.
77. DeVillez R. L. Patent No US 4451480 A, 1984.
78. DeVillez R. L. Patent No US 4591602 A, 1986.
79. Twombly A. H. Patent No US 984722 A, 1911.
80. Molareda M.A.G., Dall'Aglio R., Melegari P. Patent No WO 0137829 A1, 2001.
81. Knox W.J. Patent No US 1210949 A, 1917.
82. Mirabal J. M.; Cepero, S. A. M.; Menéndez, L. E.; Rubi, W. F. D.; Garcia, L. A. F.; Regueiferos, M. C. G. Patent No CU 22749 A1, 2002.
83. Mirabal J.M., Cespero S.A.M., Rubi V.F.D., Garcia L.A.F., Lozano O.E.L., Gomes M.F.D., Lastre I.D.L. Patent No WO 03/085072 A1.
84. Patel P.V., Kumar V., Kumar S., Gd V., Patel A. *Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study*. Journal of investigative and clinical dentistry., 2 (2011), s. 248-258.

85. Kumar T., Arora N., Puri G., Aravinda K., Dixit A., Jatti D. *Efficiency of ozonized olive oil in the management of oral lesions and conditions: A clinical trial*. Contemporary Clinical Dentistry., 7 (2016), s. 51-54.
86. Dharmavarani A.T., Reddy R.S., Nallakunta R. "Ozone"- the new NEMESIS of canker sore. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*., 9 (2015), s. 1-4.
87. Solovastru L.G., Stincanu A., De Ascentii A., Cappare G., Mattana P., Vaja D. *Randomized, controlled study of innovative spray formulation containing ozonated oil and α -bisabolol in the topical treatment of chronic venous leg ulcers*. Advances in Skin & Wound Care., 28 (2015), s. 406-409.
88. Lescano I., Nuñez N., Espino M., Gomez M. *Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil, Oleozón, Against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*. Ozone Science & Engineering., 22 (2000), s. 207-214.
89. <http://ozolifecosmetics.com/nutricion> (pobrano dn. 30.03.2017 r.)
90. <http://ozonella.pl/> (pobrano dn. 30.03.2017r.)
91. Bocci V. *Oxygen ozone therapy: A critical evaluation*. Kluwer Academia Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2002.

Zastosowanie ozonowanych olejów roślinnych w profilaktyce i terapii

Streszczenie

Wykorzystanie ozonowanych olejów roślinnych stanowi interesujące podejście farmaceutyczne do leczenia różnych schorzeń. Ze względu na działanie wirusobójcze, bakterioobójcze i grzybobójcze, ozon jest stosowany w ozonoterapii w wielu dziedzinach medycznych, takich jak dermatologia, laryngologia, okulistyka, ginekologia, chirurgia i stomatologia. Ozon jest również stosowany do dezynfekcji wody i powietrza oraz w przemyśle spożywczym w płynach myjąco-dezynfekujących surowce spożywcze. Ozon jest toksyczny dla ludzi tylko wtedy gdy jest wdychany. Może to powodować poważne problemy zdrowotne, jeśli stężenie we wdychanym powietrzu przekracza bezpieczny poziom. Ozon reaguje z podwójnymi wiązaniami węglowęgla nienasyconych kwasów tłuszczowych, tworząc ozonidy lub 1,2,4 pierścienie triksolane i nadtlenki jako najważniejsze produkty odpowiedzialne za aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz stymulację naprawy i regeneracji tkanek. Ozonowane oleje roślinne mogą występować w postaci handlowej ciekłej lub stałej przechowywane w temperaturze pokojowej i mieć stosunkowo długi termin ważności.

Słowa kluczowe: ozonowany olej; 1,2,4-trioksolany; Ozonidy; Ozonoterapia; Aktywność przeciwbakteryjna

Application of ozonated vegetable oils for prevention and therapy

Ozonated vegetable oils represent an interesting pharmaceutical approach to the management of a variety of pathologies. Due to virucidal, bactericidal and fungicidal activity, ozone is used in ozonotherapy in many medical fields such as dermatology, laryngology, ophthalmology, gynecology, surgery and dentistry. Ozone is also used for disinfection of water and air, and in food industry in washing and disinfecting liquids for raw food materials. Ozone is only toxic to human when inhaled. It can cause serious health problems if its concentration in inhaled air exceeds safe level. Ozone reacts with carbon-carbon double bonds of unsaturated fatty acids, forming ozonides or 1,2,4 trioxolane rings and peroxides as the most important products, responsible for the antimicrobial activity and stimulating tissue repair and regeneration properties. The ozonated vegetable oils occur as liquids or semisolids at room temperature and have relatively long stability periods.

Keywords: ozonized oil; 1,2,4-trioxolanes; ozonides; ozonotherapy; antimicrobial activity

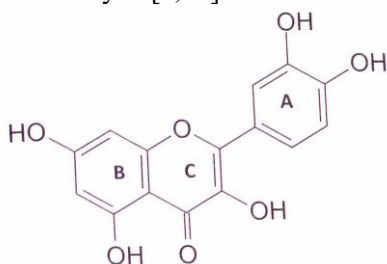
Kwercetyna jako cenny dla zdrowia fitoskładnik

1. Wstęp

Flawonoidy to jedna z najliczniejszych grup związków polifenolowych. Ze względu na molekularną budowę podzielono je na flawonole, flawony, flawanony, flawanonole, izoflawony, katechiny i antycyjanidyny [1, 2]. Flawonolem powszechnie występującym w diecie jest kwercetyna (3,5,7,3',4' pentahydroksyflawon). Jej obecność potwierdzono w wielu produktach spożywczych pochodzenia roślinnego. Spotkamy ją w używanych na co dzień warzywach i owocach, tj. cebula, kapusta, brokuły, soja, ciemne winogrona, truskawki, jabłka, jagody bzu czarnego czy świeża żurawina [2]. W naszym organizmie podlega ona szybkiemu metabolizmowi i równie szybko jest usuwana, zatem jej biodostępność będzie zależała od naszej diety – rodzaju i ilości produktów które spożywamy.

2. Charakterystyka ogólna

Pod względem chemicznym kwercetyna jest związkiem który w swojej budowie zawiera 15 atomów węgla tworzących dwa pierścienie benzenu i jeden pierścień pironu (Ryc. 1). Dotychczas w przyrodzie zidentyfikowano ponad 140 jego form, natomiast najczęściej występuje jako O-glikozyd bądź wolny aglikon. Ma płaską strukturę cząsteczki, która może ułatwiać wnikanie w głąb dwuwarstwy lipidowej [10]. Kwercetyna jest aromatycznym związkiem hydrofobowym, którego rozpuszczalność w wodzie zwiększa się wraz z dołączaniem kolejnych reszt cukrowych. Aktywność ta jest odwrotnie proporcjonalna do właściwości antyoksydacyjnych, które maleją w obecności podstawników cukrowych [1,17].



Ryc.1 Wzór strukturalny kwercetyny (3,5,7,3',4' pentahydroksyflawon).

¹ kasia6.k@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

² Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Zaleca się spożywanie kwercetyny w ilości 25 mg dziennie [2,4]. Jeśli stosujemy dietę pochodzenia roślinnego to najczęściej występującą postacią tego związku którą spotkamy w produktach, będą pochodne glikozydowe. Niestety ze względu na dużą masę cząsteczkową nie będą one w tej formie wchłaniane w jelicie cienkim. W świetle jelita cienkiego, dzięki obecnej hydrolazie floryzynowej (LPH, ang. *lactose-phlorisin hydrolase*, EC.3,2,1,23), odbywa się pierwszy etap metabolizmu kwercetyny a jest nim deglikozylacja. Tak powstałe w procesie dyfuzji biernej aglikony są wchłaniane przez ścianę jelita. Odłączanie grup cukrowych może zachodzić także w enterocytach, gdzie glukozydy wnikają do komórek w wyniku transportu aktywnego, przy udziale SGLT-1 (ang. *sodium dependent glucose transporter*) – Na⁺ zależnego przenośnika glukozy. Po usunięciu reszty cukrowej przez β-glukozydazę cytosolową, kwercetyna w postaci aglikonu zostaje wchłonięta w jelicie cienkim, jelicie grubym, następnie wraz z krwią dostaje się do wątroby, gdzie jest metabolizowana. Glukozydy, które nie uległy wchłonięciu są usuwane z enterocytów do światła jelita przez białka oporności wielolekowej (MRP2, ang. *multidrug resistance transporter*). Pozostałe metabolity ulegają metylacji poprzez O-metylotransferazę katecholową, glukuronidacji przy udziale UDP-glukuronylotransferazy (EC 2.4.7.17) lub siarczanowaniu. Nowopowstałe formy, wykrywane w moczu i surowicy to: 3'-O-metyloQ, 4'-O-metylo Q, 3-, 3', 4'- i 7-O-β-D-glukuronid Q oraz 3'-O-siarczan kwercetyny, które są następnie transportowane żyłą wrotną do wątroby, gdzie ulegają dalszej degradacji [5, 18].

Stężenie powstałych związków w surowicy jest zależne od ilości kwercetyny w pożywieniu i czasu jej przyjmowania. Spożywanie tego flawonoidu przez 28 dni w dawkach większych niż 1 g na dobę podwyższa poziom metabolitów do 5 μM [1,2, 19]. W organizmie kwercetyna jest traktowana jako ksenobiotyk, dlatego zostaje szybko metabolizowana i usunięta. Stąd, w celu osiągnięcia terapeutycznego stężenia kwercetyny we krwi obwodowej należy systematycznie włączyć w dietę potrawy bogate w ten składnik [5,19]. Jednakże, spożywanie dużych ilości kwercetyny ma pewne ograniczenia. Wraz z podawaniem wysokich dawek może wzrastać stężenie kwasu homowanilinowego – HVA (ang. Homovanilic Acid) we krwi. Jest on określany jako jeden z markerów nowotworu neuroblastomy, który według danych statystycznych stanowi ponad 7% wszystkich typów nowotworów wieku dziecięcego. Rosnące stężenie HVA jako produktu rozpadu kwercetyny, może więc dawać wynik fałszywie dodatni i utrudniać szybką diagnostykę tego schorzenia [6].

3. Przeciwnowotworowa aktywność kwercetyny

Biorąc pod uwagę silne właściwości antyoksydacyjne, kwercetyna jest istotnym związkiem zapobiegającym kancerogenezie. Bierze udział w zmiataniu wolnych rodników tlenowych – reaktywnych pochodnych tlenu, azotu i chloru [2, 17, 18]. Związek ten czynnie uczestniczy w zahamowaniu proliferacji komórek i indukcji apoptozy linii nowotworowych, m.in. prostaty, piersi, jajnika, szyjki macicy, wątroby, jamy ustnej czy układu nerwowego, czego potwierdzeniem są liczne doniesienia.

Badania kliniczne wykazały, że kwercetyna wyraźnie wpływa na proces nowotworzenia czym doprowadza do obniżenia stężenia markerów nowotworowych u pacjentów. Trzytygodniowa terapia kwercetyną w ilości 60 mg/m² u pacjentów w zaawansowanym stadium raka wątroby, przyczyniała się do tego, że stężenie zarówno fosfatazy alkalicznej (ang. alkaline phosphatase, ALP, EC. 3.1.3.1), jak i α -fetoproteiny w surowicy krwi uległo obniżeniu. Kolejnym przykładem korzyści płynących z zażywania kwercetyny jest opis przypadku pacjentki z IV stopniem raka jajnika, u której dwa cykle trzytygodniowego stosowania kwercetyny w dawce 420 mg/m² spowodowały obniżenie poziomu markera CA125 z 290 do 55 jednostek [13]. Kwercetyna w dawce 50 μ M może obniżyć ilość uszkodzeń DNA spowodowanych stresem oksydacyjnym nawet o 35-40%. Przeciwnowotworowe działanie tego flawonoidu zależy w dużej mierze od jego stężenia. W linii raka płuc A549, kwercetyna w stężeniu 1-20 μ M pobudza proliferację komórek, natomiast w stężeniu 50-200 μ M wykazuje aktywność cytotoksyczną [1, 14].

Kwercetyna wpływa na zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G1 oraz G2/M, co stanowi główny mechanizm w jej przeciwnowotworowej aktywności w komórkach białaczkowych i nowotworach żołądka. Podziały komórkowe podlegają kontroli przez czynniki wzrostu sprzężone z receptorami transbłonowymi. Kompleksy te regulują cykl komórkowy, wzrost komórek, ich gospodarkę energetyczną i śmierć. Zaburzenia na którymkolwiek z tych procesów może spowodować transformację komórki prawidłowej do komórki nowotworowej. Kwercetyna poprzez wpływ na białka regulatorowe, tj.: cykliny, kinazy cyklinozależne oraz ich inhibitory, ma istotny wpływ na regulowanie proliferacji komórek. Jest także zdolna do aktywacji Chk2 (ang. *Checkpoint homolog kinase 2*) – supresora transformacji nowotworowej, który przyczynia się do blokowania cyklu komórkowego. Jednocześnie następuje akumulacja białka p21, a rezultatem tego procesu jest obniżenie fosforylacji białka Rb (ang. *Retinoblastoma*) [1]. Zatrzymanie podziałów komórkowych na poziomie G1 i G2/M w komórkach powoduje również podwyższenie stężenia białka p53, które reguluje cykl komórkowy i kieruje komórkę zarówno na drogę naprawy DNA, jak i na drogę zaprogramowanej śmierci. Przez zwiększenie stężenia białka p53, kwercetyna wpływa na uruchomienie apoptozy mitochondrialnej, ponieważ obniża potencjał transbłonowy ($\Delta\Psi_m$) z towarzyszącym spadkiem syntezy ATP, zmianą ilości związków tiolowych oraz wzrostem stężenia jonów wapnia w mitochondrialnym matriks [5].

Z innych właściwości kwercetyny należy wspomnieć o regulacji ekspresji białek z rodziny Bcl2. I tak, jak wykazano w badaniach na komórkach raka płuc A549 oraz na linii komórkowej HeLa powoduje podwyższenie stężenia genów kodujących proapoptotyczne białka Bax i Bad oraz antyapoptotycznego białka Bcl-x, z jednoczesnym obniżeniem poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2 i Mcl-1. Pierwotnie gen Bcl-2 został zidentyfikowany jako protoonkogen w komórkach grudkowych chłoniaków wywodzących się z komórek linii B [1].

Proapoptotyczna aktywność kwercetyny wynika także z jej wpływu na hamowanie ekspresji białek szoku cieplnego Hsp (ang. *Heat shock proteins*), głównie Hsp 72 i 27, chroniących komórkę przed apoptozą i zwiększających inwazyjność nowotworu.

Rezultatem obniżenia poziomu tych białek jest zatem zwiększona wrażliwość komórek nowotworowych, co z kolei wzmacnia ich podatność na leki. Stąd suplementacja kwercetyny może stanowić potencjalny lek przeciwnowotworowy [15].

Kwercetyna wykazuje synergistyczne działanie z innymi lekami m.in. Wybranymi antybiotykami z grupy antracykli (ANT, ang. anthracyclines), niesteroidowymi lekami z grupy selektywnych modulatorów receptora estrogenowego czy nieorganicznymi związkami platyny. Substancje te w połączeniu wykazywały wzmożone działanie przeciwnowotworowe. Potwierdzono, że w komórkach raka trzustki, opornych na daunorubicynę z grupy antracyklin, pod wpływem flawonoidu zostaje zahamowana ekspresja glikoproteiny P, w ten sposób eliminując oporność wielolekową [6]. Podobne rezultaty otrzymano, włączając w leczenie raka piersi kwercetynę połączoną z doksorubicyną [4]. Kolejnym jest stosowany często w schematach chemioterapii skojarzonej antybiotyk doksorubicyna i niesteroidowy lek tamoksifenem, a połączenie z nimi przynosi pozytywne rezultaty w hamowaniu proliferacji komórek raka piersi i ograniczeniu angiogenezy nowotworu [1]. Ponadto znane jest także jej współdziałanie z nieorganicznym związkiem platyny, tzw. cis-platyną, lekiem stosowanym w leczeniu m.in. raka szyjki macicy. Wykorzystanie takiego połączenia znacznie skuteczniej wpływa na indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych poprzez hamowanie aktywności kinazy Akt, poziomu Bcl-2, Bcl-x i wspomnianych już białek szoku termicznego. Atutem tego połączenia jest także ochronna rola kwercetyny przed cytotoksycznym działaniem cis-platyny na prawidłowe komórki kanalików nerkowych [7].

Opisane zostało także przeciwnowotworowe działanie kompleksu kwercetyny z miedzią (II). Polega ono na indukcji oksydacyjnych uszkodzeń DNA, poprzez generowanie wolnych rodników. Podczas badań cytotoksyczności tego związku na liniach komórkowych raka płuc A549 udowodniono, że indukuje apoptozę i obniża poziom inhibitorów apoptozy – surwiwiny w komórkach tego nowotworu [3].

Warto podkreślić, że już sama regulacja kwercetyny codzienną dietą potrafi znacząco wpłynąć na stan zdrowia i ograniczyć proces nowotworzeni, zmniejszając ryzyko raka okrężnicy, raka żołądka i raka płuc [9].

4. Przeciwmiażdżycowa aktywność kwercetyny

Miażdżycą to przewlekła choroba tętnic, w ścianach których odkładają się lipidy, powodując uszkodzenie śródbłonna naczyń, przez powstającą na skutek wolnych rodników blaszkę miażdżycową. W konsekwencji prowadzi to do zahamowania przepływu krwi i zwiększenia wykrzepiania. Aby regulować ten proces warto zwrócić uwagę na spożywane produkty. Zarówno owoce, jak i warzywa, są cennym źródłem związków polifenolowych, często określanych jako fitaminy, bądź fenolowe antyoksydanty. Ich działanie ochronne na układ krążenia, polega w znacznej mierze na: hamowaniu utleniania lipoprotein LDL, obniżaniu ciśnienia krwi, zmniejszaniu jej krzepliwości oraz działaniu przeciwzapalnym [17, 20]. Przykładem związku polifenolowego, obniżającego poziom cholesterolu i triacylogliceroli we krwi jest wspomniana już kwercetyna. Takie zjawisko występuje przy jej 0,5% zawartości w diecie [2]. Hipolipemiczny efekt kwercetyny potwierdza zastosowanie w kompleksie z rutyną

i kwasem ferulowym, gdzie przyczynia się do znacznego obniżenia poziomu cholesterolu, triglicerydów oraz fosfolipidów w surowicy krwi. Istotne znaczenie w profilaktyce miażdżycy ma także łączenie się polifenolowych związków do białkowych struktur za pomocą wiązań krzyżowych, co powoduje uszczelnienie kolagenowych struktur. Wyciągi z winogron z wysoką zawartością związków polifenolowych, poprawiają przepływ krwi w naczyniach dzięki zmniejszeniu ich przepuszczalności, zwiększeniu napięcia i ochronnemu działaniu na ściany naczyń, zarówno krwionośnych, jak i limfatycznych. Kwercetyna również zmniejsza skutki miażdżycy, łagodząc stany zapalne i indukując hemową oksigenazę [17, 20, 21].

5. Wykorzystanie kwercetyny w leczeniu choroby Alzheimerera

Choroba Alzheimerera (AD, ang. *Alzheimer's disease*) nazywana chorobą otępienia, z roku na rok dotyka coraz większej liczby ludzi już powyżej 65 roku życia. Jest to najczęstsza, nieuleczalna taka jednostka chorobowa. Zatem leczenie w przypadku tej choroby jest objawowe, gdyż nie ma obecnie skutecznego leku hamującego jej rozwój, przejawiający się w zmianach takich jak powstawanie płytek starczych ze złogów β -amyloidu czy splątków neurofibrylarnych [22,23]. Liczne badania wykazały skuteczność zastosowania w terapii fitoskładników, wśród których ważne miejsce zajmuje kwercetyna. Ta zawarta m. in. w soku jabłkowym, który jest łatwo dostępnym produktem, wykazuje ochronne działanie wobec toksyczności β -amyloidu, działając poprzez modulowanie stresu oksydacyjnego. Także wodne ekstrakty z warzyw bogatych w kwercetynę jak np. brokułu wykazują aktywność antybutyrylocholinesterazową [7,16].

6. Wykorzystanie kwercetyny w innych jednostkach chorobowych

Uwzględniając szeroko podkreślane właściwości przeciwalergiczne, przeciwwzapalne i przeciwwirusowe polifenoli, codzienne ich spożywanie – zwłaszcza kwercetyny, nabiera znaczenia w kontekście profilaktyki wielu innych chorób, szczególnie tych cywilizacyjnych. Zapadalność na różnego rodzaju nadwrażliwości wymusza poszukiwania alternatywnych metod leczenia, np. przez ogólnodostępne w diecie substancje. Kwercetyna spowalnia wydzielanie histaminy, tzw. związku wstrząsrodnej reakcji alergicznej i zapalnej. Przeciwwzapalna zdolność polega również na hamowaniu aktywności cyklooksygenaz (COX) głównie COX-2, dzięki czemu dochodzi do zahamowania syntezy m.in. prostaglandyny 2 (PGE2), leukotrienu B4 i tromboksanu A2, co hamuje napływ leukocytów, reguluje napięcie naczyń włosowatych i zmniejsza odczyn zapalny [12].

Flawonoid obniża także ciśnienie krwi o czym wcześniej wspomniano (rozdział 4) zatem wpływa na regulację powszechnego w społeczeństwie nadciśnienia, a w konsekwencji ograniczenie rozwoju choroby wieńcowej. Co więcej, zmniejsza ryzyko wystąpienia cukrzycy typu II i przeciwdziała tworzeniu się zaćmy. Ponadto okazała się pomocna w leczeniu choroby neuropsychiatrycznej – schizofrenii, w szczególności ze względu na udział w hamowaniu peroksydacji lipidów osocza wywołaną zyprazydonem – lekiem przeciwpsychotycznym. Kwercetyna pełni tu rolę skutecznego antyoksydantu, zwłaszcza, że tylko w niewielkim stopniu ulega metabolizowaniu

i mimo, że nie wpływa znacząco na stężenie zyprazydonu w osoczu, to zahamowuje średnio o 38% peroksydację lipidów wywołaną przez ten lek [9].

Większość chorób wirusowych rozprzestrzenia się bardzo szybko w populacji. Jedną z nabierających na znaczeniu dróg szerzenia się infekcji są kontakty seksualne, a w nich rozprzestrzeniania się wirusa HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*). Do tej pory naukowcom nie udało się znaleźć skutecznego leczenia, które w pełni usunęłoby Retrowirusa z organizmu. Wynika to z jego zmienności i ukrywania się w różnych przestrzeniach ciała. Dostępne terapie jedynie ograniczają jego namnażanie, co znacząco wpływa na jakość i długość życia zakażonych. Jak się okazuje pacjenci prawdopodobnie mogą sami wspomagać walkę z wirusem, np. przez dietę bogatą w kwercetynę, potwierdzono bowiem, przeciwwirusową jej aktywność. Polega ona na hamowaniu integrazy wirusa HIV, zdolności wiązania się z białkami płaszcza wirusowego, polimerazami powodując ich dezaktywację. Hamuje też aktywność innych wirusów, np. wirusa opryszczki (HSV), wścieklizny, grypy czy polio [11].

7. Podsumowanie

Kwercetyna dzięki swoim bogatym właściwościom, jest szeroko rozpowszechnionym fitoskładnikiem codziennej diety oraz ma ugruntowaną pozycję na polskim rynku farmaceutycznym. Pomimo dostępnych danych literaturowych nad działaniem kwercetyny nie wyjaśniono wszystkich jej właściwości. Na modelach *in vitro* stale prowadzone są doświadczenia oceniające działanie kwercetyny na właściwości antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, zmian w konformacji białek strukturalnych i funkcjonalnych w komórkach i tkankach. Działanie kwercetyny na ludzi stanowi materiał analiz klinicznych dążących do opracowania skutecznych terapii przeciwnowotworowych, przeciwmiażdżycowych, przeciwcukrzycowych i schorzeń neurodegeneracyjnych. Badany jest także wpływ kwercetyny, zawartej w naturalnych składnikach oraz w suplementach diety, na poprawę jakości życia u ludzi zdrowych. Udowodniono, że spożywanie świeżych produktów pochodzenia roślinnego jest niezwykle cenne i związane z utrzymaniem dobrej kondycji psycho-fizycznej. Składniki fitoaktywne, jak kwercetyna, przyczyniają się do poprawy jakości życia osób zdrowych oraz cierpiących na schorzenia cywilizacyjne, co podkreślają źródła literaturowe. Dodatkowo rozpowszechnienie naukowych źródeł informacji przyczynia się do przekazywania informacji o działaniu fitoskładników i promowania tzw. „zdrowego trybu życia”, gdzie podstawową jest zbilansowana, bogata w warzywa i owoce dieta oraz aktywność fizyczna.

Literatura

1. Jakubowicz – Gil J., *Kwercetyna w terapii przeciwnowotworowej*, Postępy Biologii Komórki, 2 (2012), s. 199-216.
2. Anand David A.V., Arulmoli R., Parasuran S., *Overviews of Biological Importance of Quercetin, A Bioactive Flavonoid*. Pharmacognosy Reviews., 10 (2016), s. 84-89.
3. Hejcham E., Tomczyk M., *Związki kompleksowe miedzi (II) jako potencjalne leki przeciwnowotworowe*, Farmacja polska 12 (2015), s. 750-757.
4. Kobylińska A., Janas K., *Prozdrowotna rola kwercetyny obecnej w diecie człowieka*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 69 (2015), s. 51-62.

5. Goldberg A.D., Allis C.D., Bernstein E., *Epigenetics: a landscape takes shape*. *Cell*, 128 (2007), s. 635-638.
6. Lamson D., Brignall M., *Antioxidants and cancer III: quercetin*, *Alternative medicine review*. 5(2000), s. 196-208.
7. Pypno D., Zdrojewicz Z., *Potencjalne wykorzystanie substancji pochodzenia roślinnego w leczeniu choroby Alzheimer*, *Pediatrics i Medycyna Rodzinna* 11 (2015), s. 289-294.
8. <https://breastcancerconqueror.com/quercetin-superstar-cancer-busters/>
9. Kopka J., Dietrich-Muszalska A., *Wpływ kwercetyny na peroksydację lipidów indukowaną przez zyprazydon w ludzkim osoczu – badania in vitro*, *Psychiatria i Psychologia Kliniczna*, 14 (2014), s. 10-19.
10. Sierzant K., Pyrkosz-Biardzka K., Gabrielska J., *Właściwości przeciwutleniające naturalnych ekstraktów polifenolowych z wybranych roślin w układach modelowych*, *Zywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 6(2012), s. 41-53.
11. Dolinoy D.C., Huang D., Jirtle R.L., *Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2007), s. 13056-13061.
12. Majewska M., Czeczot H., *Flawonoidy w profilaktyce i terapii*, *Terapia i leki*, 5(2009), s. 369-377.
13. Lamson D., Brignall M. *Antioxidants and cancer III: quercetin*. *Altern Med Rev*, 5(2000), s. 196-208.
14. Robaszkiewicz A., Balcerczyk A., Bartosz G., *Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells*, *Cell Biol Inter*, 31(2007), s. 1245-1250.
15. Jakubowicz - Gil J., Rzeski W., Zdzińska B., Piersiak T., Weiksza K., Głowniak K., Gawron A., *Different sensitivity of neurons and neuroblastoma cells to quercetin treatment*, *Acta Neurobiologiae Experimentalis* , 68(2008), s.463-476.
16. Ansari M., Abdul H., Joshi G. et al., *Protective effect of quercetin In primary neurons against Aβ (1-42): relevance to Alzheimer's disease*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(2009), s. 269-275.
17. Rouanet JM, Decorde K, Rio D et al., *Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters*, *Food Chemistry*, 1(2009),s. 1-6.
18. Meyers KJ, Rudolf JL, Mitchell AE, *Influence of Dietary Quercetin on Glutathione Redox Status in Mice*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008), s. 830-836.
19. Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM et al., *Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 138(2008), s. 562-566.
20. Juźwiak S, Wójcicki J, Mokrzycki K et al., *Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits*, *Pharmacological Report*, 57(2005), s. 604-609.
21. Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM et al., *Specific Dietary Polyphenols Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice by Alleviating Inflammation and Endothelial Dysfunction*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2010), s. 749-757.
22. Moreno L., Puerta E., Suarez-Santiago J., Santos-Maglaes N., Ramirez M., *Irache J., Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease*. *International Journal of Pharmaceutics*, 517(2017), s. 50-57.
23. Perez S., Rendeiro C., Wang L., Wu Q., Rubakhin S., Vazhappilly R., Baxter J., Sweedler J., Rhodes K., *A unique combination of micronutrients rejuvenates cognitive performance in aged mice*. *Behavioural Brain Research*, 320(2017), s. 97-112.

Kwercetyna jako cenny dla zdrowia fitoskładnik

Streszczenie

Fitoskładnikami nazywa się naturalne, aktywne biologicznie substancje chemiczne występujące w roślinach, które wykorzystują je w procesach własnego wzrostu i różnicowania. Mogą być także używane jako substancje chroniące komórki przed uszkodzeniami i chorobami. Jednym z nich jest, coraz częściej badany flawonoid – kwercetyna, której źródłem są owoce i warzywa, przede wszystkim jabłka, borówki, porzeczki, szpinak czy kapusta. To także składnik w popularnie stosowanych ziołach jak skrzyp, rumianek czy dziurawiec, a jego zawartość zależy od dojrzałości roślin, metody i warunków upraw. Mimo, iż jest to związek tak bogato występujący w naszej codziennej diecie, jego właściwości wciąż nie są do końca poznane. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień o przeciwrakowych właściwościach czerwonej cebuli, a to za sprawą obecnej w jej łupinach kwercetyny. Wykazano, że u ludzi wzbogacających swoją dietę w składniki zawierające kwercetynę, zmniejsza się ryzyko śmierci z powodu wielu różnych typów nowotworów. Działając na poziomie komórkowym i hamując proliferację komórek wydaje się być ona skutecznym lekiem w chorobach neurodegeneracyjnych. Ponadto mówi się o wspomaganiu przez nią funkcjonowania układu krwionośnego i przeciwdziałaniu rozwojowi miażdżycy, wyróżnia się jej właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne oraz jej wpływ na utrzymanie prawidłowej gospodarki cukrowej.

W pracy dokonano analizy aktualnego piśmiennictwa poświęconego właściwościom terapeutycznym kwercetyny i możliwości ich wykorzystania w terapii szeregu schorzeń, w tym tych uznanych za cywilizacyjne.

Słowa kluczowe: kwercetyna, polifenole, flawonoidy, choroby cywilizacyjne

Quercetin as a valuable phytonutrient for health

Abstract

Phytonutrients are natural, biologically active chemical substances found in plants that use them to growth and differentiation processes. They can also be used as a cell protector against damages and diseases. One of them is, more and more often studied, quercetin.

It can be found in fruits and vegetables, especially in apples, cranberries, currants, spinach or cabbage. Quercetin is also a component of well-known herbs such as horsetail, chamomile and St. John's wort. Its content depends on the maturity of the plants, culture methods and crops conditions. Although it is a basic compound of our daily diet, its properties are still not fully known. There have been many reports in recent years of the oncological properties of red onion, due to the presence of quercetin present in its shell. Research has shown that people who enrich their diets with quercetin-containing ingredients reduce the risk of death due to many types of cancers. Quercetin acts on the cellular level, inhibiting the proliferation of human cells, and therefore appears to be an effective drug in neurodegenerative diseases. Also, talk about support by the functionality of the blood system and counteract the development of atherosclerosis.

Quercetin has antioxidant and anti-inflammatory properties. It also affects the maintenance of normal sugar regulation, by lowering glucose level in the blood.

The aim of this work is the analysis of literature concerning properties and the therapeutic use of quercetin in therapy of series of diseases concerned as civilization ones.

Keywords: Quercetin, polyphenols, flavonoids, civilization diseases

Angelika Mastalerczyk¹, Marta Ciwińska², Natalia Dębowska³, Weronika Michalczuk⁴, Jacek Kurzepa⁵, Anna Boguszewska-Czubara⁶

Cure-cuma? Lecznicze działanie *Curcuma longa*

1. Wstęp

Kurkuma to pochodząca z Indii przyprawa, która od setek lat jest stosowana w medycynie naturalnej i kosmetycznej Dalekiego Wschodu. W medycynie ludowej podawano ją jako lek łagodzący bóle miesiączkowe, żołądkowe, a także wspomagający leczenie trudno gojących się ran i blizn. Składnikiem aktywnym *Curcuma longa* jest kurkumina – pomarańczowo-żółty barwnik powszechnie stosowany w gastronomii. Aktualnie są prowadzone liczne badania w kontekście jej właściwości przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych, przeciwwirusowych, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, radioochronnych, antymutagennych, przeciwgorączkowych i immunostymulujących. Naukowcy próbują również udowodnić jej pozytywne działanie jako medykamentu w chorobach układu krzepnięcia, kardiologicznych, neurologicznych i neurodegeneracyjnych, np. w chorobie Alzheimerera oraz nowotworowych, m. in. w raku jelita grubego, płuc i piersi [1-11]. Chroni wątrobę przed toksynami, obniża poziom cholesterolu i powstrzymuje replikację wirusa HIV. U chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) spożywanie aktywnego składnika *Curcuma longa* w postaci suplementu diety zmniejszało obrzęki stawów i wzmacniało elastyczność. National Center for Biotechnology Information podaje ponad 3000 publikacji naukowych, które pojawiły się w przeciągu ostatnich lat, udowadniających działanie farmakologiczne kurkumy na podstawie badań *in vitro* i *in vivo*. Obecnie prowadzonych jest około 200 badań klinicznych nad zastosowaniem kurkuminy w medycynie [1-10, 12-15].

1.1. Rośliny lecznicze

Rośliny są ogromnym królestwem, stale rozrastającym się o nowe gatunki. Wśród nich część to rośliny lecznicze. Związki chemiczne zawarte w roślinach o zastosowaniu medycznym zwracają uwagę badaczy ze względu na ich naturalne występowanie

¹ ngmastaler@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

² martaci1596@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

³ natalia.debowska66@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

⁴ misialczuk_96@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

⁵ jacek.kurzepa@umlub.pl, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

⁶ anna.boguszewska-czubara@umlub.pl, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

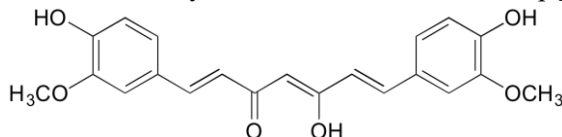
w przyrodzie (co wiąże się z mniejszą toksycznością dla środowiska w przypadku utylizacji) oraz mniejszą liczbą efektów ubocznych. W przeciągu ostatniej dekady zaobserwowano, że zawarte w roślinach związki chemiczne mogą mieć działanie przeciwnowotworowe. Naturalne produkty uzyskane z roślin działają jeszcze lepiej, gdy są podawane jako adiuwanty wraz z chemioterapeutykami. Jedną z takich roślin jest *Curcuma longa* [3, 8-9]

1.2. *Curcuma longa*

Curcuma longa to pełna prawidłowa łacińska nazwa gatunkowa rośliny, która w Polsce nazywana jest ostrzyżem długim, ostrzyżem Zohary, kurkumą długą, ostrzyżem indyjskim, szafranem indyjskim lub po prostu kurkumą. Jest to gatunek byliny z rodziny imbirowatych (jej kłaczce bardzo podobne jest do kłacza imbiru). Jej środowiskiem naturalnym są Indie oraz południowe Chiny – tam można spotkać dziko rosnącą kurkumę, ale jest uprawiana w wielu krajach o klimacie tropikalnym. [3, 7 -9].

2. Kurkumina

Curcuma longa zawiera cenny składnik – kurkuminę, która jest naturalnym związkiem polifenolowym (Rys. 1). Ten pomarańczowożółty fluoryzujący barwnik o charakterystycznym ostrym zapachu i gorzkim smaku można otrzymać także z kłaczy *Curcuma domestica*. Badania dowodzą, że kurkumina ma wiele działań prozdrowotnych i można ją stosować w profilaktyce wielu chorób wirusowych, bakteryjnych, a także nowotworowych. Ma także działanie żółciopędne [3, 8-10, 12].



Rysunek 1. Wzór strukturalny kurkuminy. Jest to forma występująca w około 60-70% ekstraktu z kurkumy. W swojej budowie zawiera dwie reszty feruloilowe połączone atomem węgla. Na rysunku przedstawiona jest forma enolowa kurkuminy. Jest to forma kurkuminy rozpuszczalnej w wodzie. Posiada grupę hydroksylową (-OH), występującą przy wiązaniu podwójnym węgiel-węgiel (HO-C=C).

2.1. Kurkumina w przemyśle

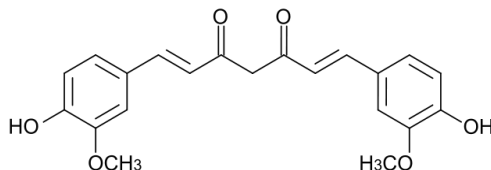
Produktem handlowym jest krystaliczna kurkumina, która jest rozpuszczalna w alkoholach, kwasie octowym, olejach, alkaliach; a także tzw. oleozywica, która zawiera ok. 40% kurkuminy. Barwnik ten stanowi częsty dodatek do przypraw, konserw, zup, musztardy ze względu na atrakcyjne cechy sensoryczne i stabilizujące – właściwości antyoksydacyjne kurkumy pozwalają na hamowanie peroksydacji lipidów [3-6, 10].

2.2. Charakterystyka kurkuminy

Kurkumina jest to związek organiczny o żółtym zabarwieniu i wzorze sumarycznym $C_{21}H_{20}O_6$, znany pod oznaczeniem E100 jako barwnik spożywczy. Masa molowa kurkuminy wynosi 368,39 g/mol [4 -6, 8 -10, 16]. Kurkumina jest diarylheptanoidem, należącym do kurkuminoidów. Kurkuminoidy stanowią grupę naturalnych fenoli, które

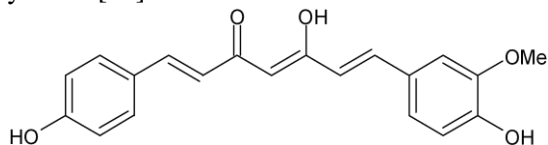
odpowiadają za żółte zabarwienie kurkumy. Grupę diarylheptanoidów tworzą drugorzędowe, roślinne metabolity. Zbudowane są z dwóch aromatycznych grup arylowych, połączonych siedmiowęglowym łańcuchem, w przypadku kurkuminy występują dodatkowo reszty feruloilowe [17].

Kurkumina będąca tautomerem, istnieje w dwóch formach – ketonowej i enolowej. Forma enolowa występuje w wodzie, a forma ketonowa w organicznych rozpuszczalnikach (Rys. 1, 2). Jako substancja chemiczna posiada liczne grupy funkcyjne. Aromatyczne fenolowe pierścienie połączone są przez dwie α,β -nienasycone grupy karbonylowe [18].

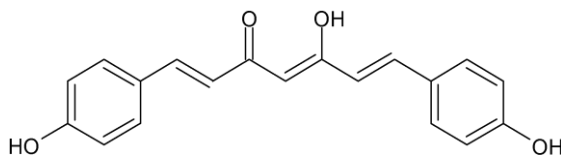


Rysunek 2. Forma ketonowa kurkuminy. Jest to forma kurkuminy rozpuszczalnej w organicznych rozpuszczalnikach.

Kurkumina, jako silny przeciwutleniacz, wykorzystywana jest w testach *in vitro* i *in vivo*. Czysta kurkumina jest odporna na ogrzewanie, ale łatwo ulega utlenieniu oraz działaniu dwutlenku siarki. *In vitro* zauważa się inhibicję deacetylaz histonów np. HDAC1, HDAC3, HDAC8, p300 acetylotransferazę histonów. W testach klinicznych, kurkumina wykazuje słabą przyswajalność po podaniu doustnym. Ponadto kurkumina stanowi zaledwie 3-5% suchej masy kurkumy [3-4,19]. Zaś 60-70% ekstraktu z rośliny *Curcuma longa* to kurkumina, co czyni kurkuminę głównym kurkuminoidem zawartym w tej roślinie. Pozostałymi składnikami są demetoksykurkumina, która stanowi 20-27% oraz bisdemetoksykurkumina, która stanowi 10-15% ekstraktu (Rys. 3, 4) [20]. Biodostępność kurkuminy jest niska także ze względu na małą absorpcję przez nabłonek jelit oraz jej szybki metabolizm przez wątrobę. Jej rozpuszczalność w roztworach wodnych jest ograniczona, zaś dobrze rozpuszcza się w tłuszczach, więc gdy chcemy przyjmować kurkuminę doustnie należy ją roztworzyć np. w oliwie z oliwek. W celu zwiększenia jej biodostępności stosuje się kompleksy zawierające jony metali: Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2+} oraz albuminy, a także piperynę. Piperyna, oprócz tego, że zwiększa wchłanianie kurkuminy o 2000%, wzmaga także wydzielanie soków trawiennych (żołądkowego, trzustkowego, jelitowego) przez co poprawia trawienie pokarmu i wpływ na wchłanianie ważnych składników odżywczych takich jak: witaminy C i A, selenu, czy witaminy B6 [10, 21, 22]. Kurkumina w surowicy jest praktycznie niewykrywalna [23].



Rysunek 3. Demetoksykurkumina. Stanowi około 20-27% ekstraktu z *Curcuma longa*, będąc przy tym drugim co do ilości składnikiem kurkumy.



Rysunek 4. Bisdemetoksykurkumina. Stanowi około 10-15% ekstraktu z *Curcuma longa*. W ekstrakcie z *Curcuma longa* występuje w najmniejszej ilości spośród podanych 3 składników.

Kurkuminę uznaje się za tak zwany związek PAINS (ang. pan-assay interference compounds), czyli taki, który wykazuje aktywność w wielu typach testów, zakłócając odczytywanie testu, ale nie przez specyficzne interakcje związku z substancją badaną. Kurkumina wykazuje wszystkie cechy związku PAINS: kowalencyjne znakowanie białek, chelatowanie metali, reaktywność redoks, agregacja, zakłócenie błony, zakłócenia fluorescencyjne i rozkład strukturalny. Kurkumina jest uważana także za IMP. IMPs to nieprawidłowe metaboliczne panacea zlokalizowane w środku czarnej dziury naturalnych produktów, które mają tendencję do wyczerpywania zasobów badawczych. Jako pojedyncze elementy, IMPs to prototypy nieprawdopodobnych do stworzenia metabolicznych panacei, które wykazują słabą wydajność jako leki prowadzące [20].

3. Prozdrowotne działania kurkumy

3.1. Działanie przeciwbakteryjne

Kurkuma jest również naturalnym antybiotykiem. Jak wykazały liczne badania, zawarta w niej kurkumina hamuje wzrost zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych bakterii. Wśród szczepów wrażliwych na jej działanie wymienia się m.in. *Staphylococcus aureus* [24], *Helicobacter pylori* [25], *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Escherichia coli* [26]. Uważa się, iż jednym z głównych mechanizmów działania kurkuminy na bakterie jest hamowanie montażu protofilamentów białka FtsZ, które jest prokariotycznym homologiem tubuliny, co pośrednio hamuje proliferację komórek bakteryjnych [27]. Badanie przeprowadzone na szczepach gronkowca złocistego *S. aureus* zarówno wrażliwych (MSSA), jak i niewrażliwych na metycylinę (MRSA) wykazało, iż kurkumina przyłącza się do peptydoglikanu, którego zwiększone stężenie hamuje jej antybakteryjne właściwości. Są one natomiast wzmacniane w obecności łagodnych detergentów i inhibitorów ATPazy. Te ostatnie upośledzają kasetę wiążącą ATP (ABC), zaś detergenty wywołują ten sam efekt na integralność błony komórkowej [28]. W subinhibicyjnych stężeniach kurkumina wykazuje działanie synergistyczne w obecności innych antybiotyków przeciwko wspomnianemu *S. aureus* [29]. Szczególnie interesujący jest sposób działania kurkuminy na bakterie *Escherichia coli*. Wywołuje ona apoptozopodobną reakcję, która przebiega z udziałem białka RecA, mediatora bakteryjnej odpowiedzi apoptozopodobnej. Podczas gdy w wysokich stężeniach kurkumina, jak już zostało wspomniane, narusza integralność błony komórkowej, nie odnotowano takiego efektu przy jej minimalnym stężeniu hamującym (MIC). W komórkach *E. coli* poddanych działaniu opisywanego związku odnotowano natomiast akumulację reaktywnych form tlenu (RFT), depolaryzację błony

komórkowej oraz napływ jonów Ca^{2+} . Ponadto zwiększona była ekspresja RecA. Poprzez badania na *E. coli* udowodniono również, iż antybakteryjne właściwości kurkuminy zwiększają się podczas ekspozycji na światło. Napływ reaktywnych form tlenu przeważa nad mechanizmami adaptacyjnymi komórki bakteryjnej, upośledza metabolizm żelaza oraz biosyntezę centrów żelazowo-siarkowych, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki [26].

3.2. Działanie przeciwwirusowe

Prócz antybakteryjnego, stwierdzono także antywirusowe działanie kurkuminy, które może przebiegać drogą różnych mechanizmów. U wirusów japońskiego zapalenia mózgu powoduje rozregulowanie układu ubikwityna/proteasom, co z kolei skutkuje nagromadzeniem ubikwitynowanych białek [30]. Zakłócając szlak sygnałowy NF- κ B, hamuje replikację wirusa Rift Valley (RVF) [31]. Antywirusowych właściwości kurkuminy dowiedziono także na przykładzie norowirusów (NoV), mogących powodować zakażenia przewodu pokarmowego. Spośród 18 użytych w badaniu fitochemikaliów, kurkumina wykazała najskuteczniejsze działanie neutralizujące przeciw mysiemu norowirusowi (MNV), użytemu jako modelowy przedstawiciel tej grupy wirusów. Działanie to zależy zarówno od stężenia kurkuminy, jak i czasu jej inkubacji ze wspomnianymi patogenami. Wraz ze wzrostem wartości obu czynników rósł procent unieszkodliwionych MNV, jednak nie zaobserwowano cytotoksyczności. W przypadku stężenia kurkuminy, badania przeprowadzono przy różnych jego wartościach: 0.25, 0.5, 0.75, 1 oraz 2 mg/mL. Ostatecznie przy stężeniu 2mg/mL zaobserwowano unieszkodliwienie ok. 91% MNV. Ponadto w poszukiwaniu mechanizmu antywirusowego działania kurkuminy stwierdzono, iż nie hamuje ona replikacji wirusowego RNA [32].

Inne badanie dotyczące wpływu kurkuminy na norowirusy opierało się na terapii fotodynamicznej, będącej obiecującą alternatywną metodą leczenia zakażeń w obliczu rosnącej lekooporności drobnoustrojów. Polega ona na wytwarzaniu reaktywnych form tlenu (RFT) przy udziale wzbudzonych światłem fotouczulaczy (PS) [31]. Jednym z nich okazała się kurkumina. Oceniono to, badając wpływ jej fotoaktywowanej diody LED postaci na kaliciwirus kotów (*Feline calicivirus*, FCV) oraz wspomniany wyżej mysy norowirus (MNV). Stwierdzono aktywność antywirusową wobec obydwu, przy czym była ona nieco niższa dla MNV. Wyniki te dają możliwość użycia fotoaktywowanej kurkuminy jako naturalnego dodatku w przemyśle spożywczym w celu zmniejszenia zanieczyszczenia pożywienia wirusami [33].

Innymi wirusami, których wrażliwość na kurkuminę opisano, są – przenoszone przez komary – Zika i chikungunya, a także wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSIV). Istotną w tym przypadku cechą łączącą te patogeny jest posiadanie osłonki. Odnotowano przy tym brak wrażliwości nieposiadającego osłonki wirusa Coxsackie B3. Jako rezultat przeprowadzonych na ZIKV oraz CHIKV badań wysnuto wnioski, iż kurkumina nie wpływa na ich replikację, lecz upośledza ich możliwość wiązania się z powierzchnią komórki. Mechanizm tego działania pozostaje nieznan. Przypuszcza się, że dzieje się tak wskutek modyfikacji błony wirusowej, podobnie jak to ma miejsce w przypadku działania kurkuminy na wirus HCV [34, 35].

3.3. Działanie przeciwgrzybicze

Do opisanych już działań kurkumy należy dodać także działanie przeciwgrzybicze – szczerem wrażliwym na działanie kurkuminy jest na przykład *Candida albicans* [26]. Prawdopodobnie opiera się ono na zmianie aktywności ATPazy związanej z błoną komórkową, biosyntezie ergosterolu, wydzielaniu proteinaz oraz indukcji apoptozy [36]. Subletalne dawki kurkuminy powodują upregulację transkrypcji kinazy białkowej C (PKC), syntazy chitynowej 1 (CHS1) oraz syntazy chitynowej 3 (CHS3) u grzyba *Sporothrix schenckii*. Powoduje to zwiększenie zawartości chityny w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej *S. schenckii*. U myszy zainfekowanych traktowanymi kurkuminą konidiami *S. schenckii* zaobserwowano osłabiony stan zapalny oraz zmniejszone nasilenie zakażenia grzybem. Test ELISA wykazał, iż we wczesnej fazie infekcji traktowane kurkuminą konidia stymulowały makrofagi myszy do wydzielania prozapalnej cytokiny. Z przedstawionych badań wynika zatem, że grzybobójcze działanie kurkuminy prawdopodobnie opiera się na pobudzeniu akumulacji chityny w ścianie komórkowej grzyba *S. schenckii*, co wiąże się z jego obniżoną wirulencją w zainfekowanej myszy [37]. Wadą kurkuminy jako potencjalnego środka przeciwgrzybiczego jest jej niska rozpuszczalność w wodzie oraz szybka biodegradacja [38]. Jednak dendrosomalne nanocząstki kurkuminy cechują się zwiększoną rozpuszczalnością oraz biodostępnością. Badania przeprowadzone na myszach zakażonych kandydozą układową dowodzą, że przeciwgrzybicze działanie nanokurkuminy cechuje się przynajmniej dwa razy większą efektywnością, niż kurkuminy o tym samym stężeniu. Nanokurkumina może być także używana w profilaktyce chorób grzybiczych zwłaszcza u pacjentów wysokiego ryzyka [39]. Oprócz kurkuminy, spośród składników kurkumy działanie przeciwgrzybicze przypisuje się też jej endofitom grzybowym. Z kłącza kurkumy można wyizolować 207 różnych endofitów grzybowych. Znaczące działanie przeciwko *Colletotrichum gloeosporioides* wykazał zwłaszcza *Phoma herbarum*. Składnikiem *P. herbarum* wykazującym antagonizm przeciwko *C. gloeosporioides* jest alkohol gentsylowy. *P. herbarum* może być zatem używany jako czynnik biokontrolujący przeciw *C. gloeosporioides* [40].

Naturalny olejek eteryczny wyizolowany z kurkumy również wykazuje działanie przeciwgrzybicze. Zbadano jego wpływ na *Aspergillus flavus*. Zarówno wpływ na wzrost grzybni, jak i na wzrost zarodników oraz produkcję aflatoksyn zależny był od dawki olejku. Mechanizm przeciwgrzybiczy olejku eterycznego związany jest z uszkodzeniem grzybiczego systemu błon, w tym błony komórkowej i mitochondrialnej. Powoduje inhibicję dehydrogenazy bursztynianowej, syntezy ergosterolu, ATPazy mitochondrialnej oraz dehydrogenazy jabłczanowej. Przeciwgrzybiczy efekt umożliwiający usunięcie zanieczyszczeń grzybami w kukurydzy wskazuje, iż naturalny olejek eteryczny kurkumy może być potencjalnym ekologicznym środkiem przeciwgrzybiczym [41].

4. Kurkuma a nowotwory

Nowotwór jest definiowany jako niekontrolowany monoklonalny rozrost nadmiernie proliferujących komórek nie ulegających apoptozie, a tworzących nieprawidłową masę tkankową nieskoordynowaną z fizjologicznymi tkankami. Jest skutkiem zaburzeń prawidłowego cyklu komórkowego, różnicowania się komórki, komunikacji międzykomórkowej, wewnątrzkomórkowej i pozakomórkowej. Nowotwór trwa nawet po usunięciu przyczyny stymulującej jego powstanie [42].

Naturalne polifenole od dawna stosowane są do zapobiegania i leczenia chorób nowotworowych. Tym samym te fitochemikalia są potencjalnie zdolne do działania jako chemoprewencyjne oraz jako chemioterapeutyki w różnych typach raka [9, 43].

4.1. Działanie przeciwnowotworowe kurkumy

Zakres celów molekularnych kurkuminy jest bardzo zróżnicowany – oddziałuje ona na liczne kaskady biochemiczne i molekularne. Substancja ta fizycznie wiąże się z aż 33 różnymi białkami, w tym z reduktazą tioredoksyny, cyklooksygenazą-2 (COX-2), kinazą białkową C, 5-lipooksygenazą (5-LOX) i tubuliną. Różnorodne cele molekularne modulowane przez kurkuminę obejmują czynniki transkrypcyjne, czynniki wzrostowe oraz ich receptory, cytokiny, enzymy i geny regulujące proliferację komórek i apoptozę. Dowiedziono, że kurkumina jest zdolna do hamowania proliferacji i indukcji apoptozy w prawie wszystkich typach komórek nowotworowych. Śmierć komórki nowotworowej powodowana przez kurkuminę może odbywać się na drodze aktywacji szlaków śmierci komórkowej, jak i poprzez zahamowanie szlaków wzrostu i proliferacji komórki [44].

4.1.1. Zastosowanie kurkuminy w leczeniu raka piersi

Rak piersi to obecnie najczęstszy nowotwór złośliwy dotyczący kobiety, zarówno w Polsce, jak i na świecie. Wzrastająca zapadalność na ten nowotwór wśród kobiet skłania do opracowania skutecznych działań zarówno w zakresie profilaktyki pierwotnej, jak i wtórnej. Jedną z bardziej obiecujących i przyszłościowych metod, obejmującą oba rodzaje profilaktyki przeciwnowotworowej jest chemoprewencja. Chemoprewencja, to metoda wykorzystująca naturalne bądź syntetyczne związki chemiczne, mająca za cel hamowanie, opóźnianie lub nawet całkowite odwrócenie procesu nowotworzenia. Do składników pochodzenia naturalnego o szerokim spektrum działania przeciwnowotworowego należy właśnie kurkumina. Substancja ta zasługuje na szczególną uwagę, ze względu na swoje liczne właściwości chemoprewencyjne. Należą do nich m.in.: działanie przeciwzapalne, indukowanie apoptozy w komórce, hamowanie angiogenezy oraz przerzutowania nowotworu [45]. Skuteczność kurkuminy w terapii nowotworów poddawano już licznym badaniom. Wyniki kilku badań przedklinicznych dotyczących skuteczności przeciwnowotworowej kurkuminy w niektórych modelach raka, w tym raka piersi, dowiodły, że kurkumina w połączeniu z wybranymi środkami chemioterapeutycznymi daje najlepsze efekty hamowania proliferacji ludzkich komórek nowotworowych. Co więcej, jej skuteczność w hamowaniu rozwoju nowotworu zaobserwowano na różnych

poziomach molekularnych [46]. Jedne z najnowszych doniesień wskazują, że kurkumina hamuje wzrost komórek ludzkiego raka piersi poprzez modulację szlaku sygnalizacji NF- κ B. Szlak NF- κ B obejmuje pięć różnych członków rodziny: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB i c-Rel. Wszyscy przedstawiciele tej rodziny mają wspólną domenę homologiczną Rel (RHD: 300aa). Domena ta ułatwia wiązanie DNA w interakcji z I κ B – wewnątrzkomórkowym inhibitorem NF- κ B. Szlak NF- κ B może zostać aktywowany przez liczne czynniki. Aktywowany NF- κ B może być następnie fosforylowany, a kolejno przemieszcza się do jądra, gdzie rozpoczyna transkrypcję różnych onkogenów. W efekcie prowadzi to do hamowania apoptozy oraz pobudzenia proliferacji komórek i ich transformacji nowotworowej. Konsekwencją aktywacji szlaku NF- κ B jest inwazja nowotworu i przerzuty oraz pobudzenie angiogenezy. Kurkumina skutecznie tłumiała aktywację NF- κ B, dzięki czemu m.in. hamowała przerzuty do płuc w modelu raka piersi [47]. Działanie przeciwnowotworowe kurkumy w raku piersi badano także na modelach zwierzęcych. W modelu mysim zahamowanie wzrostu guza i angiogeneza wywołane przez kurkuminę wiązało się z obniżeniem ekspresji cykliny D1 – cząsteczki przyczepności komórek śródbłonna płytek-1 (PECAM-1) i p65, co utrudniało przyleganie komórek zmienionych nowotworowo do zdrowych tkanek. W innym badaniu na zwierzętach stwierdzono, że u myszy kurkumina stłumiła przerzuty raka piersi zmieniając równowagę makrofagów m1/m2 w mikrośrodkowisku nowotworowym. Ponadto, w modelu heteroprzeszczepu raka piersi leczenie kurkuminą doprowadziło do zmniejszenia objętości guza i obniżenia poziomu proliferacji komórek nowotworowych [48]. Wpływ kurkuminy na raka piersi badano także w kilku badaniach klinicznych. W randomizowanej, podwójnie ślepej próbie klinicznej z kontrolą placebo stwierdzono, że doustne stosowanie kurkuminy (6,0 g/dobę) podczas radioterapii zmniejsza nasilenie zapalenia skóry u chorych na raka piersi, co wskazuje na korzystne działanie pośrednie kurkuminy w leczeniu raka piersi. W innym badaniu wykazano, że kurkumina może być stosowana *in vivo* jako inhibitor białka oporności raka piersi (BCRP, ABCG2). Białko oporności raka piersi ogranicza absorpcję jelitową leków o małej przenikalności i pośredniczy w wydalaniu leków i metabolitów w żółci. Dlatego stosowanie kurkuminy w leczeniu raka piersi zwiększało przyswajalność leków stosowanych w standardowej terapii [48]. W ludzkim modelu ksenogenicznym raka piersi kurkumina poprzez podawanie doustne zmniejszyła przerzuty do tkanek płuc o ok. 40% [49]. Najnowsze doniesienia wskazują, że kurkumina za pośrednictwem miR-15a i miR-16 powodowała obniżenie poziomu ekspresji receptora bcl-2, co prowadziło do apoptozy w liniach komórek raka piersi MCF-7, SKBR-3 i Bcap-37. Interesujący jest fakt, że podobny wzór regulacji miR-15a/16 bcl-2 obserwowano również w białacze. Podsumowując, wyniki te wskazują, że rodzina miR-15a / 16 może służyć jako potencjalne cele terapeutyczne nowotworów piersi z nadekspresją białka Bcl-2 [50]. Niektóre doniesienia wskazują, że u pacjentów z rakiem piersi poddawanych standardowej chemioterapii nie powinno się suplementować kurkuminy ze względu na jej właściwości antyoksydacyjne, a także zdolność do zmniejszenia aktywności JNK kinazy – czynnika transkrypcyjnego, który pośrednio uczestniczy

w procesie apoptozy. W terapii raka piersi na szczególną uwagę zasługuje kurkumina opłaszczana nanocząsteczkami albuminy. W badaniach przeprowadzonych na szczurach koncentracja kurkuminy kapsułkowanej nanocząsteczkami albuminy (nanokurkuminy) w osoczu była znacznie wyższa (425 ng/ml) w porównaniu z podawaniem wolnej kurkuminy (276 ng/ml). Obecność nanokurkuminy we krwi była możliwa do wykrycia nawet po 25 dniach od jej podania. Ponadto stężenie nanokurkuminy w wątrobie, płucach oraz mózgu było zdecydowanie wyższe niż w przypadku wolnej kurkuminy, co może się wiązać ze zmniejszeniem ryzyka przerzutów raka piersi [45].

4.1.2. Zastosowanie kurkuminy w leczeniu raka płuc

Rak płuc jest szeroko rozpowszechnionym nowotworem – powoduje rocznie ponad milion przypadków zgonów na całym świecie. Pomimo postępów w interwencjach chirurgicznych i terapeutycznych w leczeniu raka płuc pięcioletnie przeżycie utrzymuje się na niskim poziomie (około 16%), przy niewielkiej poprawie obserwowanej w ciągu ostatnich 30 lat. Do najważniejszych czynników ryzyka raka płuc należy palenie (stanowi aż 85% wszystkich przypadków). Niepokojący jest fakt, że częstość występowania raka płuca u osób, które nie palą, również rośnie. Coraz częściej podkreśla się, że profilaktyka powinna skupiać się na grupach wysokiego ryzyka, czyli nie tylko na osobach palących papierosy, ale i na pacjentach poddanych resekcji pierwotnego guza. W modelach chemoprecypowania raka płuc często uzyskuje się sprzeczne wyniki, a racjonalne podejście do prób chemopreizacji raka płuc jest dość trudne. Ostatnimi czasy dużo uwagi poświęca się na korzyści płynących ze stosowania dietetycznych, bioaktywnych związków w profilaktyce raka płuc. Dzieje się tak głównie ze względu na to, że związki te posiadają korzystny profil toksyczności – są mało toksyczne, a także długą historię stosowania w ludzkiej populacji, przez co wydają się bezpieczniejsze w stosowaniu. Jednym z takich związków jest właśnie kurkumina [51].

W badaniach nad rakiem drobnokomórkowym płuc, kurkumina doprowadziła do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu (ang. ROS – reactive oxygen species) wewnątrz komórki, co w konsekwencji przyczyniło się do stresu oksydacyjnego komórek rakowych. Potencjał błony mitochondrialnej został zmniejszony, co spowodowało uwolnienie cytochromu c do cytozolu, w wyniku czego nastąpiła aktywacja kaspazy-9 i kaspazy-3, a finalnie doszło do apoptozy komórek nowotworowych. Poza tym, kurkumina hamowała aktywność enzymatyczną domeny wewnątrzkomórkowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [48]. Wykazano, że kurkumina indukuje apoptozę w komórkach raka płuc linii A549 poprzez obniżenie poziomu miR-186, który hamuje działanie kaspazy-10 [50]. Różne badania z zastosowaniem modeli raka płuc, wskazują, że kurkumina wpływa na hamowanie przekazywania sygnału i aktywacji szlaków Stat3 transkrypcji, a także metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) i naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF – vascular endothelial growth factor), biorącego udział w tworzeniu sieci naczyń krwionośnych podczas angiogenezy [52]. Można powiedzieć

zatem, że kurkumina ma ogólne korzystne działanie dla chorych na raka poprzez promowanie apoptozy w komórkach nowotworowych. Traktowanie komórek niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCL – non-small-cell lung carcinoma) kurkumina hamowała proliferację i inwazję komórek, a dodatkowo indukowało przejście cyklu komórkowego z fazy G1 do fazy G0, co skutkowało zatrzymaniem cyklu komórkowego i hamowaniem proliferacji i przerzutów NSCLC [53]. Leczenie kurkumina (50-100 mM) wywoływało także autofagię w ludzkich komórkach gruczolakoraka płuc poprzez aktywację szlaku sygnałowego aktywowanej kinazy białkowej (AMPK – activated protein kinase). Leczenie za pomocą połączenia kurkuminy i erlotynibu znacząco hamowało wzrost komórek NSCLC odpornych na erlotynib *in vivo*, co sugeruje, że kurkumina może być potencjalnym adiuwantem dla pacjentów z NSCLC podczas leczenia erlotynibem [53]. Określenie skuteczności kurkuminy w leczeniu raka płuc wciąż wymaga dalszych badań, mimo, iż wyniki dotychczasowych są bardzo perspektywiczne.

4.1.3. Zastosowanie kurkuminy w leczeniu raka jelita grubego

Rak jelita grubego (łac. *carcinoma intestini crassi*) stanowi poważny problem wśród ludzi po 40 roku życia. Rak jelita grubego jest jednym z najczęstszych przyczyn zachorowalności na raka zarówno u mężczyzn jak i u kobiet. Jednak kobiety powyżej 65 roku życia wykazują wyższą śmiertelność i niższe 5-letnie przeżycie raka jelita grubego w porównaniu z mężczyznami w tym samym wieku [54]. Od 2012 roku jest to druga najczęstsza przyczyna raka u kobiet (9,2% zdiagnozowanych nowotworów) i trzecim najczęściej występującym u mężczyzn (10,0% zdiagnozowanych nowotworów), będąc czwartą najczęstszą przyczyną śmierci raka po raku płuca, żołądka i raku wątroby. Każdego roku u ponad miliona osób wykrywa się raka jelita grubego, w 2010 r. odnotowano 715 000 zgonów. Umieralność na raka jelita zwiększyła się wraz z rozwojem państw, co spowodowało wzrost z 490 000 zgonów w 1990 r. do wspomnianych 715 000 zgonów. Największa zachorowalność przypada na siódmą dekadę życia [55, 56].

Najczęstszymi przyczynami raka jelita grubego są starość, styl życia oraz niewielka liczba przypadków wynikających z zaburzeń genetycznych. Nieodpowiednio dobrana dieta, otyłość, palenie tytoniu i brak aktywności fizycznej sprzyjają zachorowalności. Czynniki wpływającymi na wzrost ryzyka są także czerwone i przetworzone mięso oraz alkohol. Innym powodami mogą być zapalna choroba jelit, obejmująca chorobę Crohna i wrzodziejące zapalenie okrężnicy [57].

Rak jelita grubego powstaje z nabłonka błony śluzowej okrężnicy, bądź odbytnicy. Objawy nowotworów jelita grubego są zależne od stopnia zaawansowania choroby i umiejscowienia choroby w obrębie jelita. Większość objawów jest niespecyficzna, wśród nich możemy wyróżnić: krwawienie z odbytnicy (mogące być także objawami hemoroidów), obecność krwi w stolcu po defekacji, naprzemienne występowanie zaparć i biegunek, uporczywe biegunki, ból i skurcze brzucha [58].

Po spożyciu kurkumina jest praktycznie niewykrywalna, zaś największe jej stężenie można zaobserwować w obszarze jelita grubego i prostaty. W związku z tym ta substancja często jest wykorzystywana w badaniach nad leczeniem raka jelita grubego.

Liczne doniesienia wykazały modulację wielu szlaków sygnalizacji komórkowej za pomocą kurkuminy oraz licznych cząsteczek molekularnych w różnych liniach komórek nowotworowych, z którymi reaguje. Dzięki temu kurkumina hamuje wzrost guza na drodze spadku aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz hamuje proces angiogenezy [59].

W 2014 odkryto, że w linii komórkowej HCT116 raka jelita grubego, występuje podwyższone stężenie CDK2 (ang. *cyclin dependent kinase 2*). Dane z testu kinazy *in vitro* i *ex vivo* wykazały, że kurkumina tłumi aktywność kinazy CDK2. Ponadto, indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, która jest regulowana przez CDK2 w komórkach HCT116. Ze względu na zatrzymanie cyklu komórkowego komórek, zbadano działanie antyproliferacyjne kurkumy na komórki nowotworowe jelita grubego HCT116. W tym eksperymencie kurkumina skutecznie hamowała proliferację komórek HCT116. Zgodnie z przewidywaniami, z wyeliminowaną ekspresją CDK2 wykazują zatrzymanie cyklu w fazie G1 i zmniejszoną proliferację. Na podstawie tych wyników zidentyfikowano kinazę CDK2 jako bezpośredni cel kurkumy w komórkach raka jelita grubego [60].

Kurkumina może również wpływać na hamowanie ekspresji GRP78 (ang. *glucose-regulated protein 78*). GRP78 jest białkiem regulującym pracę siateczki endoplazmatycznej w komórkach, a jego aktywność jest powiązana ze złośliwością nowotworu. Jednak rola GRP78 w cytotoksycznym działaniu kurkuminy na komórki nowotworowe jelita grubego jest nadal niejasna. Po wyłączenia ekspresji GRP78 w liniach komórkowych HT29 i DLD-1 nowotworowych jelita grubego, wykonano między innymi MTT i TUNNEL test w celu sprawdzenia żywotności komórek. Komórki DLD-1 były bardziej wrażliwe na leczenie kurkumina niż komórki HT-29. Zaś stwierdzono wyższy poziom ekspresji GRP78 w komórkach DLD-1 niż w komórkach HT-29. Poziom GRP78 wykazuje więc ujemną korelację z wrażliwością na leczenie kurkumina [61].

5. Toksyczność działania kurkumy

Szybki metabolizm w przewodzie pokarmowym, słaba rozpuszczalność w płynach ustrojowych oraz niska biodostępność wydają się być głównymi utrudnieniami w wykorzystaniu kurkuminy jako środka chemoprewencyjnego. Konieczne jest zatem opracowanie efektywniejszego zwiększenia jej bioprzyswajalności oraz przeprowadzenia badań klinicznych na szeroko zakrojonej skali z użyciem mało jeszcze poznanej formy kurkuminy, czyli nanokurkuminy [45, 62-67].

Rozwój preparatów kurkuminy w postaci nanocząstek, liposomów, miceli lub kompleksów fosfolipidowych w celu zwiększenia jej biodostępności, przyswajalności i skuteczności jest wciąż we wczesnych stadiach badań. Jednak faktem jest, że otrzymywane wyniki są obiecujące [9, 47, 63-67]. Zaletą kurkuminy, potwierdzoną zarówno w badaniach na ludziach, jak i na zwierzętach jest jej niewielka toksyczność. Toksyczność związana z leczeniem kurkumina nie była obserwowana nawet do 8000 mg na dobę, dlatego dawka 8 g kurkuminy dziennie uważana jest za bezpieczną dla człowieka. Wyższe dawki okazały się niedopuszczalne dla pacjentów, jednak nie ze

względem na rosnącą toksyczność, tylko głównie ze względu na objętość leku. Po przekroczeniu spożycia 12 g dziennie pojawiały się niewielkie niepożądane działania w postaci nudności i biegunki. Leczenie kurkumina jest na ogół dobrze tolerowane przez pacjentów, u nielicznych pojawiają się drobne skutki niepożądane takie jak biegunka, bóle głowy, wysypka i żółtawe stolce [23]. W badaniu klinicznym z udziałem chorych na raka jelita grubego u niektórych pacjentów podawanie kurkumy spowodowało lekki wzrost masy ciała, a także zwiększenie liczby komórek apoptotycznych i ekspresji p53, przy jednoczesnym spadku poziomu czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α) w surowicy.

W celu zwiększenia biodostępności kurkuminy stosowane są adiuwanty. Na przykład u ludzi spożywających dawkę 2 g samej kurkumy, jej poziom w surowicy był niewykrywalny lub bardzo niski, ale jednoczesne stosowanie piperyny wiązało się ze wzrostem biodostępności kurkuminy aż o 2000% [21]. Ponadto, dodanie piperyny jako adiuwantu do kurkumy zwiększało biodostępność kurkuminy podczas badania o wiele bardziej u ludzi niż u szczurów [68].

6. Kurkumina jako potencjalny lek

Kurkuma jest stosowana m. in. w celu poprawy trawienia i pracy wątroby, redukcji guzów macicznych rozpuszczania kamieni żółciowych, uśmierzania bólów menstruacyjnych oraz zwiększenia elastyczności więzadeł. Można ją przyjmować w postaci suplementu diety (kapsułki) lub dodawać jako przyprawę do potraw – od 1/4 do 1/2 łyżeczki dziennie [5-7]. Zastanawiające jest to, iż mimo szeregu prac prowadzonych nad tym popularnym i obiecującym składnikiem potraw nadal nie wprowadzono do obiegu leku zawierającego kurkuminę. Powodem tego mogą być zgłaszane ostatnio przez naukowców obiekcje, a mianowicie niska biodostępność i stabilność chemiczna, słaba farmakokinetyka i farmakodynamika, a nawet toksyczność kurkumy. Są to elementy, które znacząco wpływają na brak oczekiwanego efektu terapeutycznego. Jednak w ciągu kilku ostatnich miesięcy pojawiło się kilka artykułów naukowych polemizujących z powyższymi zastrzeżeniami. Naukowcy są w trakcie opracowania nowoczesnych nanotechnologii mających likwidować niektóre z tych barier. Nie bez powodu kurkuma jest nazywana „cudownym lekiem na życie” [69].

7. Podsumowanie

Właściwości lecznicze kurkumy znane są od tysiącleci. *Curcuma longa* była stosowana najpierw jako barwnik, później jako przyprawa, następnie jako remedium. Medycyna Dalekiego Wschodu oraz medycyna ludowa sprawdziła pozytywne działanie na zdrowie, wtedy jeszcze nieodkrytego, składnika Ostryżu długiego – kurkuminy. Dopiero postęp we współczesnej nauce i technologii umożliwił udowodnienie terapeutycznego wpływu kurkuminy na zdrowie. W ostatnich latach dostarczono naukowych podstaw do stosowania kurkuminy jako leku w chorobach wirusowych, grzybiczych, bakteryjnych, pasożytniczych, nowotworowych, immunologicznych, trawiennych, neurologicznych, układu krążenia etc. Mimo, iż kurkumina nie została zarejestrowana jeszcze jako lek, jest już przez wielu jako lek stosowana

i powszechnie dostępna jako suplement diety pod nazwą „Turmeric”. Rozwój współczesnej medycyny pozwolił również zauważyć niską biodostępność kurkuminy, co było sporym kłopotem i wzbudzało liczne kontrowersje wśród naukowców. Pojawiło się wiele artykułów negujących lecznicze działanie kurkumy. Jednak w krótkim czasie w odpowiedzi na ten fakt pojawiło się mnóstwo możliwości zwiększających skuteczność stosowania leczniczego składnika *Curcuma longa* – stworzenie nanokurkuminy, użycie adiuwantów (np. piperyny), liposomów, miceli lub kompleksów fosfolipidowych. Od tej pory tempo oraz liczba publikacji i badań naukowych na temat kurkumy znacznie wzrosła. Bardzo możliwe, że w najbliższym czasie możemy się spodziewać rewolucjonizującego odkrycia cudownego leku na długowieczność, który znany jest ludzkości od tysięcy lat.

Literatura

1. Gera M., Sharma N., Ghosh M., Huynh D.L., Lee S.J., Min T., Kwon T., Jeong D.K. *Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application*. *Oncotarget*. 72 (2017), s. 1-12.
2. Schmidt B.M., Ribnicky D.M., Lipsky P.E., Raskin I. *Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics*. *Nature Chemical Biology*. 3 (2007), s. 360–366.
3. Sikorski Z.E., Wilska-Jeszka J. *Inne barwniki naturalne - Kurkumina*. *Chemia żywności. Składniki żywności*. Wydawnictwo WNT. 6 (2013), s. 166-167.
4. Świdzki F., Waszkiewicz-Robak B. *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. 3 (2003), s. 109-115.
5. Zimmnicki J., Strzelecka- Sęk B., Krach K. *Środki barwiące do żywności*. *Przemysł Spożywczy*. 3 (1997), s. 32-35.
6. Rutkowski A. *Substancje dodatkowe i składniki funkcjonalne żywności*. *Agro Food Technology*. (1997), s. 416.
7. Pitchford P. *Healing with Whole Foods: Asian Traditions and Modern Nutrition*. Wydawnictwo Galaktyka. 3 (2002), s. 30-95, 254-255.
8. Gertig H., Przysławski J. *Bromatologia. Zarys nauki o żywności i żywieniu*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 1 (2006), s. 17-26, 347.
9. Gupta S.C., Patchva S., Koh W., Aggarwal B.B. *Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 3 (2012), s. 283-299.
10. Goel A., Kunnumakkara A.B., Aggarwal B.B. *Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic*. *Biochemical Pharmacology*. 75 (2008), s. 787–809.
11. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 27 grudnia 2000r. w sprawie wykazu dopuszczalnych ilości substancji dodatkowych i innych substancji obcych dodawanych do środków spożywczych lub żywek, a także zanieczyszczeń, które mogą znajdować się w środkach spożywczych lub używkach. Dz.U. Nr 9 z 2001r., poz. 72 z późniejszymi zmianami.
12. Wang X., Hang Y., Liu J., Hou Y., Wang N., Wang M. *Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell*. *Oncology Letters*. 13 (2017), s. 4825-4831.
13. Epstein J., Sanderson I.R., Macdonald T.T. *Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies*. *The British journal of nutrition*. 103 (2010), s. 1545-1557.

14. Jagetia G.C., Aggarwal B.B. “Spicing up” of the immune system by curcumin. *Journal of Clinical Immunology*. 27 (2007), s. 19–35.
15. Anand P., Thomas S.G., Kunnumakkara A.B., Sundaram C., Harikumar K.B., Sung B., Tharakan S.T., Misra K., Priyadarsini I.K., Rajasekharan K.N., Aggarwal B.B. *Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature*. *Biochemical Pharmacology*. 76 (2008), s. 1590–1611.
16. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. *Farmakopea Polska X*. Warszawa: Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. (2014), s. 4276.
17. Brahmachari G. *Chemistry and Pharmacology of Naturally Occurring Bioactive Compounds*. CRC Press. (2013), s. 285.
18. Lin S.R., Fu Y.S., Tsai M.J. *Natural Compounds from Herbs that can Potentially Execute as Autophagy Inducers for Cancer Therapy*. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (2017), s. 1412.
19. Tayyem R.F., Heath D.D., Al-Delaimy W.K. *Curcumin content of turmeric and curry powders*. *Nutrition and Cancer*. 55 (2006), s. 126–131.
20. Kathryn M. N., Jayme L.D. *The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin*. *Journal of Medical Chemistry*. 60 (2017), s. 1620–1637.
21. Shoba G., Joy D. *Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. *Planta Medica*. 64 (1998), s. 353–356.
22. Atal N., Bedi K.L., *Bioenhancers: Revolutionary concept to market*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 2 (2010), s. 96–9.
23. Hsu C.H., Cheng A.L. *Clinical studies with curcumin*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 595 (2007), s. 471–480.
24. Teow S.Y., Liew K., Ali S.A., Khoo A.S., Peh S.C. *Antibacterial Action of Curcumin against Staphylococcus aureus: A Brief Review*, *Journal of Tropical Medicine*, (2016), s. 1–10.
25. Vetvicka V., Vetvickova J., Fernandez-Botran R., *Erratum to effects of curcumin on Helicobacter pylori infection*. *Annals of Translational Medicine*. 5 (2017), s. 153.
26. Yun D.G., Lee D.G. *Antibacterial activity of curcumin via apoptosis-like response in Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 (2016), s. 5505–1514.
27. Rai D., Singh J.K., Roy N., Panda D. *Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity*. *Biochemical Journal*. 410 (2008), s. 147–155.
28. Mun S.H., Kim S.B., Kong R. *Curcumin reverse methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 19 (2014), s. 18283–18295.
29. Teow S.Y., Ali S.A. *Synergistic antibacterial activity of curcumin with antibiotics against Staphylococcus aureus*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28 (2015), s. 2109–2114.
30. Dutta K., Ghosh D., Basu A. *Curcumin protects neuronal cells from Japanese encephalitis virus-mediated cell death and also inhibits infective viral particle formation by dysregulation of ubiquitin-proteasome system*. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 4 (2009), s. 328–337.
31. Narayanan A., Kehn-Hall K., Senina S., Lundberg L., Duyne R. V., Guendel I., Das R., Baer A., Bethel L., Turell M., Hartman A.L., Das B., Bailey C., Kashanchi F. *Curcumin inhibits Rift valley fever virus replication in human cells*. *Journal of Biological Chemistry*. 287 (2012), s. 33198–33214.
32. Yang M., Lee G., Si J., Lee S.-J., You H.J., Ko G. *Curcumin Shows Antiviral Properties against Norovirus*. *Molecules*. 21 (2016), s. 1401.

33. Randazzo W., Aznar R., Sánchez G. *Curcumin-Mediated Photodynamic Inactivation of Norovirus Surrogates*. Food and Environmental Virology. 8 (2016), s. 244-250.
34. Anggakusuma A., Colpitts C.C., Schang L.M., Rachmawati H., Frentzen A., Pfaender S., Behrendt P., Brown R.J.P., Bankwitz D., Steinmann J., Ott M., Meuleman P., Rice C.M., Ploss A., Pietschmann T., Steinmann E. *Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells*. Gut. 63 (2014), s. 1137–1149.
35. Mounce B.C., Cesaro T., Carrau L., Vallet T., Vignuzzi M. *Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding*. Antiviral Research. 142 (2017), s. 148-157.
36. Sharma M., Manoharlal R., Puri N., Prasad R. *Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in Candida albicans*. Bioscience Reports. 30 (2010), s. 391–404.
37. Huang L., Zhang J., Song T., Yuan L., Zhou J., Yin H., He T., Gao W., Sun Y., Hu X., Huang H. *Antifungal curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of Sporothrix schenckii*. International Immunopharmacology. 34 (2016), s. 263-70.
38. Flora G., Gupta D., Tiwari A., *Nanocurcumin: a promising therapeutic advancement over native curcumin*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems. 30 (2013), s. 331–68.
39. Katirae F., Ashrafai Helan J., Emami S., Hamidian G., Babaei E. *An investigation of the inhibitory effects of dendrosomal nanocurcumin on Candida albicans and systemic candidiasis in BALB/c mice*. Current Medical Mycology. 2 (2016), s. 7-12.
40. Gupta S., Kaul S., Singh B., Vishwakarma R.A., Dhar M.K. *Production of Gentsyl Alcohol from Phoma herbarum Endophytic in Curcuma longa L. and Its Antagonistic Activity Towards Leaf Spot Pathogen Colletotrichum gloeosporioides*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 180 (2016), s. 1093-1109.
41. Hu Y., Zhang J., Kong W., Zhao G., Yang M. *Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (Curcuma longa L.) on Aspergillus flavus*. Food Chemistry. 220 (2017), s. 1-8.
42. Kruś S., Skrzypek-Fakhour E. *Patomorfologia kliniczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 3 (2007), s. 159-164.
43. Davatgaran-Taghipour Y., Masoomzadeh S., Farzaei MH., Bahramsoltani R., Karimi-Soureh Z., Rahimi R., Abdollahi M. *Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective*. International journal of nanomedicine. 4 (2017), s. 2689-2702.
44. Ravindran J., Sahdeo P., Bharat B.A., *Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively?*. The AAPS Journal. 11 (2009), s. 495–510.
45. Terlikowska K., Witkowska A., Terlikowski S., *Kurkumina w chemoprewencji raka piersi*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 68 (2014), s. 571-578.
46. Bimonte S., Barbieri S., Palma G., Rea D., Luciano A., D'Aiuto M., Arra C., Izzo F. *Dissecting the Role of Curcumin in Tumour Growth and Angiogenesis in Mouse Model of Human Breast Cancer*. BioMed Research International. (2015), s. 7.
47. Shanmugam M.K., Rane G., Kanchi M.M., Arfuso F., Chinnathambi A., Zayed M.E., Ali Alharbi S., Tan B. K. H, Alan Prem Kumar A.,Sethi G. *The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment*. Molecules. 20 (2015), s. 2728-2769.

48. Zheng J., Zhou Y., Li Y., Xu D.P., Li S., Li H.B. *Spices for Prevention and Treatment of Cancers*. *Nutrients*. 8 (2016), s. 495.
49. Robbins D., Zhao Y. *Manganese Superoxide Dismutase in Cancer Prevention*. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20 (2014), s. 1628-1645.
50. Tilghman S.L., Rhodes L.V., Bratton M.R., Carriere P., Preyan L. C., Boue S. M., Vasaitis T. S., McLachlan J. A., Burow M. E. *Phytoalexins, miRNAs and Breast Cancer: A Review of Phytochemical-mediated miRNA Regulation in Breast Cancer*. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*. 24 (2013), s. 36-46.
51. Howells L.M., Mahale J., Sale S., McVeigh L., Steward W. P., Thomas A, Brown K. *Translating Curcumin to the Clinic for Lung Cancer Prevention: Evaluation of the Preclinical Evidence for Its Utility in Primary, Secondary, and Tertiary Prevention Strategies*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 3 (2014), s. 350.
52. Niedzwiecki A., Roomi M.W., Kalinovsky T., Rath M. *Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations*. *Nutrients*. 8 (2016), s. 552.
53. Khan N., Mukhtar H. *Dietary agents for prevention and treatment of lung cancer*. *Cancer Letter*. 359(2) (2015), s. 155-164.
54. Fan Y.X., Abulimiti P., Zhang H.L., Zhou Y.K., Zhu L. *Mechanism of reversal of multidrug resistance by curcumin in human colorectal cancer cell line HCT-8/5-FU*. *Genetics and Molecular Research*. 16(2) (2017), s. 1-13.
55. Kim S.E., Paik H.Y., Yoon H. *Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk*. *World Journal of Gastroenterology*. 21 (2015), s. 5167-5175.
56. International Agency for Research on Cancer. *World Cancer Report*. World Health Organization (2014).
57. Lozano R., Naghavi M., Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V., Abraham J., Adair T., Aggarwal R., Ahn S.Y., Alvarado M., Anderson H.R., Anderson L.M., Andrews K.G., Atkinson C., Baddour L.M., Barker-Collo S., Bartels D.H., Bell M.L., Benjamin E.J., Bennett D., Bhalla K., Bikbov B., Bin Abdulhak A., Birbeck G., Blyth F., Bolliger I., Boufous S., Bucello C., Burch M., Burney P., Carapetis J., Chen H, Chou D., Chugh S.S., Coffeng L..E, Colan S.D., Colquhoun S., Colson K.E., Condon J. *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*, *The Lancet*. 380 (2012), s. 2095–2128.
58. Van Blarigan E.L., Meyerhardt JA. *Role of physical activity and diet after colorectal cancer diagnosis*. *Journal of Clinical Oncology*. 33 (2015), s. 1825-34.
59. Deptała A., Wojtukiewicz M.Z. *Rak jelita grubego*. Wydawnictwo Termedia. 1 (2012), s. 10-50, 303-380.
60. Buhmann C., Kraehe P., Lueders C., Shayan P., Goel A. *Curcumin suppresses crosstalk between colon cancer stem cells and stromal fibroblasts in the tumor microenvironment: potential role of EMT*. *Plos One*. 9 (2014), s. E107514.
61. Lim T.G., Lee S.Y., Huang Z. *Curcumin suppresses proliferation of colon cancer cells by targeting CDK2*. *Cancer Prevention Research*. 7 (2014), s. 466-74.
62. Chang Y.J., Huang C.Y. *GRP78 mediates the therapeutic efficacy of curcumin on colon cancer*. *Tumor Biology*. 36 (2015), s. 633-641.
63. Tiyaboonchai W., Tungpradit W., Plianbangchang P. *Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*. 337(1-2) (2007), s. 299-306.

64. Li L., Braiteh F.S., Kurzrock R. *Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis*. *Cancer*. 104(6) (2005), s. 1322-1331.
65. Suresh D., Srinivasan K. *Studies on the in vitro absorption of spice principles--curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines*. *Food and Chemical Toxicology*. 45(8) (2007), s. 1437-1442.
66. Liu A., Lou H., Zhao L., Fan P. *Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 40(3) (2006), s. 720-727.
67. Preetha A., Banerjee R., Huilgol N. *Tensiometric profiles and their modulation by cholesterol: implications in cervical cancer*. *Cancer Investigation Journal*. 25 (2007), s.172–181.
68. Ohori H., Yamakoshi H., Tomizawa M. *Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer*. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5 (2006), s. 2563–2571.
69. Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A., Aggarwal B.B. *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. *Molecular Pharmaceutics*, 4 (2007), s. 807–18.
70. Falconieri M.C., Adamo M., Monasterolo C., Bergonzi M.C., Coronello M., Bilia A.R. *New Dendrimer-Based Nanoparticles Enhance Curcumin Solubility*. *Planta Medica*. 83 (2017), s. 420-425.

Cure-cuma? Lecznice działanie *Curcuma longa*

Streszczenie

Rośliny lecznicze od lat zwracają uwagę badaczy ze względu na zawarte w nich związki chemiczne. Mogą mieć one zastosowanie medyczne, a ich zaletami jest również to, że występują naturalnie w przyrodzie, charakteryzują się niską toksycznością dla człowieka i środowiska oraz mniejszą liczbą efektów ubocznych w porównaniu ze związkami syntetycznymi. Naturalne produkty uzyskane z roślin często służą jako adiuwant wraz z chemioterapeutykami w walce przeciwko nowotworom. Jedną roślin o zastosowaniu medycznym jest *Curcuma longa*.

Kurkuma to pochodząca z Indii przyprawa, która od setek lat jest stosowana w medycynie naturalnej i kosmetycznej Dalekiego Wschodu. W medycynie ludowej podawano ją jako lek łagodzący bóle miesiączkowe, żołądkowe, a także wspomagający leczenie trudno gojących się ran i blizn. Składnikiem aktywnym *Curcuma longa* jest kurkumina. Aktualnie są prowadzone liczne badania w kontekście jej właściwości przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych, przeciwwirusowych, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, radioochronnych i immunostymulujących. Naukowcy próbują również udowodnić jej pozytywne działanie jako lek w chorobach układu krzepnięcia, kardiologicznych, neurologicznych i neurodegeneracyjnych, np. w chorobie Alzheimerera oraz nowotworowych, m. in. w raku jelita grubego, płuc i piersi. Istnieje ponad 3000 publikacji naukowych, które pojawiły się w przeciągu ostatnich lat, udowadniających działanie farmakologiczne kurkumy na podstawie badań in vitro i in vivo. Obecnie prowadzonych jest na ludziach około 200 badań klinicznych nad zastosowaniem kurkuminy w leczeniu.

Zastanawiające jest to, iż mimo szeregu prac prowadzonych nad tym popularnym i obiecującym składnikiem potraw nadal nie wprowadzono do obiegu leku zawierającego kurkuminę. Powodem tego mogą być zgłaszane ostatnio przez naukowców obiekcje, a mianowicie niska biodostępność i stabilność chemiczna, słaba farmakokinetyka i farmakodynamika, a nawet toksyczność kurkumy. Są to elementy, które znacząco wpływają na brak oczekiwanego efektu terapeutycznego. Jednak w ciągu kilku ostatnich miesięcy pojawiło się kilka artykułów naukowych polemizujących z powyższymi zastrzeżeniami. Opracowano nowoczesne nanotechnologie mające likwidować niektóre z tych barier.

Słowa kluczowe: kurkumina, rośliny lecznicze, kurkuma, przeciwnowotworowe, przyprawa

Cure-cuma? Therapeutic effect of *Curcuma longa*

Abstract

Medicinal plants draw the attention of scientist because of chemicals they contain. They may have medicinal uses and their advantages are: naturally occurring in nature, low toxicity to humans and the environment, fewer side effects compared to synthetic compounds. Natural products derived from plants often serve as adjuvants along with chemotherapeutics in the fight against cancer. One such plant is *Curcuma longa*.

Turmeric is a Indian spice that has been used for hundreds of years in the natural and cosmetic medicine in Asia and Africa. In folk medicine, it was given as a medication to relieve menstrual pain, stomach pain, and as a medicine for healing hard-to-heal wounds and scars. Curcumin is an active ingredient of *Curcuma longa*. Numerous studies are currently underway in the context of its anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, antimicrobial, antifungal, radioprotective and immunostimulant properties. Researchers also try to prove its positive effect as a drug in clotting system diseases, cardiological, neurological and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and cancer, for example in colorectal, lung and breast cancer. There are over 3000 scientific publications that have emerged over the last years demonstrating the pharmacological effects of turmeric in vitro and in vivo. Currently, about 200 clinical trials on the use of curcumin in medicine are being conducted.

Interesting that despite a number of work on this popular and promising ingredient, still has not been circulated drug containing curcumin. The reason for this may be recently reported objections, such as low bioavailability and chemical stability, low pharmacokinetics and pharmacodynamics, and even the toxicity of turmeric. These are elements that significantly affect the lack of expected therapeutic effect. However, in the last few months, several scientific articles have appeared in the polemic of the above mentioned objections. Modern nanotechnologies have been developed to eliminate some of these barriers.

Key words: curcumin, medicinal plants, turmeric, anticancer, spice

Wykorzystanie związków biologicznie czynnych pozyskiwanych z rodzaju *Selaginella* w medycynie

1. Wstęp

Przez tysiące lat rośliny dostarczały ludziom wielu podstawowych i ważnych materiałów potrzebnych do codziennego życia, w tym także leków [1]. Pierwszymi ośrodkami wykorzystującymi rośliny lecznicze były Egipt, Chiny, Indie i Grecja [2]. Rośliny lecznicze to takie, które zawierają związki aktywne znajdujące zastosowanie w leczeniu lub stanowiące prekursory syntezy leku [3]. Do takich roślin należą m.in. gatunki z rodzaju widliczka *Selaginella*.

Widliczki należą do widłaków różnozarodnikowych, które stanowią najstarszą grupę wśród roślin waskularnych. Ich pojawienie na Ziemi datuje się na ok. 440 milionów lat temu, na przełomie syluru i dewonu [4]. Rodzina *Selaginellaceae* obejmuje wyłącznie jeden rodzaj *Selaginella*, który zawiera ok. 750 gatunków [5]. Rodzaj ten po raz pierwszy został opisany przez Palisota de Beauvois w 1804 r. [6].

Przedstawiciele *Selaginella* występują na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy [7]. Największe zróżnicowanie widliczek występuje w tropikalnych lasach deszczowych, ale znane są również gatunki zajmujące bardziej ekstremalne siedliska takie jak zimna tundra i regiony alpejskie (na przykład *S. selaginoides*, *S. rupestris*), czy pustynia (*S. lepidophylla*, *S. sartorii*) [8].

Fascynacja botaników rodzajem *Selaginella* rozpoczęła się w XX wieku. Rośliny te są relikdami, które przetrwały praktycznie w niezmienionej formie przez setki milionów lat [4, 7]. Przeważnie są to byliny, ale znane są też gatunki jednoroczne, np. *Selaginella pygmaea* [5]. W obrębie rodzaju *Selaginella* występuje też znaczne zróżnicowanie form morfologicznych, znane są m.in. widliczki o wyprostowanym pokroju, gatunki płożące się, czy nawet epifityczne [9]. Pędy i korzenie roślin regularnie dzielą się dichotomicznie, tworząc w wyniku każdego podziału dwa nowe wierzchołki, w związku z czym wzór ich wzrostu przypomina kształtem literę Y. Długość pędu u niektórych gatunków osiąga do 3 cm, podczas gdy u większych gatunków wynosi od 50 cm nawet do 1 m [4, 5]. Liście u widliczek są mikrofilami, o odrębnym pochodzeniu ewolucyjnym niż liście pozostałych roślin naczyniowych. Na jednym pędzie mogą różnić się wielkością i być ułożone wzdłuż łodygi w czterech rzędach: dwóch z mniejszymi liśćmi grzbietowymi i dwóch z większymi liśćmi brzuszными, będąc wyrazem grzbietobrzusznej symetrii pędu. Możliwe jest również występowanie mikrofilii o jednakowej wielkości, równomiernie rozmieszczonych wokół łodygi, odpowiadających radialnej symetrii pędu. W miejscu rozgałęzienia pędu

¹ mateusz.bartz@uwr.edu.pl, Zakład Biologii Rozwoju Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

pozostaje tkanka o charakterze merystematycznym, nazywana merystemem kątowym, która warunkuje powstanie unikalnej dla rodzaju *Selaginella* bezlistnej, cylindrycznej struktury zwanej ryzoforem. W trakcie rozwoju na wierzchołku ryzoforu powstają korzenie o typowej strukturze, tworzące czapeczkę i włośniki [4, 10]. Widliczka należy do widłaków różnazarodnikowych, co oznacza, że na szczycie pędów tworzy kłosa zarodnionośne z dwoma typami zarodni – makro- i mikrosporangiami. Odpowiednio produkowane są w nich makro- i mikrospory, różniące się morfologicznie wielkością, a przede wszystkim rodzajem powstającego z nich gametofitu. Z makrospor rozwijają się przedrośla żeńskie z rodniami zawierającymi komórki jajowe, natomiast z mikrospor kiełkują przedrośla męskie tworzące plemniki [4, 9].

Chociaż większość doniesień o medycznych właściwościach widliczek pochodzi z medycyny tradycyjnej, to coraz częściej rodzaj ten budzi zainteresowanie badaczy, którzy identyfikują i charakteryzują aktywne związki występujące w ekstraktach *Selaginella* [11, 12]. W przeciągu 400 milionów lat separacji i niezależnej ewolucji widliczek i roślin okrytonasiennych powstała możliwość pojawienia się wielu unikalnych metabolitów wtórnych i szlaków ich biosyntezy, które nie są obecne u okrytonasiennych a mogą mieć znaczenie w medycynie [4]. W związku z ukrytym potencjałem rodzaju *Selaginella* praca przedstawia wykorzystanie tych roślin w medycynie tradycyjnej. Omówione są tu również najnowsze badania związane z identyfikacją i działaniem substancji bioaktywnych występujących u widliczek oraz możliwe zastosowanie pozyskanych z nich metabolitów wtórnych.

2. Zastosowanie rodzaju *Selaginella* w medycynie tradycyjnej

Ludzie przez wieki, szczególnie w Chinach i Indiach, wykorzystywali widliczki w medycynie tradycyjnej [13, 14]. Najwcześniejsze zapiski dotyczące zabiegów leczniczych z wykorzystaniem widliczki pojawiły się w „Shen Nong Ben Cao Jing”, chińskiej książce o rolnictwie i roślinach leczniczych z 2737 r. p.n.e., gdzie preparat wykonany z *Selaginella* stosowano w leczeniu stanów zapalnych, miesiączki i bólu brzucha u kobiet [15]. Opisy zastosowań widliczek można również znaleźć w farmakopeach z Azji, Afryki i Ameryki Łacińskiej, natomiast brak ich w farmakopeach z Europy i Ameryki Północnej. Używana jest cała roślina lub czasami tylko jej liście. Widliczkę można stosować samą lub w połączeniu z innymi ziołami, w formie świeżej lub wysuszonej, zjedzonej na surowo lub wcześniej ugotowanej, sproszkowanej, upieczonej, spożytej jako napar, palonej jak tytoń, ale również stosowanej w postaci okładów, mazideł, naturalnych płynów kosmetycznych czy kąpieeli. Rośliny są w smaku słodkie i po spożyciu dają uczucie ciepła [3]. Poniżej przedstawiono wykorzystanie gatunków widliczki zgodne z lokalnymi tradycjami i wierzeniami wybranych obszarów świata.

2.1. Chiny

Na południu Chin oraz w części centralnej (prowincja Hubei) *Selaginella* jest stosowana jako popularna roślina lecznicza pomagająca na różne dolegliwości [4]. Stosowane są tu głównie takie gatunki jak *S. tamariscina*, *S. doederleinii*, *S. moellen-*

dorffii, *S. uncinata* i *S. involvens* [3]. Najczęściej używanym gatunkiem jest *S. tamariscina*. Napar ze sproszkowanej rośliny pomaga w krzepnięciu krwi oraz zapobiega zanikowi miesiączki w okresie rozrodczym. Mieszanina sproszkowanej *S. tamariscina* z innymi ziołami, ugotowana i wypita, hamuje krwawienia związane z występowaniem hemoroidów oraz krwawienia z macicy. Również napar ten jest stosowany w przypadku przepukliny odbytnicy [16, 17]. *S. tamariscina* znalazła też zastosowanie w leczeniu zaawansowanego raka [18], w oczyszczaniu krwi oraz leczeniu krwiomoczu [19]. Stosowana jest jako przeciwutleniacz, środek przeciwskurczowy, anti-HIV i zapobiegający angiogenezie w chorobach nowotworowych [18]. W połączeniu z akupunkturą stanowi część terapii leczenia cukrzycy. *S. doederleinii* jest często gotowana z mięsem wieprzowym i spożywana w celu leczenia zapalenia płuc, migdałków i spojówek [20]. Roślina ta jest również używana w leczeniu chorób układu krążenia [21], raka płuc, przełyku, nosa i wątroby oraz mięśniaków macicy [3]. Jest aplikowana jako środek bakteriobójczy, stosowana w leczeniu gorączki, bólu gardła, żółtaczki, ostrego i przewlekłego zapalenia wątroby, marskości wątroby, zapalenia pęcherzyka żółciowego, biegunki, czerwonki i obfitych upławów białych, pylicy płuc, krwawienia z nosa, dróg rodnych oraz krwawienia wewnętrznego i po odcięciu pępownicy [3, 22]. *S. uncinata*, która występuje na południu Chin, jest stosowana do walki z chorobami wywołanymi przez bakterie, ale również w przypadku zapalenia wątroby i nowotworów. Kolejny gatunek, *S. moellendorffii*, jest używany w Chinach i na Tajwanie w leczeniu rzeżączki, krwawienia, żółtaczki i ostrego zapalenia wątroby [23, 24]. Na Tajwanie stosuje się również *S. involvens* w celu leczenia zapalenia wątroby [3].

2.2. Indie

W Indiach wykorzystywane są głównie następujące gatunki *Selaginella*: *S. bryopteris*, *S. involvens*, *S. rupestris*, *S. tamariscina*, *S. wallichii*, *S. willdenowii*, *S. corymbosa* [3]. *S. bryopteris* jest tu określana jako „Sanjeevani”, czyli w wolnym tłumaczeniu „ta, która tchnie życie”, bowiem wierzono, że leki przygotowane z tej rośliny mogą ożywić martwego człowieka [25, 26]. Ten gatunek widliczki używany jest jako środek przeciwzapalny, moczopędny, znajduje zastosowanie w zakażeniach dróg moczowych i nerek oraz w leczeniu chorób wenerycznych [27], udaru cieplnego, zaburzeń miesiączkowania, dolegliwości żołądkowych. Stosowany jest również aby zminimalizować ból porodowy, załagodzić oparzenia słoneczne skóry, czy wspomóc wzrost. Indyjskie wspólnoty plemienne wykorzystują *S. bryopteris* głównie jako środek wzmacniający, poprawiający sprawność i wydłużający życie. W różnych częściach Indii wysuszona roślina jest palona wraz z tytoniem w celu wywołania halucynacji, co ma związek z plemiennymi obrzędami. W północno-wschodniej części Indii plemiona używają tej rośliny do leczenia dolegliwości wątrobowych i epilepsji. Plemiona Gondów używają pasty z młodych liści w połączeniu z cukrem lub miodem w leczeniu bólu brzucha i zapaleniu dróg moczowych u dzieci; w innych rejonach pasta służy do leczenia beri-beri i czerwonki [25, 26]. *S. involvens*, *S. rupestris* i *S. tamariscina* używane są jako środek zapobiegający starzeniu się [28]. Napar z *S.*

rupestris jest również używany jako środek uspokajający, natomiast z *S. tamariscina* zapobiega utracie miesiączki w okresie rozrodczym. Napar z *S. wallichii* jest podawany kobietom po urodzeniu dziecka, podczas gdy napar z *S. willdenowii* obniża wysoką gorączkę, a uzyskany po jej spaleniu popiół jest używany w leczeniu bólu pleców. Oprócz wymienionych, stosowane są również inne gatunki *Selaginella*, *S. doederleinii* jako środek uspokajający, *S. myosurus* w leczeniu astmy i zmęczenia, *S. padangensis* palona jak tytoń lub używana jako okład na zawroty głowy i ból zęba, egzemę, reumatyzm, złamania, zapalenia stawów oraz jako środek wydłużający życie [3, 28 -30]. Dodatkowo, *S. delicatula* służy do leczenia bólu brzucha oraz wrzodów zewnętrznych [31], a *S. wightii* pomaga w leczeniu infekcji pęcherza moczowego [3].

2.3. Indonezja i Malezja

W Indonezji i na Archipelagu Malajskim (Malezja) praktykuje się najstarszy i najbardziej rozpowszechniony w tych rejonach system medycyny tradycyjnej zwany 'jamu', wykorzystujący lokalne zioła z Jawy. Zioła te znane są już od początku IX wieku, a w ich skład wchodzi takie gatunki widliczek jak *S. involvens*, *S. ornata*, *S. willdenowii* i *S. plana*. Ogólnie rodzaj *Selaginella* jest wykorzystywany w leczeniu m.in. gorączki, ran, złamań kości, kobiecych dolegliwości i krwawień poporodowych oraz dla poprawy sprawności i wytrzymałości ciała [3, 14, 32]. *S. plana* jest używana do tamowania krwi i opatrywania ran ciętych poprzez rozgniecenie pędów i nałożenie na ranę, a następnie pozostawienie do czasu ustąpienia krwawienia i wygojenia rozcięcia. Stosowana jest również jako środek oczyszczający krew i lek na dolegliwości żołądkowe. W Indonezji *S. willdenowii* jest stosowana w leczeniu ran, bólów menstruacyjnych i chorób skóry [30]. Natomiast w Sabah (Malezja) Murutowie stosują kąpiel w wywarze z *S. plana* w celu obniżenia gorączki. Stosowana jest tutaj również *S. argentea* na ból głowy i wysoką gorączkę, a *S. ciliaris* na swędzenie skóry. Znane są również przykłady wykorzystania w Malezji i na Filipinach *S. tamariscina* na takie dolegliwości jak kaszel, krwioplucie, krwawienie żołądkowo-jelitowe, krwimocz, nadmierne krwawienie podczas miesiączki i piasek nerkowy. Całą roślinę gotuje się do uzyskania skoncentrowanego wywaru i pije. Używana jest również jako środek ściągający i antyseptyczny: w tym celu rana jest opatrywana sproszkowanym lub rozdrobnionym ziołem [3]. Wywar z liści *S. willdenowii* stosuje się w Malezji do leczenia ran, wysokiej gorączki i bólu pleców lub jako środek wzmacniający [30].

2.4. Oceania i Azja

W Vanuatu *S. firmuloides* jest stosowana jako substancja wspomagająca poród [33]. W Brunei *S. willdenowii* jest używana w leczeniu bólu żołądka i infekcji dróg moczowych [30]. We wschodniej części Rosji *S. tamariscina* wykorzystywana jest w celu spowolnienia procesu starzenia się [34]. Natomiast w Korei Południowej *S. doederleinii* oraz *S. tamariscina* znalazły zastosowanie jako lek przeciwnowotworowy [29]. W Korei *S. tamariscina* jest również stosowana w leczeniu zaburzeń miesiączkowych, siniaków oraz astmy, podczas gdy na Sri Lance na ból głowy, paraliż oraz w celu ochrony przed czarną magią. Na tych terenach *S. myosurus* jest wyko-

rzystywana w leczeniu astmy, gorączki i zmęczenia. W Wietnamie *S. tamariscina* znalazła zastosowanie w leczeniu żółtaczki, zapalenia wątroby, oparzeń oraz w postaci naparu w leczeniu chorób układu oddechowego i hemoroidów [3].

2.5. Ameryka Łacińska

Wśród roślin stosowanych w chorobach przewodu pokarmowego w medycynie tradycyjnej stanu Sonora (Meksyk) podawana jest *S. lepidophylla*. Tradycyjnie używana jest również w postaci naparu w leczeniu kamieni nerkowych, torbieli na wątrobie, reumatyzmu, a także aby ułatwić odklejenie i wydalanie łożyska oraz w celu oczyszczenia krwi [35]. Natomiast ekstrakty z *S. pallescens* używane są przez Indian Otomi w leczeniu zaburzeń żołądkowo-jelitowych, hamując zależnie od stężenia spontaniczne skurcze jelita krętego [3]. W Kolumbii *S. asperula* przyspiesza gojenie ran, podczas gdy kłącza *S. exaltata* stosowane w postaci wywaru przez plemię Kuna podaje się w przypadku chorób śledziona i bólów brzucha. Natomiast *S. articulata* i *S. pallescens* używane są na ukąszenia węży, np. w celu neutralizacji jadu żararaki (*Bothrops atrox*) [3, 4, 36]. W Brazylii *S. convoluta* jest stosowana w celu zapobiegania i leczenia chorób żeńskiego układu rozrodczego oraz w uśmierzaniu gorączki, leczeniu przeziębienia i łagodzenia bólu [37]. Również znajduje zastosowanie jako środek przeciwdepresyjny, afrodyzjak i diuretyk [38]. W Gujanie natomiast stosuje się popiół z *S. parkeri*, którym posypuje się pięty niemowlęcia, aby pomóc mu w rozpoczęciu chodzenia. *S. parkeri* oraz *S. epirrhizos* są również stosowane w leczeniu bólu głowy [3].

2.6. Afryka

Pomimo, że znane są gatunki *Selaginella* występujące na obszarze Afryki, mało jest danych wskazujących na ich wykorzystanie w medycynie ludowej. Jedna z nielicznych wzmianek wskazuje, że na Madagaskarze stosuje się *S. fissidentodes* w przypadku kaszlu [3].

Doniesienia o leczniczych właściwościach niektórych gatunków *Selaginella* często się powielają, dotyczą tych samych schorzeń, niezależnie od regionu świata. Może to wskazywać na produkcję przez różne gatunki widliczek podobnych grup związków o takim samym lub zbliżonym działaniu. Dlatego też identyfikacja metabolitów wtórnych, poznanie ich struktury chemicznej oraz przeprowadzenie testów bioaktywności jest bardzo istotne.

3. Związki biologicznie czynne pozyskiwane z *Selaginella* i ich zastosowanie

W związku z właściwościami leczniczymi wykorzystywanymi w medycynie tradycyjnej, rodzaj *Selaginella* staje się coraz bardziej interesujący dla naukowców pod względem produkowanych metabolitów wtórnych i możliwości ich zastosowania w tworzeniu nowych leków [8]. Badania eksperymentalne skupiają się na identyfikacji tych związków oraz określeniu ich struktury, stosując takie metody jak analizy spektroskopowe, dyfrakcję promieniowania rentgenowskiego na pojedynczym kryształach, metodę dichroizmu kołowego oraz izolację i frakcjonowanie za pomocą

chromatografii kolumnowej [39, 40]. Następnie przeprowadzane są testy bioaktywności zidentyfikowanych związków, głównie na liniach komórkowych zwierzęcych i ludzkich, ale również wykonywane są badania na zwierzętach oraz testy sprawdzające działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze [28, 40, 41]. Część prac badawczych opiera się na wykorzystaniu ekstraktów z całych roślin danego gatunku *Selaginella*, gdzie tylko ogólnie określa się występowanie danych grup związków. Obecnie znane są już również prace dotyczące możliwości syntezy niektórych z naturalnych produktów obecnych u tych roślin. Główne związki aktywne pozyskiwane z rodzaju *Selaginella* obejmują flawonoidy (w tym biflawonoidy), selagineliny, inne fenole (taniny, saponiny), lignany, alkaloidy i terpenoidy (triterpeny, steroidy) [15]. Widliczki zwykle różnią się między sobą produkowanymi metabolitami wtórnymi i ich działaniem, stąd też istotne jest właściwe rozpoznawanie wykorzystywanych gatunków, aby zapewnić prawidłowe i bezpieczne zastosowanie substancji czynnych [7, 8]. Informacje dotyczące tych związków, ich występowania u poszczególnych gatunków *Selaginella* oraz działania przedstawia Tabela 1.

3.1. Ekstrakty roślinne

Początkowo aktywność metabolitów wtórnych wybranych gatunków *Selaginella* testowano w postaci ekstraktów z całych roślin lub ich części, bez identyfikacji konkretnych związków biologicznie czynnych. W ten sposób pokazano, że ekstrakt wodny z *S. bryopteris* pobudza wzrost mysich makrofagów (BMC2) oraz komórek pochodzących z *Spodoptera frugiperda* Sf9. Chroni on również komórki Sf9 przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem UV oraz apoptozą pod wpływem nadtlenu wodoru (H_2O_2) [13]. Badania wykazały również znaczne ograniczenie apoptozy indukowanej izocyjanianem metylu w ludzkich komórkach nabłonkowych nerki HEK-293 i okrężnicy FHC [42]. Ekstrakt otrzymywany z suszonych roślin *S. lepidophylla* (popularnie nazywanej różą jerychońską, zmartwychwstanką) hamuje rozwój *Helicobacter pylori*, który jest ludzkim patogenem przyczyniającym się do rozwoju raka żołądka [35]. W przypadku ekstraktu z *S. labordei* opisywane jest jego działanie powodujące obniżenie aktywności XOD (oksydaza ksantynowa) i LOX (lipooksygenaza), dwóch istotnych enzymów generujących wolne rodniki. Może to stanowić ochronę *in vivo* przed szkodliwym działaniem wolnych rodników oraz wyjaśniać zastosowanie *S. labordei* w celu przyspieszenia gojenia ran. Ekstrakt ten może również obniżać poziom ekspresji cyklooksygenazy-2 (COX-2). Badania prowadzone na linii komórkowej CaCo-2 (ludzkie komórki gruczolakoraka jelita grubego) pokazują, że im większa dawka i dłuższy czas traktowania komórek ekstraktem z *S. labordei*, tym mniejsza jest ekspresja genu COX-2, nawet do jej całkowitego zniesienia. Wysoka ekspresja COX-2 jest obserwowana w stanach zapalnych tkanki, natomiast jej obniżenie na skutek działania ekstraktu z rośliny wskazuje na działanie przeciwzapalne ekstraktu [11]. Wodne ekstrakty z liści i pędów *S. willdenowii*, zarówno świeżych jak i suszonych oraz częściowo poddanych obróbce termicznej, wykazują silną aktywność przeciwutleniającą związaną z wysoką zawartością związków fenolowych i flawonoidowych [30]. Ekstrakt z *S. involvens*

obniża aktywność *Propionibacterium acnes*, odpowiedzialnej za pojawienie się trądziku [43]. Peters i in. [28] prowadząc testy na białych szczurach w kierunku hepatotoksyczności wodnego ekstraktu *S. myosurus* uzyskanego z całej rośliny stwierdzili, że uzyskany ekstrakt może być uznany za bezpieczny, dodatkowo wpływa na zwiększenie produkcji płytek krwi oraz odpowiedzi odpornościowej. Badania na szczurach z wykorzystaniem ekstraktu z liści *S. corymbosa*, bogatego we flawonoidy, steroidy i saponiny, wykazały jego działanie ochronne przeciwko hepatotoksyczności leków takich jak izoniazyd, chlorochina, czy alkoholu etylowego [44]. Etanolowy ekstrakt z *S. convoluta* zawierający takie związki jak fenole, steroidy, terpenoidy i flawonoidy, testowany na myszach, okazał się skutecznym środkiem przeciwbólowym w różnych modelach bólu [38]. Natomiast ekstrakt z *S. doederleinii* bogaty w biflawonoidy wpływał hamująco na wzrost mysich komórek LLC (rak płuc) i B16 (czerniak) [20].

3.2. Flawonoidy

Najważniejszymi związkami z tej grupy, wykazującymi właściwości lecznicze, są biflawonoidy, stanowiące dimeryczne formy aglikonów flawonoidowych – flawonów, flawanonów, a także chalkonów i flawonoli [14, 15, 32, 45]. Są to typowe metabolity wtórne występujące przede wszystkim u widliczek, ale także u kilku gatunków mszaków, psylotów, nagonasiennych i okrytonasiennych [32]. Biflawonoidami zidentyfikowanymi u rodzaju *Selaginella* są m.in. amentoflawon, sumaflawon, robustaflawon, ginkgetyna, bilobetyna, hinokiflawon, delikaflawon, heveaflawon, putraflawon, kajaflawon, ochnaflawon, podokarpusflawon A, taiwaniaflawon, izokryptomeryna i 2',8"-biapigenina [15, 22, 46]. Związki te zostały wykryte doświadczalnie u takich gatunków jak *S. tamariscina*, *S. ornata*, *S. plana*, *S. opaca*, *S. remotifolia*, *S. willdenowii*, *S. subalpina*, *S. aristata*, *S. involvens*, *S. intermedia*, *S. moellendorffii*, *S. delicatula*, *S. uncinata*, *S. heterostachys*, *S. doederleinii*. Niektóre z biflawonoidów powszechnie występują u wielu gatunków widliczki, podczas gdy inne są obecne tylko u wybranych taksonów. Na przykład amentoflawon jest związkiem biflawonoidowym pozyskiwanym z kilku gatunków *Selaginella*, natomiast sumaflawon jest uzyskiwany tylko z *S. tamariscina* [46, 47, 48]. Biflawonoidy jako związki lecznicze wykazują aktywność antyoksydacyjną, przeciwzapalną, przeciwalergiczną, hepatoprotekcyjną, przeciwwzkrzepową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczną, przeciwwirusową i antykancerogenną. Chronią przed promieniowaniem UV, działają jak leki przeciwpadaczkowe, wzmacniają pracę serca, obniżają ciśnienie krwi oraz wpływają na metabolizm enzymów [3, 14].

3.2.1. Amentoflawon

Amentoflawon jest głównym związkiem aktywnym należącym do biflawonoidów występującym w *S. tamariscina*. Badania eksperymentalne z wykorzystaniem ekstraktu z suszonych roślin tego gatunku pokazały przeciwnowotworowe działanie tego biflawonoidu. Może on wywoływać apoptozę komórek linii ludzkiej białaczki HL-60, związanej z aktywacją kaspazy-3 oraz produkcją reaktywnych form tlenu [49].

Oprócz tego wykazano jego właściwości antymetastatyczne w komórkach kostniakomięsaka poprzez obniżenie sekrecji MMP-2 i MMP-9 (metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej) i zwiększenie ekspresji ich inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2 [50, 51]. Amentoflawon indukuje również apoptozę w ludzkich komórkach nowotworowych szyjki macicy i piersi MCF-7 [52, 53, 54] oraz obniża częstość przerzutów raka jamy ustnej [50, 51]. Ekstrakt z *S. labordei*, który oprócz amentoflawonu zawiera też robustaflawon, 4'-metylowy eter robustaflawonu i eriodiktiole, najlepiej z badanych ekstraktów hamuje aktywność komórek raka wątroby BEL-7402, raka jelita grubego HT-29 oraz raka szyjki macicy HeLa. Zadawalające wyniki uzyskuje się również w przypadku stosowania ekstraktów *S. tamariscina* i *S. uncinata*, a *S. moellendorffii* wykazuje umiarkowaną aktywność w stosunku do komórek Bel-7402 i HeLa [46]. Wyizolowany z *S. moellendorffii* amentoflawon, jak również robustaflawon i hinokiflawon, wykazują aktywność anty-HBV (wirus zapalenia wątroby typu B), a dalsze badania z wykorzystaniem robustaflawonu i hinokiflawonu potwierdziły ich cytotoksyczne działanie przeciwko liniom A549 (rak płuc), BGC-823 (rak żołądka) i BEL-7402 [55]. Amentoflawon działa również antybakteryjne, synergistycznie z antybiotykami. Wyizolowany z ekstraktu *S. tamariscina* amentoflawon był tak samo aktywny przeciwko gronkowcowi złocistemu (*Staphylococcus aureus*) jak ampicylina, cefotaksym i chloramfenikol [42]. Inne doniesienia wskazują dodatkowo na jego działanie przeciwko *Enterococcus faecium*, pałeczce okrężnicy (*Escherichia coli*) oraz pałeczce ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) [56]. Badania eksperymentalne z użyciem tego związku uzyskanego z metanolowego ekstraktu *S. sinensis* wykazały jego silną aktywność wobec wirusa RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) wywołującego infekcję górnych i dolnych dróg oddechowych [57]. W przypadku amentoflawonu mówi się też o jego działaniu przeciwzapalnym, antyoksydacyjnym i przeciwgrzybiczym [6]. Zawarty w *S. bryopteris* amentoflawon i hinokiflawon wykazują także aktywność przeciwpierwotniakową wobec szczepów *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* i *Leishmania donovani* [27, 58].

3.2.2. Ginkgetyna

Kolejny biflawonoid – ginkgetyna pozyskiwana z *S. moellendorffii* selektywnie hamuje wzrost niektórych komórek nowotworowych wywołując ich apoptozę. Stwierdzono zależne od dawki zahamowanie wzrostu komórek OVCAR-3 (ludzki gruczolakorak jajowodu), HeLa i FS-5 [24, 46, 59] oraz antymetastatyczne działanie ginkgetyny w komórkach raka płuc [46]. Związek ten wykazuje również aktywność neuroprotekcyjną wobec stresu cytotoksycznego, a w związku z tym potencjał w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych takich jak udar lub choroba Alzheimerera [32].

3.2.3. Robustaflawon

Robustaflawon i jego pochodne produkowane przez *S. delicatula* w testach cytotoksyczności przeprowadzonych na kilku ludzkich nowotworowych liniach komórkowych, znacząco hamowały wzrost komórek Raji i Calu-1 w sposób zależny od zastosowanego stężenia. Ekstrakt z tej rośliny działał również cytotoksycznie na

komórki raka P-388, HT-29 [11, 46] oraz w stosunku do komórek białaczki i chłoniaka [46, 60]. Natomiast związki te nie wpływały na aktywność takich linii komórek nowotworowych jak K562, HeLa, Vero i Wish [5, 59, 61]. Robustaflawon oraz amentoflawon wyizolowany z *S. sellowii* wykazały działanie przeciwko pasożytniczym pierwotniakom, *Leishmania amazonensis* i w przyszłości mogą być potencjalnie związkami wykorzystanymi w leczeniu leiszmaniozy skórnej [62].

3.2.4. Izokryptomeryna

Występująca u *S. tamariscina* izokryptomeryna wykazywała działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze [18]. Ten sam związek pozyskiwany z *S. willdenowii* był testowany na liniach komórkowych ludzkich nowotworów i hamował wzrost komórek linii włókniakomięsa HT-1080 i drobnokomórkowego nowotworu płuc Lu1 [61].

3.2.5. Hinokiflawon

Hinokiflawon otrzymywany z *S. bryopteris* działał przeciwko wirusowi HIV [25], ale znana jest również jego aktywność przeciwko wirusowi grypy typu A i B, zapalenia wątroby typu B, opryszczki, półpaśca i odry [32].

3.3. Selaginelliny

Jest to grupa polifenoli, odkryta do tej pory wyłącznie w rodzaju *Selaginella* [15]. Pierwszy związek należący do tej klasy – selaginellina został zidentyfikowany u *S. sinensis* [63]. Obecnie znanych jest już kilkadziesiąt dodatkowych związków będących pochodnymi selaginelliny, a z każdym rokiem identyfikowane są nowe [40, 41]. Farmakologiczne badania pokazują, że selaginellina ochrania zróżnicowane komórki neuronalne hodowane *in vitro* w różnych warunkach sprzyjających apoptozie, co czyni z niej nowy środek o działaniu neuroprotektynym [64]. Selaginelliny pozyskane z *S. tamariscina* wykazują aktywność przeciwoksydacyjną, co może wyjaśniać zastosowanie tej rośliny w celu poprawy krążenia krwi i innych dolegliwości związanych z układem krwionośnym [65]. Działanie przeciwnowotworowe selaginellin wyizolowanych z tego gatunku oceniono na trzech liniach ludzkich komórek nowotworowych – U251 (glejak), HeLa (rak szyjki macicy) i MCF-7 (rak piersi). Badania wykazały, że większość z tych związków działa hamująco na testowane linie komórek nowotworowych, z czego selaginellina-M ma najsilniejszy antyproliferacyjny efekt. Związek ten wpływa w podobny sposób również na komórki rakowe żołądka BGC-823 [66]. Najnowsze badania farmakologicznie czynnych substancji występujących w ekstraktach *S. tamariscina* wykazały dwa nowe oraz potwierdziły występowanie ośmiu już znanych w literaturze związków należących do grupy selaginellin. Większość z nich, a szczególnie nowo odkryta selagintamarlina A, dowiodły swojej aktywności przeciwnowotworowej wobec linii komórkowych MGC-803 (rak żołądka), HepG2 (rak wątroby), A549 (rak płuc), NCI-H460 (niedrobnokomórkowy rak płuc) i SKOV-3 (rak jajnika). Substancja ta jest również podwójnym inhibitorem, gdyż po pierwsze hamuje aktywność fosfodiesterazy-4 (PDE4D), tj. enzymu, którego wzrost obserwuje się

w większości stanów zapalnych i reakcji odpornościowych a po drugie hamuje polimeryzację tubuliny. Zaskakujący jest fakt, że miejsce wiązania selagintamarliny A jest podobne do miejsca wiązania kolchicyny, dobrze znanego inhibitora polimeryzacji tubuliny [40]. Może być to związane z antyproliferacyjnym działaniem selaginellin. Karmakar i Lee [67] zaproponowali syntezę dwóch związków – selaginpulviliny C i D (ang. *selaginpulvilin C, D*) izolowanych z etanolowego ekstraktu *S. pulvinata*, stanowiących inhibitor PDE4D. Już rok później Sowden i Sherburn [68] przedstawili kompletną syntezę selaginpulviliny D, skracając czas jej pozyskiwania z jedenastu do czterech etapów. Umożliwiło to szybką syntezę znacznych ilości tego naturalnego produktu, trudnych do pozyskania z rośliny. Testy cytotoksyczności prowadzone z udziałem selaginellin pozyskanych z ekstraktu *S. pulvinata* wobec linii ludzkich komórek nowotworowych BGC-823 (rak żołądka), SMMC-7721 (rak wątrobowo-komórkowy) i A549 (rak płuc) wykazały umiarkowaną aktywność tylko trzech (selaginellina, selaginellina O i Q) z dziewięciu badanych związków przeciwko BGC-823. Dodatkowo sprawdzono również działanie przeciwrzybicze tych związków z użyciem *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* i *Trichophyton mentagrophytes*. Wszystkie testowane selaginelliny (selaginellina, selaginellina A, B, D, O, P, R, Q, selaginisquinolina A) odznaczały się dobrym działaniem przeciwrzybiczym na wymienione gatunki grzybów [41]. Nguyen i in. [39] poszukując nowych związków przeciwcukrzycowych naśladujących działanie insuliny sprawdzili właściwości selaginellin wyizolowanych z ekstraktu *S. tamariscina*. Wykazały one silne działanie stymulujące pobieranie glukozy przez adipocyty (komórki tłuszczowe) linii mysiej 3T3-L1. Przeprowadzone badania wskazały, że selaginelliny mogą być związkami, na bazie których w przyszłości mogą zostać opracowane nowe leki na cukrzycę typu 2.

3.4. Inne fenole

Badania *S. uncinata* wykazały dość niską zawartość amentoflawonu, niepokrywającą się z jego właściwościami przeciwnowotworowymi. Wcześniejsze badania ekstraktu tej rośliny wskazują na inne związki fenolowe odgrywające tu istotną rolę, a mianowicie uncinozyd A i B. Oprócz aktywności przeciwnowotworowej opisywane jest ich działanie przeciwwirusowe przeciwko wirusowi RSV oraz wirusowi paragrypy typu 3 (PIV3) [69].

3.5. Saponiny

Saponiny stanowią grupę związków o charakterze glikozydów. Zostały zidentyfikowane u takich gatunków *Selaginella* jak *S. ornata*, *S. plana*, *S. opaca*, *S. remotifolia*, *S. willdenowii*, *S. subalpina*, *S. aristata*, *S. involvens* i *S. intermedia*. Saponiny tworzą nierozpuszczalne kompleksy z cholesterolem i w związku z tym mogą kontrolować poziom cholesterolu w diecie człowieka. Dodatkowo wykazują działanie przeciwrzybicze i właściwości antybakteryjne wykorzystywane często w produktach kosmetycznych [14].

3.6. Taniny

Taniny będące pochodnymi fenoli zostały opisane u *S. ornata*, *S. remotifolia*, *S. aristata*, *S. involvens*, *S. intermedia*, *S. inaequalifolia*, *S. tenera*. Mogą być używane w medycynie jako związki przeciwbólowe, hemostatyczne czy anty-hemoroidalne [14]. Wykazują również działanie antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne i mogą być stosowane w leczeniu grzybic wywołanych przez *Candida*. Ekstrakt pozyskany z *S. inaequalifolia* ma potencjał w hamowaniu wzrostu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* [70].

3.7. Alkaloidy i związki steroidowe

Alkaloidy stanowią grupę zasadowych związków organicznych występujących naturalnie, głównie w roślinach [15]. W przypadku rodzaju *Selaginella* zostały zidentyfikowane u *S. ornata*, *S. plana*, *S. opaca*, *S. remotifolia*, *S. willdenowii*, *S. subalpina*, *S. aristata*, *S. involvens*, *S. intermedia*. Alkaloidy widliczek mają działanie moczopędne, przeciwskurczowe, przeciwzapalne i przeciwbólowe [14].

Związki steroidowe zostały opisane u tych samych gatunków, co alkaloidy. Ze względu na różne klasy tych związków będą się one różnić pełnionymi funkcjami i tak na przykład steroidy anaboliczne zwiększają masę mięśniową, natomiast steroidy przeciwzapalne mogą zmniejszyć obrzęk, ból i inne objawy zapalne [14]. Sterole izolowane z *S. tamariscina* wykazują także hamujący wpływ na wzrost komórek ludzkiej białaczki promielocytarnej HL-60 [71].

Tabela 1. Związki biologicznie czynne występujące u *Selaginella* i ich działanie

Związki bioaktywne	Gatunek	Działanie lecznicze	Źródło
Biflawonoidy (biflavonoids)			
amentoflawon (amentoflavone)	<i>S. braunii</i> , <i>S. bryopteris</i> , <i>S. chrysocaulos</i> , <i>S. convoluta</i> , <i>S. davidii</i> , <i>S. delicatula</i> , <i>S. denticulata</i> , <i>S. doederleinii</i> , <i>S. heterostachys</i> , <i>S. involvens</i> , <i>S. kraussiana</i> , <i>S. labordei</i> , <i>S. nipponica</i> , <i>S. nothohybrida</i> , <i>S. moellendorffii</i> , <i>S. pachystachys</i> ,	przeciwnowotworowe, antybakteryjne, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwgrzybicze, przeciwpierwotniakowe, przeciwwirusowe, przeciwalergiczne, terapeutyczne działanie na centralny układ nerwowy i układ krążenia	[5, 15, 32, 54, 56, 57, 58, 61, 62]

	<p><i>S. pulvinata</i>, <i>S. remotifolia</i>, <i>S. rupestris</i>, <i>S. sanquinolenta</i>, <i>S. selaginoides</i>, <i>S. sellowii</i>, <i>S. sinensis</i>, <i>S. stauntoniana</i>, <i>S. tamariscina</i>, <i>S. uncinata</i>, <i>S. willdenowii</i></p>		
robustaflawon (robustaflavone)	<p><i>S. delicatula</i>, <i>S. denticulata</i>, <i>S. doederleinii</i>, <i>S. labordei</i>, <i>S. lepidophylla</i>, <i>S. moellendorffii</i>, <i>S. selaginoides</i>, <i>S. sellowii</i>, <i>S. sinensis</i>, <i>S. willdenowii</i></p>	<p>przeciwnowotworowe, przeciwpierwotniakowe, przeciwwirusowe</p>	<p>[5, 15, 32, 61, 62]</p>
ginkgetyna (ginkgetin)	<p><i>S. doederleinii</i>, <i>S. moellendorffii</i>, <i>S. remotifolia</i>, <i>S. sinensis</i>, <i>S. stauntoniana</i></p>	<p>przeciwnowotworowe, neuroprotekcyjne, antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwpierwotniakowe</p>	<p>[5, 15, 24, 32, 59]</p>
hinokiflawon (hinokiflavone)	<p><i>S. bryopteris</i>, <i>S. denticulata</i>, <i>S. kraussiana</i>, <i>S. moellendorffii</i>, <i>S. selaginoides</i>, <i>S. uncinata</i></p>	<p>przeciwnowotworowe, przeciwpierwotniakowe, przeciwwirusowe, antyoksydacyjne</p>	<p>[5, 15, 25, 32, 58]</p>
izokryptomeryna (isocryptomerin)	<p><i>S. denticulata</i>, <i>S. tamariscina</i>, <i>S. willdenowii</i></p>	<p>antybakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, immunosupresyjne</p>	<p>[5, 15, 18, 32, 61]</p>
kajaflawon (kayaflavone)	<p><i>S. moellendorffii</i></p>	<p>przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne</p>	<p>[5, 15, 32]</p>
ochnaflawon	<p><i>S. labordei</i></p>	<p>przeciwnowotworowe,</p>	<p>[5, 15,</p>

(ochnaflawone)		antyoksydacyjne	32]
podokarpusflawon A (podocarpusflavone A)	<i>S. moellendorffii</i>	przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne	[5, 15, 32]
2',8''-biapigenina (2',8''-biapigenin)	<i>S. tamariscina</i>	przeciwnowotworowe, przeciwzapalne	[5, 15, 32]
heveaflawon (heveaflavone)	<i>S. doederleinii</i> , <i>S. lepidophylla</i>	przeciwnowotworowe	[5, 15, 29, 32]
sumaflawon (sumaflavone)	<i>S. tamariscina</i>	przeciwzapalne	[5, 15, 32]
taiwaniaflawon (taiwaniaflavone)	<i>S. tamariscina</i>	przeciwzapalne	[5, 15, 32]
Selaginelliny (selaginellins)	<i>S. pulvinata</i> , <i>S. sinensis</i> , <i>S. tamariscina</i>	antyoksydacyjne, neuroprotekcyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze	[15, 39, 40, 41, 64, 65, 67, 68, 72]
Inne fenole			
uncinozyd A, B (uncinoside A, B)	<i>S. uncinata</i>	przeciwnowotworowe, przeciwvirusowe	[15, 69]
Saponiny (saponins)	<i>S. aristata</i> , <i>S. bryopteris</i> , <i>S. corymbosa</i> , <i>S. inaequalifolia</i> , <i>S. intermedia</i> , <i>S. involvens</i> , <i>S. myosurus</i> , <i>S. opaca</i> , <i>S. ornata</i> , <i>S. plana</i> , <i>S. remotifolia</i> , <i>S. subalpina</i> , <i>S. tenera</i> , <i>S. willdenowii</i>	przeciwgrzybicze, antybakteryjne	[14, 15, 25, 28, 70, 73, 75]

Taniny (tannins)	<i>S. aristata</i> , <i>S. bryopteris</i> , <i>S. inaequalifolia</i> , <i>S. intermedia</i> , <i>S. involvens</i> , <i>S. myosurus</i> , <i>S. ornata</i> , <i>S. remotifolia</i> , <i>S. tenera</i>	przeciwbólowe, hemostatyczne, anty- hemoroidalne, antyoksydacyjne, antybakteryjne, przeciwgrzybicze	[14, 15, 25, 28, 70, 73, 75]
Alkaloidy (alkaloids)	<i>S. aristata</i> , <i>S. bryopteris</i> , <i>S. doederleinii</i> , <i>S. intermedia</i> , <i>S. involvens</i> , <i>S. lepidophylla</i> , <i>S. moellendorffii</i> , <i>S. myosurus</i> , <i>S. opaca</i> , <i>S. ornata</i> , <i>S. plana</i> , <i>S. remotifolia</i> , <i>S. subalpina</i> , <i>S. tamariscina</i> , <i>S. tenera</i> , <i>S. willdenowii</i>	moczopędne, przeciwskurczowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe, antybakteryjne	[5, 14, 15, 25, 28, 73, 74, 75, 76]
Związki steroidowe (steroids)	<i>S. aristata</i> , <i>S. bryopteris</i> , <i>S. convoluta</i> , <i>S. corymbosa</i> , <i>S. delicatula</i> , <i>S. doederleinii</i> , <i>S. inaequalifolia</i> , <i>S. intermedia</i> , <i>S. involvens</i> , <i>S. moellendorffii</i> , <i>S. myosurus</i> , <i>S. opaca</i> , <i>S. ornata</i> , <i>S. plana</i> ,	przeciwnowotworowe, przeciwzapalne	[5, 14, 15, 25, 28, 70, 71, 73, 75]

S. pulvinata,
S. remotifolia,
S. subalpina,
S. tamariscina,
S. tenera,
S. willdenowii

Źródło: Opracowanie własne

4. Wykorzystanie komercyjne

Obecne wykorzystanie rodzaju *Selaginella* jest dość ograniczone w porównaniu do liczby występujących gatunków, jednak ze względu na ich właściwości lecznicze i potencjał przy opracowywaniu nowych leków w przyszłości może to ulec zmianie [3, 11, 42]. W Azji Południowo-Wschodniej gatunki widliczki są eksportowane i importowane jako leki w celu samodzielnego zastosowania lub w postaci mieszanki z innymi ziołami. W Indiach sprzedawany jest magiczny gatunek na wszelkie choroby - *S. bryopteris* pod różnymi nazwami handlowymi jak np. „Sanjeevani”, „Lakshanam Booti”, „Mrit-sanjeevani”, „Pathar Chatta” [25]. W Indonezji zarówno gatunki rodzime jak *S. plana* i *S. willdenowii* oraz importowane, zwłaszcza *S. tamariscina* i *S. doe-derleinii*, są sprzedawane w postaci suszonej lub sproszkowanej. W Bangkoku (Tajlandia) sprowadzany jest gatunek *S. tamariscina* i powszechnie sprzedawany w sklepach z produktami z dziedziny medycyny tradycyjnej. W Wenezueli natomiast sprzedawany jest gatunek *S. pallescens*, który spożywany w postaci wywaru pobudza przepływ krwi w okolicy miednicy i macicy oraz działa moczopędnie [3, 7]. W Niemczech stosowana jest herbata, która wpływa pozytywnie na urodę, wzmacniając kruche i łamliwe paznokcie, a jest ona przygotowywana z mieszanki kilku gatunków roślin, w tym *S. tamariscina* eksportowanej z Chin. Dostępne są również na rynku światowym, w tym także w Polsce, produkty w formie kapsułek zawierające ekstrakt z *S. tamariscina*, gdzie głównym związkiem bioaktywnym jest amentoflawon. Produkt ten jest promowany jako suplement diety o szerokim zastosowaniu, np. może być zażywany przy intensywnym treningu wspomagając m.in. zachowanie prawidłowej masy ciała czy wzmacniając układ krążenia. Dostępny jest również w sprzedaży wodny ekstrakt z *S. lepidophylla* pod nazwą „Jericine”, który jest zalecany jako składnik kremów przeciwzmarszczkowych, regenerujących i nawilżających. Ekstrakt ten działa przeciwko starzeniu się komórek, ogranicza ich odwodnienie oraz zwalcza wysuszenie skóry [42].

Oprócz leczniczego zastosowania gatunki widliczki są również wykorzystywane jako rośliny ozdobne w ogrodnictwie (*S. kraussiana*, *S. martensii*), jako pożywienie (*S. plana*, *S. willdenowii*) czy w rękodzielnictwie [3, 7].

5. Podsumowanie

Wzrost ilości chorób w obecnych czasach skutkuje poszukiwaniem nowych, alternatywnych dróg pozyskiwania związków biologicznie czynnych. Coraz większą uwagę przywiązuje się do roślin leczniczych wykorzystywanych od tysięcy lat w medycynie tradycyjnej [11, 14]. Do takich roślin należą przedstawiciele rodziny *Selaginellaceae*, szeroko rozpowszechnionej na całym świecie. Badania prowadzone na gatunkach z rodzaju *Selaginella* wykazały, że zawierają one ok. 130 naturalnych związków, z których część może stać się w przyszłości aktywnym składnikiem suplementów diety, nutraceutyków, czy nowych leków [15, 77]. Na szczególną uwagę zasługują biflawonoidy, których to rodzaj *Selaginella* jest bogatym źródłem. Wykazują one właściwości przeciwnowotworowe [5, 24], które są dość istotne ze względu na fakt, że rak jest obecnie jedną z głównych chorób cywilizacyjnych zarówno w rozwiniętych jak i rozwijających się krajach na całym świecie [2]. Pomimo naukowego i medycznego znaczenia rodzaju *Selaginella*, jest to jedna z najsłabiej poznanych grup roślin naczyniowych [9]. Dopiero niedawno został zsekwencjonowany genom jednego z gatunków – *S. moellendorffii*, a ma to istotne znaczenie dla rozwoju badań związanych m.in. z produkcją metabolitów wtórnych wykorzystywanych w biotechnologii i przemyśle farmaceutycznym [78]. Przyszłe badania powinny się skupić na wyizolowaniu związków biologicznie czynnych z gatunków *Selaginella*, przetestowaniu ich bioaktywności i próbie wykorzystania tych produktów w terapii różnych schorzeń [7, 42, 77]. Poznanie substancji czynnych zawartych w roślinach leczniczych jest niezbędne dla rozwoju medycyny i tworzenia nowoczesnych leków pochodzenia roślinnego, które mogą wykazywać zwiększoną kompatybilność z organizmem ludzkim, zmniejszając tym samym efekty uboczne zażywanych środków [2, 14].

Podziękowania

Dziękuję dr hab. Edycie Goli za merytoryczną dyskusję oraz cenne uwagi pomocne w przygotowaniu niniejszego artykułu.

Projekt sfinansowany przez Uniwersytet Wrocławski z grantu nr 1068/S/IBE/17.

Literatura

1. Talukdar A. D., Tarafdar R. G., Choudhury M. D., Nath D., Choudhury S. *A review on pteridophyte antioxidants and their potential role in discovery of new drugs*, Assam University Journal of Science and Technology, 7 (2011), s. 151-155.
2. Rani P., Kainsa S., Kumar P. *Medicinal plants of Asian origin having anticancer potential: short review*, Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 2 (2012), s. 1-7.
3. Setyawan A. D. *Traditionally utilization of Selaginella; field research and literature review*, Bioscience, 1 (2009), s. 146-158.
4. Banks J. A. *Selaginella and 400 million years of separation*, Annual review of plant biology, 60 (2009), s. 223-238.

5. da Silva Almeida J. R. G., de Sá P. G. S., de Oliveira Macedo L. A. R., de Siqueira Filho J. A., de Oliveira V. R., Barbosa Filho J. M. *Phytochemistry of the genus Selaginella (Selaginellaceae)*, Journal of Medicinal Plants Research, 7 (2013), s. 1858-1868.
6. Weststrand S., Korall P. *A subgeneric classification of Selaginella (Selaginellaceae)*, American journal of botany, 103 (2016), s. 2160-2169.
7. Setyawan A. D. *Recent status of Selaginella (Selaginellaceae) research in Nusantara*, Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 12 (2011), s. 112-124.
8. Gu W., Song J., Cao Y., Sun Q., Yao H., Wu Q., Chao J., Zhou J., Xue W., Duan J. *Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in Pteridophyta*, PLoS One, 8 (2013), e67818.
9. Zhou X. M., Zhang L. B. *A classification of Selaginella (Selaginellaceae) based on molecular (chloroplast and nuclear), macromorphological, and spore features*, Taxon, 64 (2015), s. 1117-1140.
10. Otręba P., Gola, E. M. *Specific intercalary growth of rhizophores and roots in Selaginella kraussiana (Selaginellaceae) is related to unique dichotomous branching*, Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 206 (2011), s. 227-232.
11. Chen K., Plumb G. W., Bennett R. N., Bao, Y. *Antioxidant activities of extracts from five anti-viral medicinal plants*, Journal of ethnopharmacology, 96 (2005), s. 201-205.
12. Yin M. H., Kang D. G., Choi D. H., Kwon T. O., Lee H. S. *Screening of vasorelaxant activity of some medicinal plants used in Oriental medicines*, Journal of ethnopharmacology, 99 (2005), s. 113-117.
13. Sah N. K., Singh S. N. P., Sahdev S., Banerji S., Jha V., Khan Z., Hasnain S. E. *Indian herb 'Sanjeevani'(Selaginella bryopteris) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultra violet and oxidative stress*, Journal of biosciences, 30 (2005), s. 499-505.
14. Chikmawati T., Setyawan, A. D. *Phytochemical Composition of Selaginella spp. from Java Island Indonesia*, Makara Journal of Science, 16 (2012), s. 129-133.
15. Weng J. K., Noel J. P. *Chemodiversity in Selaginella: a reference system for parallel and convergent metabolic evolution in terrestrial plants*, Frontiers in plant science, 4 (119) (2013).
16. Yang S. F., Chu S. C., Liu S. J., Chen Y. C., Chang Y. Z., Hsieh Y. S. *Antimetastatic activities of Selaginella tamariscina (Beauv.) on lung cancer cells in vitro and in vivo*, Journal of ethnopharmacology, 110 (2007), s. 483-489.
17. Zhang Y. X., Li Q. Y., Yan L. L., Shi, Y. *Structural characterization and identification of biflavones in Selaginella tamariscina by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 25 (2011), s. 2173-2186.
18. Lee J., Choi Y., Woo E. R., Lee D. G. *Isocryptomerin, a novel membrane-active antifungal compound from Selaginella tamariscina*, Biochemical and biophysical research communications, 379 (2009), s. 676-680.
19. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F. *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*, Life sciences, 65 (1999), s. 337-353.
20. Yao H., Chen B., Zhang Y., Ou H., Li Y., Li S., Shi P., Lin X. *Analysis of the Total Biflavonoids Extract from Selaginella doederleinii by HPLC-QTOF-MS and Its In Vitro and In Vivo Anticancer Effects*, Molecules, 22 (325) (2017).
21. Lu Y. P., Chen Y. G., Wen J. *A new bioflavone Selaginella doederleinii*, Acta Botanica Yunnanica, 26 (2003), s. 226-228.

22. Wang G., Yao S., Zhang X. X., Song, H. Rapid screening and structural characterization of antioxidants from the extract of *Selaginella doederleinii* Hieron with DPPH-UPLC-Q-TOF/MS metod, *International journal of analytical chemistry*, 2015 (2015), 849769.
23. Su Y., Sun C. M., Chuang H. H., Chang, P. T. *Studies on the cytotoxic mechanisms of ginkgetin in a human ovarian adenocarcinoma cell line*, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 362 (2000), s. 82-90.
24. Shi S., Zhou H., Zhang Y., Huang K. Hyphenated HSCCC-DPPH for rapid preparative isolation and screening of antioxidants from *Selaginella moellendorffii*, *Chromatographia*, 68 (2008), s. 173-178.
25. Singh S., Singh R. *A Review on Endemic Indian Resurrecting Herb Selaginella bryopteris (L.) Bak. 'Sanjeevani'*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (2015), s. 50-56.
26. Pandey S., Shukla A., Pandey S., Pandey, A. An overview of resurrecting herb 'Sanjeevani' (*Selaginella bryopteris*) and its pharmacological and ethnomedicinal uses, *The Pharma Innovation Journal*, 6 (2017), s. 11-14.
27. Agarwal S. S., Singh V. K. Immunomodulators: a review of studies on Indian medicinal plants and synthetic peptides; part 1. medicinal plants, *Pinsa* 65 (1999), s. 179-204.
28. Peters D. E., Omeodu S. I., Jaja Q. O. *Effect of Aqueous Whole Plant Extract of Selaginella Myosurus on Liver Markers and Haematological Indices of Albino Rats*, *International Journal of Biological Sciences and Applications*, 2 (2015), s. 97-105.
29. Lin R. C., Skaltsounis A. L., Seguin E., Tillequin F., Koch M. *Phenolic constituents of Selaginella doederleinii*, *Planta medica*, 60 (1994), s. 168-170.
30. Chai T. T., Wong F. C. *Antioxidant properties of aqueous extracts of Selaginella willdenowii*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (2012), s. 1289-1296.
31. Aneesh N., Mujeera F., Florida T. *DNA Barcoding of medicinal pteridophyte Selaginella delicatula from Western Ghats of Kerala*, *International Journal of Current Research*, 9 (2017), s. 50887-50890.
32. Setyawan A. D. Review: Natural products from genus *Selaginella* (Selaginellaceae), *Nusantara Bioscience*, 3 (2011), s. 44-58.
33. Bourdy G., Walter A. *Maternity and medicinal plants in Vanuatu I. the cycle of reproduction*, *Journal of ethnopharmacology*, 37 (1992), s. 179-196.
34. Mamedov N. Adaptogenic, geriatric, stimulant and antidepressant plants of Russian Far East, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4 (2005), s. 71-75.
35. Robles-Zepeda R. E., Velázquez-Contreras C. A., Garibay-Escobar A., Gálvez-Ruiz J. C., Ruiz-Bustos E. *Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against Helicobacter pylori*, *Journal of Medicinal Food*, 14 (2011), s. 1280-1283.
36. Otero R., Núñez V., Barona J., Fonnegra R., Jiménez S. L., Osorio R. G., Saldarriaga M., Diaz A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom, *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (2000), s. 233-241.
37. dos Santos Reinaldo R. C. P., Santiago A. C. P., Medeiros P. M., Albuquerque U. P. *Do ferns and lycophytes function as medicinal plants? A study of their low representation in traditional pharmacopoeias*, *Journal of ethnopharmacology*, 175 (2015), s. 39-47.
38. de Sá P. G. S., Nunes X. P., de Lima J. T., Fontana A. P., de Souza Siqueira J., Quintans-Júnior L. J., Damasceno P. K., Branco C. R., Branco A., Almeida J. R. *Antinociceptive effect of ethanolic extract of Selaginella convoluta in mice*, *BMC complementary and alternative medicine*, 12 (187) (2012).

39. Nguyen P. H., Zhao B. T., Ali M. Y., Choi J. S., Rhyu D. Y., Min B. S., Woo M. H. *Insulin-mimetic selaginellins from Selaginella tamariscina with protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity*, Journal of natural products, 78 (2015), s. 34-42.
40. Yao W. N., Huang R. Z., Hua J., Zhang B., Wang C. G., Liang D., Wang H. S. *Selagintamarlin A: A Selaginellin Analogue Possessing a 1 H-2-Benzopyran Core from Selaginella tamariscina*, ACS Omega, 2 (2017), s. 2178-2183.
41. Cao Y., Yao Y., Huang X. J., Oberer L., Wagner T., Guo J. M., Gu W., Liu W. D., Lv G. X., Shen J. N., Duan J. A. *Four new selaginellin derivatives from Selaginella pulvinata: mechanism of racemization process in selaginellins with quinone methide*, Tetrahedron, 71 (2015), s. 1581-1587.
42. Gechev T. S., Hille J., Woerdenbag H. J., Benina M., Mehterov N., Toneva V., Fernie A. R., Mueller-Roeber B. *Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications*, Biotechnology advances, 32 (2014), s. 1091-1101.
43. Joo S. S., Jang S. K., Kim S. G., Choi J. S., Hwang K. W., Lee D. I. *Anti-acne activity of Selaginella involvens extract and its non-antibiotic antimicrobial potential on Propionibacterium acnes*, Phytotherapy research, 22 (2008), s. 335-339.
44. Ravichandiran V., Patil Vishal S. *Antitubercular drug and antimalarial drug induced hepatotoxicity and its protection by Selaginella corymbosa leaves extract*, Journal of Bio Innovation, 4 (2015), s. 152-157.
45. Krauze-Baranowska M. *Aktywność farmakologiczna biflawonoidów. Część I*, Postępy Fitoterapii, 1 (2003), s. 11-15.
46. Li J., Lei X., Chen K. L. *Comparison of cytotoxic activities of extracts from Selaginella species*, Pharmacognosy magazine, 10 (2014), s. 529-535.
47. Yang J. W., Pokharel Y. R., Kim M. R., Woo E. R., Choi H. K., Kang K. W. *Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumafavone isolated from Selaginella tamariscina*, Journal of Ethnopharmacology, 105 (2006), s. 107-113.
48. Long W., Ding Q., Chen Y., Hu J., Li L., Zhang F., Wan D. *Quantitative Determination and Variation Tendencies of Flavonoids in Five Selaginella Plant Drugs*, Pharmacognosy Journal, 7 (2015), s. 378-382.
49. Ahn S. H., Mun Y. J., Lee S. W., Kwak S., Choi M. K., Baik S. K., Kim Y. M., Woo W. H. *Selaginella tamariscina induces apoptosis via a caspase-3-mediated mechanism in human promyelocytic leukemia cells*, Journal of medicinal food, 9 (2006), s. 138-144.
50. Yang J. S., Lin C. W., Hsin C. H., Hsieh M. J., Chang, Y. C. *Selaginella tamariscina attenuates metastasis via Akt pathways in oral cancer cells*, PLoS One, 8 (2013), e68035.
51. Yang J. S., Lin C. W., Hsieh Y. S., Cheng H. L., Lue K. H., Yang S. F., Lu K. H. *Selaginella tamariscina (Beauv.) possesses antimetastatic effects on human osteosarcoma cells by decreasing MMP-2 and MMP-9 secretions via p38 and Akt signaling pathways*, Food and chemical toxicology, 59 (2013), s. 801-807.
52. Lee S., Kim H., Kang J. W., Kim J. H., Lee D. H., Kim M. S., Hong J., Yoon D. Y. *The biflavonoid amentoflavone induces apoptosis via suppressing E7 expression, cell cycle arrest at sub-G1 phase, and mitochondria-emanated intrinsic pathways in human cervical cancer cells*, Journal of medicinal food, 14 (2011), s. 808-816.
53. Pei J. S., Liu C. C., Hsu Y. N., Lin L. L., Wang S. C., Chung J. G., Bau D. T., Lin S. S. *Amentoflavone induces cell-cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells via mitochondria-dependent pathway*, In Vivo, 26 (2012), s. 963-970.

54. Yu S., Yan H., Zhang L., Shan M., Chen P., Ding A., Li S. F. Y. *A Review on the Phytochemistry, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Amentoflavone, a Naturally-Occurring Biflavonoid*, *Molecules*, 22 (299) (2017).
55. Cao Y., Tan N. H., Chen J. J., Zeng G. Z., Ma Y. B., Wu Y. P., Yang J., Lu L. F., Wang, Q. *Bioactive flavones and biflavones from Selaginella moellendorffii Hieron*, *Fitoterapia*, 81 (2010), s. 253-258.
56. Hwang J. H., Choi H., Woo E. R., Lee D. G. *Antibacterial Effect of Amentoflavone and Its Synergistic Effect with Antibiotics*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (2013), s. 953-958.
57. Ma S. C., But P. P. H., Ooi V. E. C., He Y. H., Lee S. H. S., Lee S. F., Lin R. C. *Antiviral amentoflavone from Selaginella sinensis*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24 (2001), s. 311-312.
58. Kunert O., Swamy R. C., Kaiser M., Presser A., Buzzi S., Rao A. A., Schühly W. *Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian Selaginella bryopteris*, *Phytochemistry letters*, 1 (2008), s. 171-174.
59. Sun C. M., Syu W. J., Huang Y. T., Chen C. C., Ou, J. C. *Selective cytotoxicity of ginkgetin from Selaginella moellendorffii*, *Journal of natural products*, 60 (1997), s. 382-384.
60. Lin L. C., Kuo Y. C., Chou C. J. *Cytotoxic biflavonoids from Selaginella delicatula*, *Journal of Natural Products*, 63 (2000), s. 627-630.
61. Silva G. L., Chai H., Gupta M. P., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Pezzuto J. M., Beecher C.W., Kinghorn, A. D. *Cytotoxic biflavonoids from Selaginella willdenowii*, *Phytochemistry*, 40 (1995), s. 129-134.
62. Rizk Y. S., Fischer A., Cunha M. D. C., Rodrigues P. O., Marques M. C. S., Matos M. D. F. C., Kadri M. C. T., Carollo C. A., Arruda, C. C. P. D. *In vitro activity of the hydroethanolic extract and biflavonoids isolated from Selaginella sellowii on Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109 (2014), s. 1050-1056.
63. Zhang L. P., Liang Y. M., Wei X. C., Cheng, D. L. *A new unusual natural pigment from Selaginella sinensis and its noticeable physicochemical properties*, *The Journal of organic chemistry*, 72 (2007), s. 3921-3924.
64. Zhang W. F., Xu Y. Y., Xu K. P., Wu W. H., Tan G. S., Li Y. J., Hu C. P. *Inhibitory effect of selaginellin on high glucose-induced apoptosis in differentiated PC12 cells: role of NADPH oxidase and LOX-1*, *European journal of pharmacology*, 694 (2012), s. 60-68.
65. Yang C., Shao Y., Li K., Xia W. *Bioactive selaginellins from Selaginella tamariscina (Beauv.) Spring*, *Beilstein journal of organic chemistry*, 8 (2012), s. 1884-1888.
66. Xu J. P. *Cancer Inhibitors from Chinese Natural Medicines*, CRC Press, 2016.
67. Karmakar R., Lee D. *Total Synthesis of Selaginpulvinin C and D Relying on in Situ Formation of Arynes and Their Hydrogenation*, *Organic letters*, 18 (2016), s. 6105-6107.
68. Sowden M. J., Sherburn M. S. *Four-Step Total Synthesis of Selaginpulvinin D*, *Organic letters*, 19 (2017), s. 636-637.
69. Ma L. Y., Ma S. C., Wei F., Lin R. C., But P. P. H., Lee S. H. S., Lee S. F. *Uncinoside A and B, two new antiviral chromone glycosides from Selaginella uncinata*, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 51 (2003), s. 1264-1267.
70. Irudayaraj V., Janaky M., Johnson M., Selvan, N. *Preliminary phytochemical and antimicrobial studies on a spike-moss Selaginella inaequalifolia (hook. & grev.) Spring*, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3 (2010), s. 957-960.

71. Gao L. L., Yin S. L., Li Z. L., Sha Y., Pei Y. H., Shi G., Jing Y. K., Hua H. M. *Three Novel Sterols Isolated from Selaginella tamariscina with Antiproliferative Activity in Leukemia Cells*, *Planta Medica*, 73 (2007), s. 1112-1115.
72. Cheng X. L., Ma S. C., Yu J. D., Yang S. Y., Xiao X. Y., Hu J. Y., Lu Y., Shaw P. C., But P. P. H., Lin R. C. *Selaginellin A and B, two novel natural pigments isolated from Selaginella tamariscina*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56 (2008), s. 982-984.
73. Irene P. J., Syed I. T., Irudayaraj V., Johnson M. *Pharmacognostical studies on anti-cancer spike moss Selaginella involvens (SW.) Spring*, *International Journal of Drug Formulation and Research*, 2 (2011), s. 195-211.
74. Meléndez-Camargo M. E., Contreras-León I., Silva-Torres, R. *Diuretic effect of alkaloids fraction extracted from Selaginella lepidophylla (Hook. et Grev.) Spring*, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13 (2014), s. 92-99.
75. Suganya S., Irudayaraj V., Johnson M. *Pharmacognostical studies on an endemic Spike-Moss Selaginella tenera (Hook & Grev) Spring from the Western Ghats, South India*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3 (2011), s. 721-31.
76. Wang Y. H., Long C. L., Yang F. M., Wang X., Sun Q. Y., Wang H. S., Shi Y. N., Tang G. H. *Pyrrolidinoindoline alkaloids from Selaginella moellendorffii*, *Journal of natural products*, 72 (2009), s. 1151-1154.
77. Sivaraman A., Johnson M., Parimelazhagan T., Irudayaraj V. *Evaluation of antioxidant potential of ethanolic extracts of selected species of Selaginella*, 4 (2013), s. 238-244.
78. Banks J. A., Nishiyama T., Hasebe M., Bowman J., Gribskov M., dePamphilis C., Albert V., Grigoriev I. *The compact Selaginella genome identifies changes in gene content associated with the evolution of vascular plants*, *Science*, 332 (6032) (2011), s. 960-963 .

Wykorzystanie związków biologicznie czynnych pozyskiwanych z rodzaju *Selaginella* w medycynie

Streszczenie

Selaginella, widliczka, jest jedynym rodzajem w rodzinie *Selaginellaceae* (gromada *Lycopodiophyta*), do którego należy ok. 750 gatunków. Gatunki *Selaginella* występują na wszystkich kontynentach poza Antarktydą, jednak ich najwyższą bioróżnorodność stwierdzono w rejonach Azji, Ameryki oraz Południowej Afryki o klimacie tropikalnym i subtropikalnym. Ze względu na tak szeroką dostępność i niezwykle właściwości lecznicze wiele gatunków widliczek znalazło zastosowanie w medycynie tradycyjnej tamtych rejonów. Odpowiednio przetworzone rośliny są stosowane w rozmaitych przypadłościach, jak kaszel, ból gardła, żółtaczkę, choroby żołądka i wątroby, zaburzenia menstruacyjne czy nawet w leczeniu ran i nowotworów. Tak szerokie zastosowanie widliczek w medycynie ludowej zwróciło uwagę na ich potencjał i możliwość wykorzystania ze względu na substancje biologicznie czynne produkowane przez *Selaginella*. Współczesne badania pokazują, że gatunki *Selaginella* są źródłem różnych związków bioaktywnych, z których część jest unikatowa. Naturalnymi produktami występującymi u *Selaginella* są m.in. flawonoidy, alkaloidy, terpenoidy oraz występujące wyłącznie u tego rodzaju selaginelliny. Jedną z cenniejszych grup związków, intensywnie badanych w ostatnich latach a pozyskiwanych z *Selaginella*, są biflawonoidy stanowiące dimeryczną formę flawonoidów. Są one obecnie testowane na liniach ludzkich komórek nowotworowych jako substancje wykazujące potencjał w wykorzystaniu ich w przyszłości do opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych.

W pracy przedstawiono wykorzystanie gatunków z rodzaju *Selaginella* w medycynie tradycyjnej kilku najbogatszych w tą roślinę obszarów. Następnie zostały opisane wybrane substancje biologicznie czynne produkowane przez widliczki, które są wykorzystywane we współczesnych badaniach związanych z rozwojem nowych terapii lekowych. Zaprezentowano również aktualny stan wiedzy dotyczący działania i zastosowania tych związków w leczeniu różnego rodzaju schorzeń.

Słowa kluczowe: *Selaginella*, medycyna tradycyjna, związki biologicznie czynne, biflawonoidy, aktywność przeciwnowotworowa

The usage of biologically active substances derived from *Selaginella* in medicine

Abstract

Selaginella, spike moss, is the only genus in the family Selaginellaceae (Lycopodiophyta), which contains approximately 750 species. *Selaginella* species occur in all the continents with the exception of Antarctica; their highest biodiversity is found in tropical and subtropical regions of Asia, America and South Africa. Due to their availability and unusual medical properties, many of the *Selaginella* species have been found in the traditional pharmacopeias of those regions. Properly prepared plants are used to cure diverse ailments as cough, sore throat, jaundice, stomach and liver diseases, menstrual disorders or even in the treatment of wounds and cancer. Such a widespread use of these plants in folk medicine drew attention to their potential and ability to produce biologically active substances, which potentially can be utilized in medicine. Contemporary research shows that the *Selaginella* species are the source of various, unique, and bioactive compounds. The natural products of *Selaginella* are for example flavonoids, alkaloids, terpenoids, and selaginellins occurring only in this genus. Biflavonoids which are dimeric forms of flavonoids are one of the most valuable groups of bioactive compounds produced by *Selaginella* and intensively studied in recent years. They are currently being tested on human cancer cell lines as potential candidates for the development of new anticancer therapies.

The paper presents the use of the *Selaginella* species in traditional medicine. In addition, selected biologically active substances produced by *Selaginella* are described as well as their potential for the development of new drug therapies.

Keywords: *Selaginella*, traditional medicine, biologically active substances, biflavonoids, anticancer activity

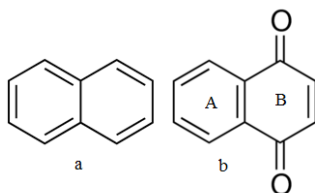
Przeciwkrobiologiczna aktywność 1,4-naftochinonów

1. Wstęp

Innowacyjne leki przeciwkrobiologiczne stanowią jeden z głównych filarów przemysłu farmaceutycznego. W ostatnich latach zauważalny jest znaczny spadek skuteczności antybiotyków ze względu na powstawanie mikroorganizmów odpornych na ich działanie. Jest to nieuniknione zjawisko, ponieważ większość patogenów podlega stałym zmianom, a ich zdolności adaptacyjne do zmieniających się, niekorzystnych warunków środowiska prowadzą do rozwoju lekooporności. Wzrost oporności na antybiotyki wiąże się również ze stale wzrastającym i często nieuzasadnionym ich stosowaniem. Istnieje więc potrzeba poszukiwania lub syntezy nowych, skuteczniejszych związków leczniczych. Jedną z interesujących pod tym względem grup związków o szerokim potencjale przeciwkrobiologicznym są naturalne i syntetyczne 1,4-naftochinony [1].

Naturalne 1,4-naftochinony (1,4-NQ) są barwnikami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Ze względu na specyficzną strukturę chemiczną wykazują szereg ważnych aktywności biologicznych. Zarówno naturalne jak i syntetyczne naftochinony stanowią obiecujące chemioterapeutyki w leczeniu wielu schorzeń, co wiąże się z ich właściwościami przeciwkrobiologicznymi, przeciwzapalnymi i przeciwnowotworowymi. Farmakologiczne aktywności 1,4-NQ i ich mechanizmy wynikają z właściwości utleniająco-redukujących i kwasowo-zasadowych, które mogą być dodatkowo syntetycznie modyfikowane przez wprowadzanie różnych podstawników do pierścieni aromatycznych [1].

1,4-naftochinony są pochodnymi naftalenu (rysunek 1a). Strukturalnie składają się z ugrupowania benzenowego (pierścień A) liniowo skondensowanego z całkowicie sprzężonym cyklicznym diketonem (pierścień B), w którym grupy karbonylowe położone są w orientacji *para* (rysunek 1b).



Rysunek 1. Chemiczna struktura naftalenu (a) i 1,4-naftochinonu (b) [opracowanie własne]

¹ mjanec@kul.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Instytut Biotechnologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 11, 20-708 Lublin

² a-muzyczka@wp.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Instytut Biotechnologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 11, 20-708 Lublin

Wśród naturalnie występujących związków pierścieni 1,4-naftalenoidowy często jest podstawiony jedną lub kilkoma grupami metylowymi, hydroksylowymi i/lub metoksyłowymi, może też zawierać lipidowe łańcuchy boczne. 1,4-NQ występują w postaci wolnych cząsteczek lub są skondensowane z oligosacharydami [2].

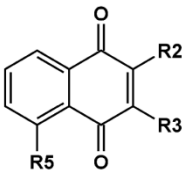
2. Źródła 1,4-naftochinonów

1,4-NQ są syntetyzowane przez organizmy należące do wszystkich królestw świata żywego. Są to metabolity wtórne bakterii, grzybów, glonów, roślin wyższych, a nawet niektórych zwierząt. Związki te zaangażowane są w podstawowe procesy życiowe oraz odpowiadają za przystosowanie do życia organizmów w różnych niszach ekologicznych [2]. Grzyby nitkowate syntetyzują dziesiątki różnych pochodnych 1,4-NQ, których rola polega m.in. na nadawaniu barwy owocnikom, ochronie przed promieniowaniem ultrafioletowym, wysuszeniem i owadami [3]. W świecie zwierząt związki te wytwarzają np. chrząszcze z rodziny czarnuchowatych [4] i niektóre pajęczaki [5]. Z kolei jeżowce *Strongylocentrotus purpuratus* wytwarzają naftochinony czerwony intensywny pigment o nazwie echinochrom [6]. Bakterie *Actinomyces* syntetyzują liczne 1,4-NQ, a wśród nich 5,8-dihydroksy-1,4-naftochinony, czyli naftazaryny, które tworzą rdzeń strukturalny dla wytwarzanych przez nie przeciwdrobnoustrojowych rubromycyn [7]. Wiele współczesnych archeococcus i bakterii zachowało zdolność syntezy menachinonu (witamina K₂) [8]. U niektórych cyjanobakterii *Rhodophytes* (tzw. czerwone glony) i większości okrzemek, menachinon bierze udział w procesie fotosyntezy, więc pełni taką samą rolę jak fitomenadion (witamina K₁) u roślin, zielonych glonów, cyjanobakterii i niektórych euglenin [9 -13]. Witaminy K pełnią wiele istotnych funkcji w organizmie człowieka. Wszystkie witaminy tej grupy to pochodne 2-metylo-1,4-naftochinonu, menadionu, zwanego także witaminą K₃. Ich fizjologiczna rola polega na udziale w koagulacji przez umożliwienie γ -karboksylacji reszt glutamylowych białek zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi, wytwarzając w ten sposób ugrupowania chelatujące wapń. Największe znaczenie fizjologiczne dla człowieka mają naturalne witaminy: fitomenadion, pochodzenia roślinnego i menachinon, wytwarzany przez saprofitujące bakterie jelitowe [14].

Największym źródłem różnorodnych 1,4-naftochinonów są rośliny, w szczególności gatunki z rodzin Plumbaginaceae, Juglandaceae, Ebenaceae, Boraginaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae, Iridaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae, Avicenniaceae, Balsaminaceae, Bignoniaceae, Gentianaceae, Droseraceae, Nepenthaceae, Lythraceae i Euphorbiaceae. Naturalne produkty naftochinonowe posiadają mnóstwo różnorodnych właściwości biochemicznych i dostarczają szerokich możliwości do opracowywania nowych farmaceutyków. Wśród naftochinonów roślinnych największy potencjał farmakologiczny i terapeutyczny posiadają: lawson (otrzymywany z *Lawsonia inermis* L.), plumbagin (z *Plumbago skandens* L.), lapachol (z *Tabebuia* spp. i *Tecomella undulata*), juglon (*Juglans nigra*, *Juglans regia* i *Juglans cinerea*) naftazaryna (*Lomatia obliqua* i gatunki *Alkana* sp.), mompaina (wyzolowany z *Helicobasidium mompa*) i szikonin (z *Lithospermum erythrorhizon*) [1].

Struktury wybranych 1,4-naftochinonów o ważnych funkcjach biologicznych przedstawiono w tabeli 1:

Tabela 1. Przykłady naftochinonów o znaczeniu biologicznym/farmaceutycznym.

Wzór ogólny:				
				
#	R2	R3	R5	Nazwa/akronim
1	H	H	H	1,4-naftochinon
2	H	H	OH	juglon
3	CH ₃	H	H	manadion
4	CH ₃	H	OH	plumbakin
5	OH	H	H	lawson
6	OH	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	lapachol
7	OCH ₃	H	H	MeONQ
8	OCH ₃	OCH ₃	H	DMNQ
9	SCH ₂ CH ₂ OH	SCH ₂ CH ₂ OH	H	NSC 95397

Źródło: [25].

Wśród syntetycznych naftochinonów najwięcej właściwości biologicznych wykazują aminowe, alkilowe i aryłowe pochodne [1].

3. Mechanizmy aktywności 1,4-naftochinonów

Biologiczna aktywność naftochinonów wynika z ich wysokiej reaktywności chemicznej. Zarówno naturalne jak i syntetyczne chinony łatwo ulegają przemianom redoks, co generuje reaktywne formy tlenu (ROS), wykazują właściwości alkilujące wobec różnych biocząsteczek, hamują transport elektronów, interkalują DNA i mogą być inhibitorami niektórych enzymów.

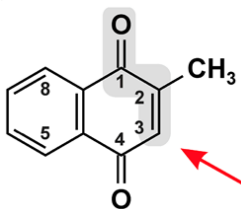
Cykliczne przemiany pomiędzy formami utlenionego chinonu a zredukowanym hydrochinonem są podstawą wielu aktywności biologicznych. Przykładem takiego działania jest aktywność witaminy K i innych naturalnych naftochinonów, np. plumbaginu i juglonu [14-16].

Udział naftochinonów w reakcjach redoks polega na cyklicznym procesie redukcji związku, a następnie utlenieniu produktu tej reakcji przy jednoczesnych wytworzeniu reaktywnych form tlenu (ROS). Reakcje te wymagają obecności zarówno zdolnych do redukcji czynników jak i akceptorów elektronu do utlenienia produktu reakcji. Udowodniono, że w przypadku 1,4-naftochinonów w komórkach ssaczy, redukcja chinonów następuje kosztem NADH lub NADPH i jest katalizowana przez kilka różnych enzymów. Jednym z nich jest reduktaza cytochromowa P450, która katalizuje prostą redukcję naftochinonu do odpowiedniego semichinonu, który z kolei może być

utleniony przez cząsteczkowy tlen. Tlen ulega redukcji z wytworzeniem nadtlenu, $O_2^{\cdot -}$, który następnie ulega dysproporcjonowaniu do tlenu i nadtlenu wodoru. Reakcja ta może przebiegać z udziałem lub bez udziału dysmutazy ponadtlenkowej [17].

Alternatywnie, 1,4-naftochinony mogą ulegać dwuelektronowej redukcji do odpowiedniego hydrochinonu. Reakcja ta jest katalizowana przez oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO-1, DT-diaforaza). W przypadku dwuelektronowej reakcji NQO1 zapobiega powstawaniu wolnych rodników i procesom, w których mogą one „atakować” makrocząsteczki, w tym DNA, lipidy i białka i w konsekwencji prowadzić do mutacji lub śmierci komórki. Produkty tej reakcji są bardziej stabilne i mogą być usuwane bezpośrednio lub ulec reakcjom sprzężania ugrupowań hydroksylowych z rozpuszczającymi się w wodzie cząsteczkami, np. z kwasem glukuronowym lub siarkowym, co ułatwia ich wyeliminowanie. W tym przypadku NQO-1 stanowi element metabolizmu ksenobiotycznego, w którym hydrochinon podlega fazie II biotransformacji. Z drugiej strony podobnie jak reduktaza cytochromu P450, NQO-1 jest enzymem biorącym udział w jednoelektronowej redukcji chinonów do semichinonów, łatwo utlenianych przez tlen cząsteczkowy ponownie do chinonów z wytworzeniem nadlenków [18-20].

Naftochinony z wolną pozycją przy atomie C w sprzężeniu z jednym z karbonyłów (jak na przykład pozycja C-3 w menadionie rys.2) mogą reagować z nukleofilami, takimi jak tiole lub aminy i na drodze reakcji addycji Michaela tworzyć z nimi addukty. Co ważne, w przypadku takiej reakcji, podstawnik w pozycji C-2 musi umożliwić zarówno dostęp, jak i wystarczającą elektrofilność pozycji C-3. Na przykład lawson (2-hydroksy-1,4-naftochinon) jest stosunkowo słabo alkilującym czynnikiem, przeciwnie, menadion i inne naftochinony (np. # 1, 2, 4 z tabeli 1) łatwiej oddziałują z nukleofilami (np. z glutationem) [15, 21 -23].



Rys. 2. Struktura menadionu (2-metylo-1,4-naftochinonu) z oznaczonymi α , β – nienasyconymi ugrupowaniami karbonylowymi (szary) i miejscem ataku nukleofilowego w reakcji addycji Michaela (strzałka). Źródło: [25]

Co ciekawe, efekt biologiczny jaki wywołują 1,4-NQ może być wynikiem jednocześnie zachodzących cykli alkilowania i redoks. Na przykład 3-glutationylo-2-metylo-1,4-naftodiol, produkt reakcji glutationu z menadionem może ulegać utlenianiu, czemu towarzyszy wytworzenie nadtlenu, semichinonu i chinonu. Z kolei produkty reakcji mogą być zredukowane przez NQO1. Utlenianie i alkilowanie odpowiada za większość skutków cytotoksycznych jakie wywołują naftochinony. Przykładem jest działanie pochodnych menadionu stosowanych w leczeniu

nowotworów. Należy traktować je raczej jako pro-leki, ponieważ właściwą formą aktywną leku jest rodnik semichinonowy utworzony podczas aktywacji menadionu przez redukcję [17, 24].

Opisane powyżej aktywności naftochinonów związane są również z wpływem na wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe szlaki sygnalizacyjne. W tym przypadku potwierdzono wpływ naftochinonów na indukcję białek rodziny ErbB receptorów kinaz tyrozynowych [15]. Naftochinony wpływają również na aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2, m.in. poprzez oddziaływanie z Keap1 (z ang. Kelch-like ECH-associated protein 1) i MAPK (z ang. mitogen-activated protein kinases). Niektóre naftochinony to silne stymulatory receptorów czynników wzrostu rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK) i sygnalizacji zależnej od RTK [25].

Inny mechanizm działania naftochinonów to inhibicja aktywności enzymów. W tym przypadku zidentyfikowano m.in. następujące cele molekularne: białkowa fosfataza tyrozynowa [26], DNA topoizomeraza I [27], topoizomeraza II α [28], DNA gyraza z *Mycobacterium tuberculosis* [29], esteraza acetylcholinowa i dysmutaza ponadtlenkowa [30], proteaza cysteinowa z *Trypanosoma cruzi* [31], S-transferaza glutationowa [32] fosfataza CDC25 [33], odwrotna transkryptaza [34] i karboksylaza [35].

Plumbagin jest z kolei przykładem związku, którego aktywność skierowana jest wobec białek strukturalnych, ponieważ hamuje on polimeryzację tubuliny [36].

Wykazano również, że mechanizm aktywności 1,4-NQ może być związany z zakłóceniem prawidłowego cyklu elektronów łańcucha mitochondrialnego. W przypadku atowakwonu aktywne miejsce jego działania w gatunkach *Plasmodium* jest zlokalizowane pomiędzy cytochromem B a c1 w kompleksie III [37].

4. Przeciwmikrobiologiczne właściwości 1,4-naftochinonów

Naturalne naftochinony oraz ich syntetyczne pochodne to związki, które wykazują istotne aktywności biologiczne, w tym również przeciwmikrobiologiczne wobec chorobotwórczych bakterii, grzybów, pasożytów i wirusów. Naftochinony są więc bardzo interesująca grupą związków o dużym potencjale terapeutycznym.

4.1. Działanie przeciwbakteryjne

Badania nad możliwością wykorzystania naftochinonów jako aktywnych związków przeciwbakteryjnych sięgają paru dekad wstecz. Pierwsze doniesienia pochodzą z lat 60-tych ubiegłego wieku [38]. Jednymi z pierwszych zidentyfikowanych związków o takim potencjale były 2-halo-1,4-naftochinony, które wykazywały zdolność do hamowania wzrostu zarówno bakterii gram-dodatnich jak i gram-ujemnych. Aktywność 1,4-naftochinonów przypisywana jest konkurencyjnemu działaniu z witaminą K w transporcie elektronów. Inni badacze aktywność cytotoksyczną naftochinonów łączą z hamowaniem przenoszenia elektronów w łańcuchu oddechowym w mitochondriach oraz zaangażowaniu w wytwarzanie ROS i semichinonów [39-41].

Niektóre antybiotyki stosowane wspólnie np. rifamicyna, tolypomicyna, damawaricyna i manumycyna posiadają pierścień chinonu, który stanowi farmakofor

dla tej cząsteczki i odpowiada za jej aktywność biologiczną przez oddziaływanie z celem molekularnym [38].

Wśród naftochinonów izolowanych z roślin leczniczych o dużym znaczeniu terapeutycznym ze względu wrażliwe na nie gatunki bakteryjne należy wymienić:

- 5-metoksy-3,4-dehydroksantomegnina, z *Paepalanthus latipes* przeciw *H. pylori*, wywołującemu przewlekłe zapalenie błon śluzowych i wrzody żołądka, z wartością MIC (minimalne stężenie hamujące antybiotyku/chemioterapeutyku) równą 64 µg/ml [42],
- trigonoheterona, z *Trigonostemon heterophyllus* przeciw *S. aureus*, wywołujący groźne zakażenia szpitalne z MIC 7,8 µg/ml [43],
- 5-hydroksy-3,6-dimetoksy-2-metylonaftaleno-1,4-dion i 5,8-dihydroksy-3-metoksy-2-metylonaftaleno-1,4-dion izolowany z *Aloe secundiflora* przeciw *M. tuberculosis*, wywołującemu gruźlicę z MIC równym 3,5 µg/ml [44];
- diospyryna, isodiospyryna, mamegakinon, 7-metylojuglon, neodiospyryna i szinanolon izolowane z korzeni *Euclea natalensis* z bardzo obiecującymi wynikami przeciw prątkom gruźlicy, z wartościami MIC w zakresie 0,5 µg/ml-10 µg/ml, co daje silniejsze działanie w porównaniu z lekami takimi jak ryfampicyna, izoniazid i etambutol [45].

Pogłębianie wiedzy o działaniu naturalnych związków posiadających strukturę naftochinonu stanowi podstawę do konstruowania i syntezy nowych leków, w celu uzyskania jeszcze bardziej zadowalających wyników w terapii. Syntetyczne pochodne 1,4-NQ o znaczącej aktywności przeciwbakteryjnej to m.in.:

- 1,4-naftochinon-[3,2-c]-1H-pyrazole i ich 1,4-naftohydrochinonowe pochodne p-anisidilowe, σ-anisidilowe, fenyłowe i metylowe przeciw *Streptococcus faecalis* (MIC 25 µg/ml) i *Escherichia coli* (MIC 6,2 µg/ml) [46],
- 2-hydroksy-1,4-naftochinonowe pochodne z cyjanem i grupą 4-chlorofenyłową w pozycji C-4 przeciw *S. aureus* (MIC 16-64 µg/ml) [47],
- pochodne S-, S,S-, N-, i N,S-1,4-naftochinonu przeciw *E. coli*, (MIC 500 µg/ml), *S. aureus* (MIC 62,5 µg/ml), *Mycobacterium luteum* (MIC 31,2-125 µg/ml) [48],
- 2-etyloamino-3-metylo-1,4-naftochinony przeciw *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 0,6 µg/ml) i *Staphylococcus aureus* (MIC 0,3 µg/ml) [49].,
- N i O-acetylowe pochodne naftochinonu, szczególnie 2 - [(etoksymetylo) amino] -1,4-naftochinon z MIC 4 µg/ml przeciw *S. aureus* [50].

Co ciekawe, pewną prawidłowością jest fakt, że związki o strukturze 1,4-naftochinonu są ok. osiem razy bardziej aktywne niż pochodne 1,2-nachochinonu wobec bakterii Gram-dodatnich [51, 52].

4.2. Aktywność przeciwgrzybicza

Infekcje grzybicze wywołują większość infekcji i powodują wysoką śmiertelność u pacjentów z obniżoną odpornością, po przeszczepach narządów, z białaczką i u nosicieli wirusa HIV. Większość tych infekcji wywołują drożdże z rodzaju *Candida*, w tym przede wszystkim *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C.*

krusei, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* i *C. lusitaniae*. Ogromnym problemem współczesnych czasów jest narastająca oporność grzybów na stosowane antybiotyki. Stąd istnieje potrzeba opracowywania nowych leków, często na postawie znanych, naturalnych substancji o aktywności przeciwgrzybiczej [53, 54]. Zakażenia wywołane przez grzyby nitkowate są co prawda mniej częstsze niż kandydozy i kandydemie, ale charakteryzują się bardzo wysokim wskaźnikiem umieralności. Problem ten dotyczy przede wszystkim gatunków *Aspergillus* i *Fusarium* [55]. Inną problematyczną grupą chorobotwórczych grzybów są dermatofity (np. *Trichophyton rubrum* i *Trichophyton mentagrophytes*), powodujące tzw. dermatofityzy (grzybice skóry, włosów i paznokci) [56].

Naftochinony są jedną z interesujących pod tym względem grup związków, co potwierdzono w wielu doniesieniach literaturowych. Przykłady naturalnych syntetycznych 1,4-NQ z aktywnościami przeciw *Candida*, *Aspergillus* i *Fusarium* i dermatofitom umieszczono w tabeli 2:

Tabela 2. Naturalne i syntetyczne naftochinony wykazujące aktywność przeciwgrzybiczą MFC (Minimum Fungicidal Concentration), MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

1,4-naftochinon	Źródło	Aktywność	Literatura
2-metoksy-1,4-naftochinon	<i>Impatiens balsamina</i>	Szczepy <i>C. albicans</i> w tym odporne na amfoterycynę B i flukonazol MFC w zakresie 0,6-25 µg/ml; <i>F. oxysporum</i> MFC=1,2 µg/ml, <i>A. fumigatus</i> MFC= 0,8 µg/ml; <i>T. mentagrophytes</i> MIC=1,25 µg/ml	[57, 61]
Plumbagin	<i>Plumbago skandens</i> L.	<i>C. albicans</i> MIC=1,56 µg/ml MFC=0,8 µg/ml	[58]
Szikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	<i>C. krusei</i> MIC=4 µg/ml <i>C. glabrata</i> MIC =8,0 µg/ml	[59]
Pochodne alkilowe i aryłowe 1,4-naftochinonu	Synteza chemiczna	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parasilopsis</i> , <i>C. lusitaniae</i> (MIC w zależności od gatunku i związku w zakresie 0,2-8 µg/ml); <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> (MIC ₉₀ w zależności od gatunku i związku w zakresie 4,8- 25,4 µg/ml); <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> (MIC ₉₀ w zależności od gatunku i związku w zakresie 1,3-5 µg/ml)	[60, 61]

Źródło: [opracowanie własne].

4.3. Działanie przeciwwirusowe

Do tej pory aktywność przeciwwirusowa 1,4-naftochinonów została potwierdzona w niewielu doniesieniach naukowych, m.in. wobec wirusa HIV. W przypadku tego wirusa można rozpatrywać cztery docelowe białka dla aktywności 1,4-NQ: odwrotną transkryptazę, integrzę, proteazę i białka kapsydu oraz jeden cel komórkowy: CCR5 – receptor beta-chemokin [62]. Najsilniejsze działanie przeciw HIV wykazały:

- Pochodne conocurvonu ze strukturą trimerycznego naftochinonu, które hamowały integrzę wirusową z dużą skutecznością (IC₅₀ 1,50 μM) [62],
- 5-hydroksy-7-metylo-1,4-naftochinon, inhibitor odwrotnej transkryptazy (IC₅₀ 6,0 μg/ml) [63].

4.4. Właściwości przeciw pasożytnicze

Pochodne 1,4-naftochinonu hamują wzrost i rozwój pasożytów takich jak: *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* i *Leishmania*.

Leiszmanioza jest chorobą tropikalną wywołaną przez wiciowce *Leishmania*, która jest przyczyną bardzo wysokiej śmiertelności w krajach Afryki [51]. Działanie przeciw tym pasożytom wykazuje plumbagin i jego pochodna, 2-metoksy-1,4-naftochinon. Ostatnie doniesienia wskazują także aktywność epoksy- α -lapachonu przeciwko dwóm etapom morfologicznym wiciowca, promastigotom i amastigotom w badaniach *in vitro* [64,65].

Inną groźną chorobą o wysokim wskaźniku śmiertelności jest malaria wywołwana przez pasożyty z rodzaju *Plasmodium*. W latach 50-tych ubiegłego wieku w ramach badań podejmowanych w celu wyeliminowania tej choroby również pochodne 1,4-naftochinonu były intensywnie badane i zgłaszane jako potencjalne leki. Pełny sukces w terapii przeciwmalarycznej został osiągnięty jednak dopiero w 2000 r. kiedy wprowadzono na rynek atowakwon (2-[trans-4-(4'-chlorofenyl) cycloheksylo]-3-hydroksy-1,4-naftochinon). Obecnie ze względu na olbrzymi sukces tego leku, badania nad syntezą nowych substancji przeciwmalarycznych skoncentrowały się na jego strukturze. W ten sposób powstała m.in. seria skutecznych nowych fenylo-sulfanylo-metylowych pochodnych atowakwonu [66,67].

Schistosoma mansoni wywołuje endemiczną chorobę powodującą schistosomatozę, którą według WHO w 2012 roku zainfekowanych było aż 39 milionów ludzi na całym świecie. Choroba ta jest przenoszona przez mięczaki *Biomphalaria glabrata*, dlatego też stały się one celem w terapii z wykorzystaniem 1,4-NQ. Aktywności takie wykazały np. aminowe pochodne lapacholu 2-bromo-5-acetoksy-1,4-NQ, 2-bromo-5-metoksy-1,4-NQ, 3-bromo-5-acetoksy-1,4-NQ i 3-bromo-5-metoksy-1,4-NQ. Natomiast najnowsze badania wykazały, że plumbagin jest skutecznym inhibitorem wzrostu samego pasożyta *S. mansoni* [68-70].

T. gondii jest wewnątrzkomórkowym pasożytem powodującym toksoplazmozę, zakażenie oportunistyczne niebezpieczne dla osób z obniżoną odpornością i płodów ludzkich na każdym etapie ciąży. Wśród naftochinonów działanie przeciw pasożytnicze w doświadczeniach *in vitro* wykazują: 6-(4-metylopentylo)-2-pirolidyno-1,4-

naftochinon, skuteczniejszy niż stosowane leki, atowakwon i sulfadiazin oraz 2-hydroksy-3-(1-fosfon-3-fenyl)-1,4-naftochinon. Natomiast ciekawym osiągnięciem naukowców jest pterokarpanochinon zsyntetyzowany przez molekularną hybrydyzację pterokarpano i lapacholu, ponieważ związek ten jest zdolny do zahamowania wzrostu *T. gondii* w komórkach [71-73].

T. cruzi jest czynnikiem etiologicznym choroby Chagasa. Zgodnie z danymi WHO, na świecie jest 16-18 milionów osób zarażonych tym pasożytem. Wśród testowanych naftochinonów największy potencjał przeciwpasożytniczy wykazały 2-((8E,11Z)-heptadeca-8,11-dienylo)-3-hydroksynaftaleno-1,4-dion z IC_{50} równym 7,8 μM , analogi β -lapachonu z IC_{50} w zakresie 62,6-20,2 μM , for- i orto-naftochinony, zawierające podstawniki 1,2,3-triazolowe, a także 1,2,3-triazole pochodzące od α -lapachonu z IC_{50} w zakresie 6,8-50,2 μM . Wszystkie te pochodne były bardziej aktywne niż lek benzimidazolowy ($IC_{50} = 103,6 \mu M$) [74,75].

5. Podsumowanie

Ponad 80% substancji leczniczych pochodzi bezpośrednio lub zostało wyprodukowane z produktów naturalnych. Dostępne dane wskazują, że około 50% farmaceutyków zawiera substancje czynne syntetyzowane na podstawie uprzednio zidentyfikowanych lub izolowanych związków z roślin i zwierząt [76]. Naftochinony są „uprzywilejowanymi” strukturami w chemii środków leczniczych z powodu aktywności biologicznej i właściwości strukturalnych. Naturalne i syntetyczne biocząsteczki wykazują aktywność biologiczną w wielu kierunkach, w tym opisane działanie antybakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwpasożytnicze i przeciwwirusowe. Wysoka reaktywność chemiczna i możliwość modyfikowania atomów lub grup chemicznych przyłączanych do pierścieni 1,4-naftochinonu daje szerokie otrzymywanie zupełnie nowych i bardziej skutecznych chemioterapeutyków. W większości przypadków poznano molekularne mechanizmy ich aktywności, ściśle związane z właściwościami chemicznymi. W perspektywie opracowywanie nowych związków, obok zwiększenia ich efektywności biologicznej powinno dążyć do wyeliminowania ewentualnych skutków ubocznych jakie wywołują naftochinony oraz wdrażania bardziej przyjaznych ekologicznie metod syntezy (tzw. zielona chemia). W przyszłości badania te powinny zostać poszerzone o testy kliniczne, badania na wielu szczepach drobnoustrojów tego samego gatunku, a także pogłębione testy toksykologiczne, biochemiczne i farmakologiczne.

Literatura

1. López López L. I., Nery Flores S. D., Silva Belmares S. Y., Sáenz Galindo A. *Naphthoquinones: biological properties and synthesis of lawsone and derivatives a structured review*, Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica., 21 (2014) s. 248-258.
2. Widhalm J. R., Rhodes D. *Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants*, Horticulture Research., 3 (2016), artykuł nr 16046.

3. Medentsev A.G., Akimenko V.K. *Naphthoquinone metabolites of the fungi*, *Phytochemistry*, 47 (1998), s. 935-959.
4. Pankewitz F., Hilker M. *Polyketides in insects Ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis*, *Biological Research*, 83 (2008), s. 209-226.
5. Raspotnig G., Fauler G., Leis M., Leis H.J. *Chemical profiles of scent gland secretions in the cyphophthalmid opilionid harvestmen, Siro duricorius and S. exilis*, *Journal of Chemical Ecology*, 31 (2005), s. 1353-1368.
6. Calestani C., Rast J.P., Davidson E.H. *Isolation of pigment cell specific genes in the sea urchin embryo by differential macroarray screening*, *Development*, 130 (2003), s.4587-4596.
7. Babula P., Adam V., Havel L., Kizek R. *Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones—their occurrence, pharmacological properties and analysis*, *Current Pharmaceutical Analysis*, 5 (2009), s. 47-68.
8. Collins MD., Jones D. *Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication*, *Microbiology Reviews*, 45 (1981), s. 316-354.
9. Yoshida E., Nakamura A., Watanabe T. *Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll a' and naphthoquinones in photosystem I of red algae: existence of two menaquinone-4 molecules in photosystem I of Cyanidium caldarium*, *Analytical Sciences*, 19 (2003), s. 1001-1005.
10. Ikeda Y., Komura M., Watanabe M., Minami C., Koike H., Itoh S. *Photosystem I complexes associated with fucoxanthin-chlorophyll-binding proteins from a marine centric diatom, Chaetoceros gracilis*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777 (2008), s. 351-361.
11. Brettel K., Sétif P., Mathis P. *Flash-induced absorption changes in photosystem I at low temperature: evidence that the electron acceptor A1 is vitamin K1*, *FEBS Letters*, 203 (1986), s. 220-224.
12. Lefebvre-Legendre L., Rappaport F., Finazzi G., Ceol M., Grivet C., Hopfgartner G. *Loss of phyloquinone in Chlamydomonas affects plastoquinone pool size and photosystem II synthesis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007), s. 13250-13263.
13. Seeger J., Bentley R. *Phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in Euglena gracilis strain Z*, *Phytochemistry*, 30 (1991), s.3585-3589.
14. Ferland G. *The discovery of vitamin K and its clinical applications*, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61 (2012), s. 213-218.
15. Klaus V., Hartmann, T., Gambini J., Graf P., Stahl W., Hartwig A., Klotz L.O. *1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 496 (2010), s. 93-100.
16. Inbaraj J.J., Chignell C.F. *Cytotoxic action of juglone and plumbagin: A mechanistic study using HaCaT keratinocytes*, *Chemical Research Toxicology*, 17 (2004), s. 55-62.
17. Rooseboom M., Commandeur, J.N., Vermeulen N.P. *Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs*, *Pharmacological Reviews*, 56 (2004), s. 53-102.
18. Ernster L. *DT-diaphorase - a historical review*, *Chemica Scripta*, 27A (1987), s. 1-13.
19. Thor H., Smith, M.T., Hartzell P., Bellomo G., Jewell S.A., Orrenius S. *The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cell*, *Journal of Biological Chemistry*, 257 (1982), s.12419-12425.
20. Nishiyama T., Izawa T., Usami M., Ohnuma, T., Ogura K., Hiratsuka A. *Cooperation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and UDP-glucuronosyltransferases reduces*

- menadione cytotoxicity in HEK293 cell*, Biochemical and Biophysical Research Communications., 392 (2010), s. 459-463.
21. d'Arcy Doherty M., Rodgers A., Cohen G.M. *Mechanisms of toxicity of 2- and 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone; absence of a role for redox cycling in the toxicity of 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone to isolated hepatocytes*, Journal of Applied Toxicology., 7 (1987), s.123-129.
 22. Abdelmohsen K., Gerber P.A., von Montfort C., Sies H., Klotz L.O. *Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43—Role of glutathione and tyrosine phosphatases*, Journal of Biological Chemistry., 278 (2003), s. 38360-38367.
 23. Abdelmohsen K., Patak P., von Montfort C., Melchheier I., Sie, H., Klotz L.O. *Signaling effects of menadione: From tyrosine phosphatase inactivation to connexin phosphorylation.*, Methods in Enzymology., 378 (2004), s.258-272.
 24. Buffinton G.D., Öllinger K., Brunmark A., Cadenas E. *DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates. Effect of substituents on autoxidation rates*, Biochemical Journal., 257 (1989), s.561-571.
 25. Klotz L.O., Hou X., Jacob C. *1,4-Naphthoquinones: From Oxidative Damage to Cellular and Inter-Cellular Signaling*, Molecules., 19 (2014), s.14902-14918.
 26. Östman A., Frijhoff J., Sandin A., Böhmer F.D. *Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation*, The Journal of Biochemistry., 150 (2011), s.345-356.
 27. Ioanoviciu A., Antony S., Pommier Y., Staker B.L., Stewart L., Cushman M. *Synthesis and mechanism of action studies of a series of norindenoisoquinoline topoisomerase I poisons reveal an inhibitor with a flipped orientation in the ternary DNA-enzyme-inhibitor complex as determined by X-ray crystallographic analysis*, Journal of Medical Chemistry., 28 (2005), s. 4803-4814.
 28. Hueso-Falcón I., Amesty Á, Anaissi-Afonso L., Lorenzo-Castrillejo I., Machín F., Estévez-Braun A. *Synthesis and biological evaluation of naphthoquinone-coumarin conjugates as topoisomerase II inhibitors*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters., 7 (2017), s. 484-489.
 29. Karkare S., Chung T.T., Collin F., Mitchenall L.A., McKay A.R., Greive S.J., Meyer J.J., Lall N., Maxwell A. *The naphthoquinone diospyrin is an inhibitor of DNA gyrase with a novel mechanism of action*, Journal of Biological Chemistry., 288 (2013), s. 5149-5156.
 30. Pradeepa V., Senthil-Nathan S., Sathish-Narayanan S., Selin-Rani S., Vasantha-Srinivasan P., Thanigaivel A., Ponsankar A., Edwin E.S., Sakthi-Bagavathy M., Kalaiivani K., Murugan K., Duraipandiyam V., Al-Dhabi N.A. *Potential mode of action of a novel plumbagin as a mosquito repellent against the malarial vector Anopheles stephensi, (Culicidae: Diptera)*, Pesticide Biochemistry Physiology., 134 (2016) s. 84-93.
 31. Bourguignon S.C., Cavalcanti D.F., de Souza A.M., Castro H.C., Rodrigues C.R., Albuquerque M.G., Santos D.O., da Silva G.G., da Silva F.C., Ferreira V.F., de Pinho R.T., Alves C.R. *Trypanosoma cruzi: insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity*, Experimental Parasitology., 127 (2011) s. 160-166.
 32. Mathew N., Srinivasan L., Karunan T., Ayyanar E., Muthuswamy K. *Studies on filarial GST as a target for antifilarial drug development-in silico and in vitro inhibition of filarial GST by substituted 1,4-naphthoquinones*, Journal of Molecular Modeling., 17 (2011) s.2651-2657.
 33. Brun M.P., Braud E., Angotti D., Mondesert O., Quaranta M., Montes M., *Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatasa inhibitory activity*, Bioorganic & Medicinal Chemistry., 13 (2005) s. 4871-4879.

34. Li C.J., Zhang L.J., Dezube B.J., Crumpacker C.S., Pardee A.B. *Three inhibitors of type-1-human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus-replication*, Proceedings of the National Academy Sciences USA., 90 (1993), s.1839-183942.
35. Dhaon M.K., Lehrman S.R., Rich D.H., Engelke J.A., Suttie J.W. *Derivatives of 2-methyl-1,4-naphthoquinone as substrates and inhibitors of the vitamin k-dependent carboxylase*, Journal of Medical Chemistry., 27(9) (1984), s.1196-1201.
36. Kumar S., Malachowski W.P., DuHadaway JB, LaLonde JM, Carroll PJ, Jaller D, et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone based inhibitors*, Journal of Medical Chemistry., 51 (2008), s.1706-1718.
37. Fry M., Pudney M. *Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80)*, Biochemical Pharmacology., 43 (1992), s.1545-1553.
38. Silver R.F., Holmes H.L. *Synthesis of some 1,4-naphthoquinones and reactions relating to their use in the study of bacterial growth inhibition*, Candida Journal of Chemistry., 46 (1968), s.1859-1864.
39. Wurm G., Geres U., Schmidk H. *Untersuchungen an 1,4-naphthoquinonen*, D. Apotheker Zeitung., 43 (1980), s.2045.
40. Tomozane H., Takeuchi Y., Choshi T., Kishida S., Yamato M. *Synthesis and antifungal activities of dl-griseofuvin and its congeners I*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin., 38 (1990), s.925-929.
41. Oogose K., Hafuri Y., Takemori E., Nakata E., Inouye Y., Nakamura S, Kubo A. *Mechanism of inhibition of reverse transcriptase by quinone antibiotics*, The Journal of Antibiotics., 40 (1987), s.1778-1781.
42. Kitagawa R.R., Bonacorsi C., Da Fonseca L.M., Vilegas W., Goncalves-Raddi M.S. *Anti-Helicobacter pylori activity and oxidative burst inhibition by the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroanthraquinone from Paepalanthus latipes*, Revista Brasileira de Farmacognosy/ Brazilian Journal Pharmacognosy., 2 (2012), s. 53-59.
43. Li Y.X., Mei W.L., Zuo W.J., Zhao Y.X., Dong W.H., Dai H.F. *Two new compounds from Trigonostemon heterophyllus*, Phytochemistry Letters., 5 (2012), s.41-44.
44. Induli M., Cheloti M., Wasuna A., Wekesa I., Wanjohi J.M., Byamukama R., *Naphthoquinones from the roots of Aloe secundiflora*, Phytochemistry Letters., 5;3 (2012), s. 506-509.
45. Van der Kooy F., Meyer J.J.M., Lall N. *Antimycobacterial activity and possible mode of action of newly isolated neodiospyrin and other naphthoquinones from Euclea natalensis*, South African Journal Botany., 76 (2006), s. 349-352.
46. Tandon V.K., Yadav D.B., Singh R.V., Vaish M., Chaturvedi A.K., Shukla P.K. *Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial and antiviral agents*, Bioorganic Medicinal Chemistry Letters., 15 (2005), s. 3463-3466.
47. Rahmoun N.M., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Benabdallah M., Villemin D., Choukchou-Braham N. *Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives*, Medecien Et Maladies Infectieuses., 42 (2012), s. 270-275.
48. Ibis C., Tuyun A.F., Bahar H., Ayla S.S., Stasevych M.V., Musyanovych R.Y., et al. *Nucleophilic substitution reactions of 1,4-naphthoquinone and biologic properties of novel S-, S,S-, N-, and N,S-substituted 1,4 naphthoquinone derivatives*, Medicinal Chemistry Research., 23 (2014), s. 2140-2149.
49. Chadar D., Camilles M., Patil R., Khan A., Weyhermuller T., Salunke-Gawali S. *Synthesis and characterization of n-alkylamino derivatives of vitamin K3: molecular structure of 2-*

- propylamino-3-methyl-1,4-naphthoquinone and antibacterial activities*, Journal of Molecular Structure., 1086 (2015), s.179-189.
50. Jordao A.K., Novais J., Leal B., Escobar A.C., dos Santos H.M. Jr, Castro H.C. *Synthesis using microwave irradiation and antibacterial evaluation of new N,O-acetals and N,S-acetals derived from 2-amino-1,4-naphthoquinones*, European Journal Medicinal Chemistry., 63 (2013), s.196-201.
 51. Tran T., Saheba E., Arcerio A.V., Chavez V., Li Q.Y., Martinez L.E., Primm T.P. *Quinones as antimycobacterial agent.*, Bioorganic Medicinal Chemistry., 12 (2004), s. 4809-4813.
 52. Adeniyi B.A., Fong H.H., Pezzuto J.M., Luyengi L., Odelola H.A. *Antibacterial activity of diospyrin, isodiospyrin and bisidiospyrin from the root of Diospyros piscatoria (Gurke) (Ebenaceae)*, Phytotherapy Research., 14 (2000), s. 112-117.
 53. Cuenca-Estrella M. *Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside*, Clinical Microbiology and Infection., 20 (2014), s. 54-59.
 54. Morace G., Perdoni F., Borghi, E. *Drug resistance in Candida species*, Journal Global Antimicrobial Resistance., 2 (2014), s. 254-259.
 55. Peman J., Salavert M., Quindos G. *Invasive infection diseases by filamentous fungi*, Revista Iberoamericana Micologia., 31 (2014) s. 211-220.
 56. Kusuma I.W., Arung E.T., Rosamah E., Purwatiningsih S., Kuspradini H., Syafrizal-Astuti J. *Antidermatophyte and antimelanogenesis compound from Eleutherine americana grown in Indonesia*, Journal of Natural Medicines., 64 (2010), s. 223-226.
 57. Yang X., Summerhurst D.K., Koval S.F., Ficker C., Smith M.L., Bernards M.A. *Isolation of an antimicrobial compound from Impatiens balsamia L. using bioassay-guided fractionation*, Phototherapy Research., 15;8 (2001), s. 676-680.
 58. De Paiva S.R., Figueiredo M.R., Aragao T.V., Kaplan M.A. *Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from Plumbago species*, The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz., 98 (2003), s. 959-961.
 59. Sasaki K., Abe H., Yoshizak F. *In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives*, Biological and Pharmaceutical Bulletin., 25;5 (2002), s. 669-670.
 60. Pawar O., Patekar A., Khan A., Kathawate L., Haram S., Markad G. *Molecular structures and biological evaluation of 2-chloro-3-(n-alkylamino)-1,4-naphthoquinone derivatives as potent antifungal agents*, Journal of Molecular Structure., 1059 (2014), s. 68-74.
 61. Castro M.A., Gamito A.M., Tangarife-Castano V., Zapata B., Miguel del Corral J.M., Mesa-Arango A.C. *Synthesis and antifungal activity of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-anthracenedione derivatives*, European Journal of Medicinal Chemistry., 67 (2013), s. 19-27.
 62. Crosby I.T., Bourke D.G., Jones E.D., de Bruyn P.J., Rhodes D., Vandegraaff N., *Antiviral agents 2. Synthesis of trimeric naphthoquinone analogues of conocurvone and their antiviral evaluation against HIV*, Bioorganic & Medicinal Chemistry., 18 (2010), s. 6442-6450.
 63. Mahapatra A., Tshikalange T.E., Meyer J.J.M., Lall N. *Synthesis and HIV-1 reverse transcriptase inhibition activity of 1,4-naphthoquinone derivatives*, Chemistry of Natural Compounds., 47 (2012), s. 883-887.
 64. Sharma N., Shukla A.K., Das M., Dubey V.K. *Evaluation of plumbagin and its derivative as potential modulators of redox thiol metabolism of Leishmania parasite*, Parasitology Research., 110 (2012), s. 341-348.
 65. Souza-Silva F., do Nascimento S.B., Bourguignon S.C., Pereira B.A., Carneiro P.F., da Silva W.S. *Evidences for leishmanicidal activity of the naphthoquinone derivative epoxy-a-lapachone*, Experimental Parasitology., 147 (2014), s. 81-84.

66. Radloff P.D., Philips J., Nkeyi M., Kremsner P.G., Radloff P.D., Hutchinson D., *Atovaquone and proguanil for Plasmodium falciparum malaria*, *The Lancet.*, 347 (1996), s. 1511-1514.
67. Sharma A., Santos O.I., Gaur P., Ferreira V.F., Garcia C.R., da Rocha D.R. *Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy- 3-phenylsulfanylmethyl [1,4]-naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite Plasmodium falciparum (3D7)*, *European Journal of Medicinal Chemistry.*, 59 (2013), s. 48-53.
68. Silva T.M., Camara C.A., Barbosa T.P., Soares A.Z., da Cunha L.C., Pinto A.C. *Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivative*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, 13 (2005), s. 193-196.
69. Ribeiro A.I.K., de Carvalho C.M., Molina M.T., Pereira-Lima E., Lopez-Montero E., de Oliveira M.B., *Activites of naphthoquinones against Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and Biomphalaria glabrata (Say, 1818), intermediate host of Schistosoma mansoni*, *Acta Tropica.*, 111 (2009), s. 44-50.
70. Zhang S.M., Coultas K.A. *Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis*, *International Journal of Parasitology: Drugs and Drug Resistance.*, 3 (2013), s. 28-34.
71. Ferreira R.A., Oliveira A.B., Ribeiro M.F., Tafuri W.L., Vitor R.W. *Toxoplasma gondii: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4 naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine*, *Experimental Parasitology.*, 113 (2006), s.125-129.
72. Ferreira R.A., de Oliveira A.B., Gualberto S.A., Miguel del Corral J.M., Fujiwara R.T., Gazzinelli-Guimaraes P.H. *New naphthoquinones and alkaloid with in vitro activity against Toxoplasma gondii RH and EGS strains*, *Experimental Parasitology.*, 132 (2012), s. 450-457.
73. Portes J.A., Netto C.D., da Silva A.J., Costa P.R., Da Matta R.A., dos Santos T.A. *A new type of pterocarpanquinone that effects Toxoplasma gondii tachyzoites in vitro*, *Veterinary Parasitology.*,186 (2012), s. 261-269.
74. da Silva A.O., da Silva-Lopes R., Viera de Lima R., Santos Suniga-Tozatti C., Marques M.R., de Albuquerque S. *Synthesis and biological activity against Trypanosoma cruzi of substituted 1,4-naphthoquinones*, *European Journal Medicinal of Chemistry.*, 60 (2013), s. 51-56.
75. Ferreira S.B., Salomao K., da Silva Fde C., Ventura-Pinto A., Kaiser C.R., Pinto A.C. *Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of b-lapachone analogues*, *European Journal of Medicinal Chemistry.*, 46 (2011), s. 3071-3077.
76. Dias D. A., Urban S., Roessner U. *A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery*, *Metabolites.*, 2 (2012), s. 303-336.

Przeciwmikrobiologiczna aktywność 1,4-naftochinonów

Streszczenie

W obliczu narastającego światowego kryzysu lekooporności patogenów klinicznych, jak i związanych z produkcją rolną, na znaczeniu zyskuje synteza chemiczna nowych terapeutyków. Wiele czynników chorobotwórczych pozostaje oporna na działanie aktualnie dostępnych antybiotyków. W związku z tym istnieje konieczność opracowywania nowych, prostszych, bardziej efektywnych i mniej toksycznych środków przeciwdrobnoustrojowych. Jedną z budzących coraz większe zainteresowanie grup związków o potencjale przeciwmikrobiologicznym są naftochinony. 1,4-naftochinony to pochodne naftalenu, charakteryzujące się obecnością dwóch grup karbonylowych w pozycjach 1 i 4. Są to aromatyczne związki organiczne, tradycyjnie stosowane jako naturalne lub syntetyczne barwniki. Naturalne naftochinony są metabolitami wtórnymi, pozyskiwanymi z niektórych roślin, grzybów, glonów i bakterii. Zarówno naturalne naftochinony, jak i ich syntetyczne pochodne wykazują szereg przeciwmikrobiologicznych w tym przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, przeciwwirusowe oraz przeciwpasożytnicze. W większości przypadków aktywność biologiczna naftochinonów związana jest z ich właściwościami kwasowo-zasadowymi oraz redoks. Ze względu na wysoką reaktywność chemiczną i duże możliwości chemicznego modyfikowania cząsteczek 1,4-naftochinonów, związki te dają naukowcom szerokie możliwości modulowania aktywności biologicznej.

Słowa kluczowe: 1,4-naftochinony, właściwości przeciwmikrobiologiczne, mechanizm aktywności

Antimicrobial activity of 1,4-naphthoquinones

Abstract

In the face of the growing global crisis of drug resistance, clinical pathogens and agricultural production, the chemical synthesis of new medicaments is becoming increasingly important. Many pathogens remain resistant to the currently available antibiotics. Therefore, it is necessary to develop new, simpler, more effective and less toxic antimicrobials. One of the group of interest compounds with antimicrobial potential are naphthoquinones. Naphthoquinones are structurally related to naphthalene and are characterized by their two carbonyl groups in the 1,4 position. These are aromatic organic compounds, traditionally used as natural or synthetic dyes. Natural naphthoquinones are secondary metabolites, derived from certain plants, fungi, algae, bacteria and some animals. Both, natural naphthoquinones and their synthetic derivatives exhibit a variety of antimicrobial agents including antimicrobial, antifungal, antiviral and antiparasitic. In most cases, the biological activity of naphthoquinones is related to their acidic-base and redox properties. Because of their high chemical reactivity and the high potential of chemical modification of 1,4-naphthoquinone molecules, these compounds give a wide range of options for modulating biological activity.

Keywords: 1,4-naphthoquinone, antimicrobial properties, mechanism of action

Substancje o potencjale przeciwgrzybiczym produkowane przez mikroorganizmy

1. Wprowadzenie

Grzyby stanowią 7% (611 tysięcy) całkowitej liczby gatunków eukariotycznych na Ziemi, z czego tylko około 600 gatunków to patogeny ludzkie. Ta stosunkowo mała grupa organizmów wywołuje zakażenia, które stanowią ciągle poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Ze względu na objawy i efekty chorobowe, infekcje te można sklasyfikować jako (a) reakcje alergiczne na białka grzybów, (b) reakcje na toksyny obecne w niektórych grzybach oraz (c) grzybice (mikozy). Osoby zdrowe są narażone na powierzchowne, skórne, podskórne, a w pewnych przypadkach również systemowe infekcje, począwszy od grzybicy stóp i paznokci do poważnej, zagrażającej życiu formy rozsianej, np. histoplazmozy. Wiele infekcji grzybiczych jest wywoływanych przez patogeny oportunistyczne, zarówno endogenne (np. *Candida*) jak i nabyte ze środowiska (np. *Cryptococcus* i *Aspergillus*). Inny rodzaj infekcji grzybiczych, to zakażenia inwazyjne i dermatomikozy, które dotyczą głównie osoby z obniżoną odpornością, takich jak noworodki, chorzy na nowotwory, poddawani chemioterapii, pacjenci po przeszczepach narządów, oraz z zespołem niedoboru odporności (AIDS). Kolejne czynniki ryzyka zachorowania to leczenie antybiotykami i kortykosteroidami, cukrzyca, uszkodzenie naskórka i skóry właściwej, niedożywienie, neutropenia i zabiegi chirurgiczne. W ostatnich latach odnotowuje się nasilenie udziału infekcji grzybiczych w sepsie [1-4].

Główną przyczyną zachorowalności i umieralności są patogeny takie jak *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii* i *Aspergillus fumigatus*. U pacjentów z obniżoną odpornością główną rolę odgrywają gatunki *Aspergillus* i *Candida* [2].

Ostatnie dane epidemiologiczne wskazują na wzrost infekcji wywoływanych przez *Aspergillus* spp. oraz *Candida* spp. innych niż *C. albicans*. Kandydozy i aspergilozy stanowią od 80% do 90% systemowych infekcji grzybiczych u pacjentów z obniżoną odpornością [5]. *C. albicans* jest komensalem jamy ustnej i przewodu pokarmowego, z drugiej strony uważany jest za najbardziej zjadliwy patogen grzybowy człowieka. Wśród innych gatunków *Candida* najczęściej izolowane są *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* i *C. kefyr*. Szczepy *Candida* są czwartą najczęstszą przyczyną nabytych szpitalnych infekcji w USA ze wskaźnikiem śmiertelności sięgającym nawet 50% [1, 6-8]. Z kolei grzyby nitkowate *Aspergillus* stanowią szeroką i zróżnicowaną grupę mikroorganizmów, obejmującą 180 gatunków, w tym o znaczeniu komercyjnym (*Aspergillus oryzae* i *Aspergillus niger*), oraz o znaczeniu medycznym i zdrowotnym. Wśród *Aspergillus* wyróżnia się zarówno

¹ mjanec@kul.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

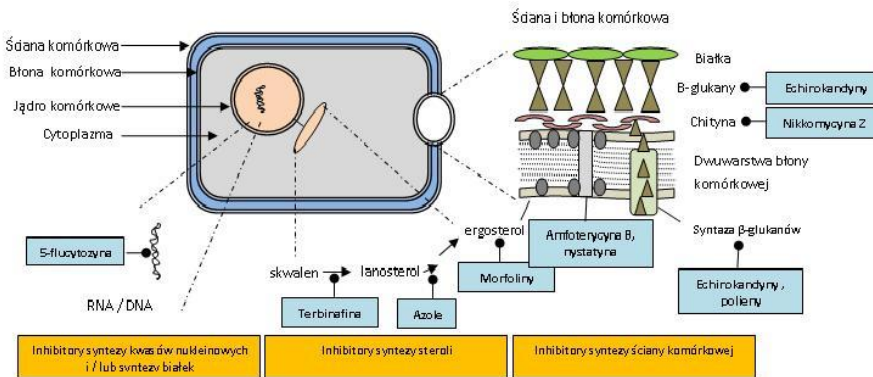
patogeny chorobotwórcze (*Aspergillus pasiticus* i *A. fumigatus*) oraz gatunki wytwarzające toksyny, zanieczyszczające żywność i pasze (*Aspergillus flavus*). *Aspergillus* jest patogenem oportunistycznym, praktycznie wszechobecnym, atakującym przede wszystkim pacjentów z obniżoną odpornością. Czynnikiem ułatwiającymi infekcje są uszkodzenia skóry po założeniu cewnika, leczenie cytostatykami, które uszkadzają błonę śluzową, neutropenia i upośledzone wchłanianie w jelicie cienkim. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym jest *A. fumigatus*, chociaż coraz częściej identyfikowane są inne gatunki, takie jak *A. flavus*, *A. niger* i *A. terreus*. Dane epidemiologiczne dotyczące inwazyjnej aspergilozy wskazują na rosnącą liczbę zakażeń u pacjentów z immunosupresją, po przeszczepie szpiku kostnego, hematopoetycznych komórek macierzystych lub narządów oraz u osób otrzymujących intensywną chemioterapię lub inne leczenie immunosupresyjne [9-13].

Do lat 70-tych ubiegłego wieku zakażenia grzybicze w dużej mierze były łatwe do leczenia i zapotrzebowanie na nowe leki było bardzo małe. Chemioterapia przeciwgrzybicza w tamtym czasie obejmowała dwa rodzaje związków: jodek potasu, skuteczny w leczeniu sporotrichosis i dwa polieny, nystatynę i amfoterycynę B, które zostały wprowadzone w latach 50-tych. Z wyjątkiem flucytozyny (1964 r.) odnotowano niewielki postęp w opracowywaniu nowych leków aż do momentu wprowadzenia pochodnych azolowych na początku lat 70-tych XX wieku. Obecnie w leczeniu infekcji grzybiczych zagrażających życiu dostępna jest ograniczona liczba środków przeciwgrzybiczych (polieny i azole, czy echinokandyny). Ponadto, stosowanie tych leków ma pewne ograniczenia, takie jak nefrotoksyczność amfoterycyny B i pojawiająca się oporność na azole, mimo kilku ostatnich modyfikacji, takich jak preparaty lipidowe polienów i nowe triazole o niższej toksyczności (worikonazol, rawukonazol i posokonazol) i z szerszym spektrum aktywności [14-16].

Ze względu na stosunkowo niską skuteczność standardowych terapii przeciwgrzybiczych (często wynikająca z pojawienia się oporności wśród mikroorganizmów spowodowanej nadużywaniem lub nieuzasadnionym stosowaniem antymikotyków) oraz na ich znaczną toksyczność konieczne jest poszukiwanie i opracowywanie nowych leków przeciwgrzybiczych.

Doskonałym źródłem antybiotyków są mikroorganizmy. Do tej pory zidentyfikowano 20 000 metabolitów wtórnych bakterii i wydaje się że są one nadal niewyczerpanym źródłem struktur, na podstawie których opracowywane są nowe leki przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Ponadto, wiele wtórnych metabolitów, takich jak benzylopenicylina, cefalosporyny, erytromycyna, strobiluryna itp. były podstawą do opracowania syntetycznych i półsyntetycznych pochodnych o skuteczniejszych właściwościach farmakologicznych. Związki te wykazują szereg właściwości i różne sposoby działania [17].

Ze względu na eukariotyczny charakter grzybów, w przypadku terapii przeciwgrzybiczej kluczowe jest zidentyfikowanie specyficznego i selektywnego dla tej grupy organizmów celu molekularnego. Do tej pory skuteczne leczenie grzybic przy zastosowaniu naturalnych i syntetycznych antybiotyków i chemioterapeutyków oparto na wykorzystaniu składowych komórki i szlaków metabolicznych przedstawionych na rysunku 1.



Rysunek 1. Przykładowe cele molekularne w terapii przeciwgrzybiczej

Źródło: opracowanie własne na podstawie [2]

Jak przedstawiono na powyższym schemacie, kluczowe w tym przypadku są synteza kwasów nukleinowych i białek, sterole błony komórkowej (zarówno ich synteza jak i bezpośrednie oddziaływanie z nimi) oraz synteza elementów ściany komórkowej.

Zidentyfikowane do tej pory przeciwgrzybicze związki naturalne, będące metabolitami wtórnymi mikroorganizmów wykazują następujące mechanizmy działania: hamowanie syntezy składników ścian komórkowych, hamowanie syntezy sfingolipidów i syntezy białek oraz oddziaływanie z ergosterolem i mikrotubulami. W niniejszej pracy przedstawiono wybrane antybiotyki o wyżej wskazanych aktywnościach oraz źródła ich pozyskiwania. Opracowanie zawiera rys historyczny leczenia grzybic oraz perspektywy wykorzystania w przyszłości mikroorganizmów w skutecznej terapii przeciwgrzybiczej.

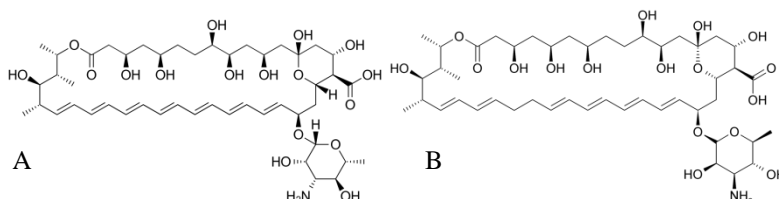
2. Antybiotyki wiążące ergosterol

Ergosterol jest głównym składnikiem błony komórkowej grzybów. Pełni rolę bioregulatora płynności, asymetrii i integralności błony. Stymuluje również wzrost, pełniąc rolę hormonu w komórkach grzybów. Jedną z możliwości wykorzystania tego selektywnego celu molekularnego w terapii przeciwgrzybiczej jest blokowanie jego syntezy. Inhibitorami syntezy ergosterolu są syntetyczne azole np. flukonazol, ketokonazol, worikonazol i itraconazol. Wśród naturalnych związków zidentyfikowano i wprowadzono do leczenia polieny, które przez oddziaływanie z ergosterolem powodują destabilizację błony komórkowej grzyba [18].

Przedstawicielem tych antybiotyków jest amfoterycyna B, którą wyizolowano ze *Streptomyces nodosum*. Posiada ona właściwość wiązania się ze sterolami w błonach komórkowych, co powoduje ich zmianę przepuszczalności i wyciek składników komórkowych. Amfoterycyna B wykazuje szerokie spektrum aktywności wobec *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, gatunków *Sporotrichium* i *Torulopsis glabrata* [19, 20].

Drugi tego typu antybiotyk to nystatyna, która została wyizolowana w 1950 roku z hodowli *Streptomyces noursei* i jest nadal stosowana jako miejscowy środek przeciwwgrzybiczy. Antybiotyk ten po podaniu doustnym nie wchłania się z przewodu pokarmowego [19].

Struktury opisanych polienów przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 2. Antybiotyki polienowe: A-amfoterycyna B, B-nystatyna. Źródło: [19]

3. Inhibitory biosyntezy ściany komórkowej

Jednym z punktów uchwytu terapii przeciwwgrzybiczej jest ściana komórkowa. Antybiotyki działające na ten element komórki charakteryzują się zwykle wysoką selektywnością, ze względu na jej specyficzną budowę i brak odpowiednika w komórkach ssaków. Mimo, że poszczególne gatunki grzybów różnią się budową ściany komórkowej, na ogół posiadają trzy jednakowe składniki polimeryczne: glukan, chitynę i mannoproteiny. Subkomórkowe mechanizmy ich syntezy zostały wykorzystane jako potencjalne cele do poszukiwania nowych naturalnych i syntetycznych produktów przeciwwgrzybiczych [17].

3.1. Inhibitory syntezy glukanu

Glukan to polisacharyd złożony z monomerów D-glukozy połączonych wiązaniami (1,3)- β lub (1,6)- β . Jest on istotnym składnikiem ściany komórkowej grzybów, nadającym jej wiele charakterystycznych właściwości fizycznych. Zahamowanie syntezy glukanu powoduje obniżone włączanie podjednostek glukozy do polimeru glukanowego, stąd inhibitory syntezy glukanu prowadzą do lizy wrażliwych na nie komórek grzybów [21].

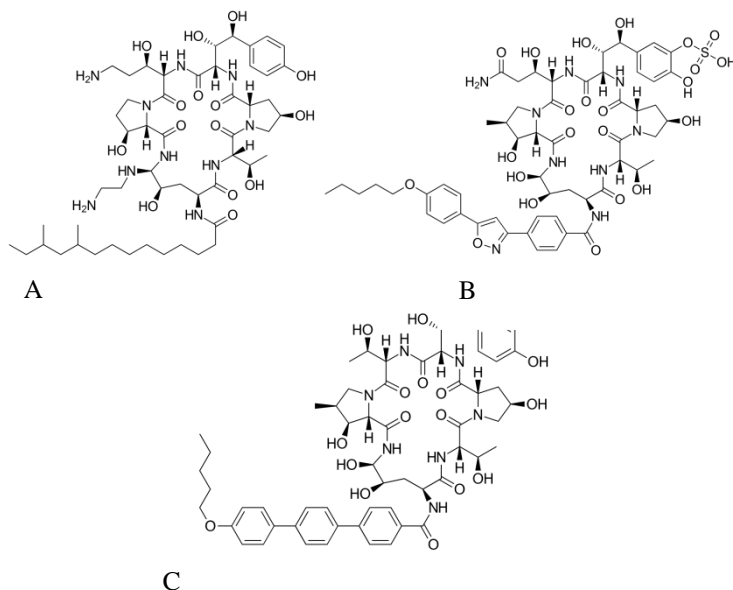
Synteza glukanu hamowana jest przez echinokandyny, cykliczne heksapeptydy N-acylowane łańcuchami alifatycznymi o różnej długości. Echinokandyny różnią się podstawnikami w heksapeptydzie lub zawartością łańcuchów kwasów tłuszczowych. Pierwszy związek z tej grupy inhibitorów został odkryty we wczesnych latach siedemdziesiątych [21, 22]. Do tej pory zidentyfikowano wiele pochodnych echinokandyn w różnych grzybach, których przykłady umieszczono na rysunku 3.

Tabela 1. Naturalne inhibitory syntezy glukanu.

Związek	Gatunek, z którego są otrzymywane
Lipopeptydy	
Echinokandyna B	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. rugulosus</i>
Akuleacyna	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Sporiofunginy	<i>Penicillium arenicola</i> , <i>Cryptosporiopsis</i> sp.
Pneumokandyny	<i>Glarea lozoyensis</i> , <i>Pezicula</i> sp., <i>Cryptosporiopsis</i> sp.
Kryptokandyna	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>
FR901469	Niezidentyfikowany gatunek
Arborkandyny	Niezidentyfikowany gatunek
Papulakandyny	<i>Papularia sphaerosperma</i>
Korynekandyna	<i>Coryneum modonium</i>
Fusakandyna	<i>Fusarium sambucinum</i>
Kwaśne terpenoidy	
Efumafungina	<i>Hormonema</i> sp.
Arundifungina	<i>Arthrinium arundinis</i> , <i>A. phaeospermum</i> , <i>Leotiales anamorphs</i> , <i>Coelomycete</i> nieopisany
Askoterozyd	<i>Ascotricha amphitricha</i> , <i>Mycleptodiscus atromaculans</i>
Ergokonina A	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i>

Źródło: [17]

Do opracowania skutecznego leku przeciwgrzybiczego z powodzeniem wykorzystano pneumokandyny. Są to naturalne produkty pochodzące z fermentacji grzyba *Glarea lozoyensis*. Półsyntetyczna pneumokandyna, czyli octan kaspofunginy jest azapodstawioną pochodną pneumokandyny B₀ (rys. 3A). Wprowadzenie dodatkowych grup aminowych w pierścieniu peptydowym pneumokandyny B₀ zwiększyło rozpuszczalność i aktywność przeciwko patogenom grzybowym nawet o dwa rzędy wielkości [23]. Związek ten wykazał skuteczność w zwierzęcych modelach kandydozy, aspergilozy, kokcydioidomikozy i zapalenia płuc wywołanych przez *Pneumocystis carinii* [24-26]. Badania kliniczne wykazały dobrą tolerancję związku i jego skuteczność w leczeniu kandydozy jamy ustnej oraz przełyku, jak również inwazyjnej aspergilozy [27]. Z drugiej jednak strony, kaspofungina wykazuje umiarkowaną aktywność przeciwko *H. capsulatum*, *C. immitis* i *B. dermatitidis* i nie wykazuje aktywności przeciwko *C. neoformans*, *Trichosporon* spp., *Fusarium* spp., *Sporothrix schenckii*, *Zygomycetes* i *Hyalohyphomycetes* [28].



Rysunek 3. Wybrane echinokandyny: A-kasprofungina, B-mikafungina, C-anidulafungina. Źródło: [19]

Innym lekiem stosowanym w leczeniu kandydoz jest mikafungina, pochodna echinokandyny z ugrupowaniem estru siarczanowego w heksapeptydzie (rys. 3B). Jest to związek stosowany profilaktycznie u pacjentów po przeszczepach komórek macierzystych, działający skuteczniej niż flukonazol. Ponadto, mikafungina wykazuje mniej interakcji z innymi lekami w porównaniu do kapsofunginy [29,30].

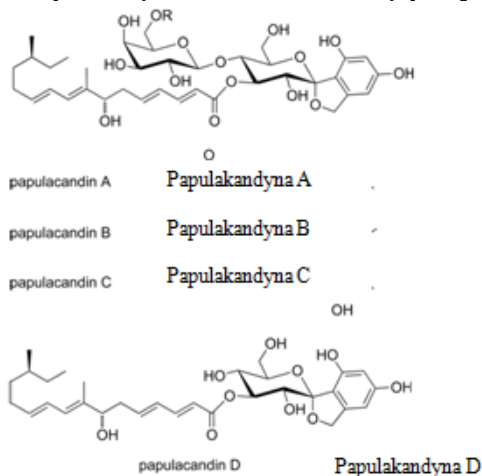
Pochodną echinokandyny jest anidulafungina stosowana w leczeniu kandydoz, kandydemii, zapalenia otrzewnej i ropniowego zapalenia jelita wywoływanego przez *Candida* spp. (rys. 3C). Jej wysoce pożądaną cechą jest fakt, że w organizmie człowieka nie jest metabolizowana, rozkłada się powoli przechodząc proces biotransformacji. Anidulafungina wykazuje aktywność wobec wielu gatunków *Candida*, włącznie z opornymi na azole (*C. krusei*), amfoterycynę B (*C. lusitaniae*) lub inne echinokandyny (*C. parapsilosis*) [31, 32].

Sukces terapeutyczny, jaki został osiągnięty dzięki zastosowaniu lipopeptydów jako skutecznych inhibitorów syntezy glukanu zachęcił branżę farmaceutyczną do poszukiwania innych strukturalnie podobnych leków, lecz z ulepszonymi właściwościami w porównaniu do echinokandyn, zwłaszcza w odniesieniu do braku możliwości podania doustnego.

Badania w tym kierunku dotyczyły m. in. arborkandyn, związków zawierających dziesięciopięścieniowe aminokwasowy i dwa lipofilowe ogony. Testom poddano także związek o nazwie FR901469, będący makrocyklicznym lipopeptydolaktonem, składającym się z 12 aminokwasów i ugrupowania 3-hydroksypalmitoilowego. Kolejne były klawariopsyny, cykliczne depsipeptydy [33 -35]. Jednak, dotychczas

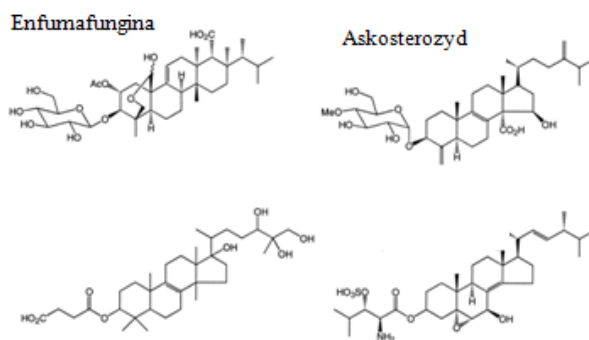
tylko dwa inne rodzaje inhibitorów syntezy glukanu okazały się skuteczne: papulakandyny oraz kwaśne triterpeny.

Papulakandyny są glikolipidami odkrytymi pod koniec lat 70-tych. Przez lata były identyfikowane kolejne pochodne produkowane przez różne grzyby (rysunek 4, tabela 1). Jednak papulakandyny nie doczekały się statusu leku, ze względu na ich ograniczoną skuteczność wykazaną na modelach zwierzęcych [36, 37].



Rysunek 4. Struktury wybranych papulakandyn. Źródło: [38]

Triterpeny zawierają ugrupowanie polarne (kwaśowe), które może być glikozydem (w enfumafunginie i askosterozydzie), bursztynianem (w arundifunginie) lub pochodną siarczanową aminokwasu (w ergokoninie A) (rysunek 5, tabela 1).



Rysunek 5. Struktury wybranych triterpenów o aktywności przeciwgrzybiczej. Źródło: [21]

Spektrum ich aktywności obejmuje gatunki *Aspergillus* i *Candida*, natomiast są nieaktywne wobec gatunków *Cryptococcus* [21, 39-41].

3.2. Inhibitory syntezy chityny

Chityna jest nierozpuszczalnym polisacharydem, zbudowanym z podjednostek N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniami β -(1,4). Ten biopolimer jest jednym ze składników strukturalnych mikrowłókien w ścianie komórkowej grzybów, które odpowiadają za zachowanie morfologicznego kształtu komórek i odgrywa zasadniczą rolę w morfogenezie tych organizmów. Związek ten łączy się kowalencyjnie z glukanem. U drożdży chityna stanowi zaledwie 1% masy ściany komórkowej, ale jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek grzybów, jednocześnie zupełnie nieobecna w ludzkim organizmie. Dlatego synteza chityny jest atrakcyjnym punktem uchwytu dla selektywnych środków przeciwgrzybiczych. U *Saccharomyces cerevisiae* w proces ten zaangażowane są co najmniej trzy różne syntazy chityny: syntaza chityny I, która uczestniczy w procesach naprawy w czasie cytokinezy, syntaza chityny II, enzym niezbędny w formowaniu przegrody pierwotnej między dzielącymi się komórkami oraz syntaza chityny III, która syntetyzuje chitynę w bocznych ścianach komórki [42, 43]. Klasyczne inhibitory syntezy chityny to: nikkomycyna i polioksyny. Związki te są peptydowo-nukleozydowymi substratowymi analogami UDP-N-acetyloglukozaminy, podstawowej podjednostki w biosyntezie chityny. Wyizolowano je z dwóch różnych gatunków *Streptomyces*: *S. tendae* (nikkomycyna) i *S. cacaoi* var. *asoensis* (polioksyna). *C. albicans* jest gatunkiem opornym na polioksyny ze względu na trudności z transportem tych związków do wnętrza ściany komórkowej. Nikkomycyna wykazuje aktywność przeciwko grzybom dimorficznym, drożdżom i grzybom nitkowatym. Nikkomycyny i polioksyny są obecnie używane wyłącznie jako fungicydy w rolnictwie, ze względu na ich słabą aktywność przeciwko ludzkim patogenom [44, 45].

Inhibitorami syntazy chitynowej są również fellinsyna A i artrichityna. Fellinsyna A jest związkiem fenolowym, selektywnie hamującym syntazy chityny I i II w komórkach *S. cerevisiae*. Związek ten wykazuje aktywność przeciwgrzybiczą wobec ludzkich patogenów takich jak *Trichophyton mentagrophytes* i *A. fumigatus* i dość słabą aktywność przeciw *C. neoformans* i *C. immitis*. Ponadto, nie wykazano aktywności przeciw *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. tropicalis* oraz *Fusarium oxysporum*. Artrichityna jest cyklicznym depsiptydem wyizolowanym z *Arthrimum phaeospermum* i z morskiego grzyba *Hypoxylon oceanicum*. Związek ten wykazuje aktywność przeciw *Candida* spp., *Trichophyton* spp. oraz wobec kilku fitopatogenów [46-48].

3.3. Inhibitory syntezy mannoprotein

Mannoproteiny są kolejnym głównym składnikiem ściany komórkowej grzybów. Tworzą jej warstwę zewnętrzną i zawierają aż 50% węglowodanów. Większość mannoprotein jest zakotwiczona w ścianie komórkowej przez β -(1,6)- i β -(1,3)-glukany. Związki te odgrywają ważne role w funkcjonowaniu błony komórkowej grzybów, dlatego też stanowią kolejny potencjalny punkt uchwytu terapii przeciwgrzybiczej [49].

Inhibitorami prawidłowego funkcjonowania mannoprotein jest rodzina związków pradimycyn/benanomycyn, zawierających w swojej strukturze benzo[a]naftaceno-chinon. Wolna grupa karboksylowa tych związków oddziałuje z częścią sacharydową mannoprotein na powierzchni komórek, a następnie destabilizuje błonę plazmatyczną i powoduje wyciek wewnątrzkomórkowego potasu. Związki te produkowane są przez

gatunki *Actinomadura* (*Actinomycetes*). Na modelu mysim wykazano ich aktywność przeciwko ogólnoustrojowym infekcjom grzybiczym wywołanym przez *C. albicans*, *A. fumigatus* i *C. neoformans*. Jednakże, w I fazie badań klinicznych pradimycyna/benanomycyna i jej analogi okazały się zbyt toksyczne, by kontynuować badania z udziałem pacjentów [50-52].

4. Inhibitory syntezy sfingolipidów

Sfingolipidy są rodziną lipidów, pełniących funkcje strukturalne jak również w sygnalizacji komórkowej. Sfingolipidy jako element błony cytoplazmatycznej grzybów, są bardzo istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórek, choć ich zawartość w tych organellach jest stosunkowo niska. Zawartość sfingolipidów w komórkach różnych gatunków grzybów jest kontrolowana przez szereg enzymów biorących udział w ich syntezie.

Inhibicja syntezy sfingolipidów powoduje zahamowanie wzrostu i śmierć komórek. W komórkach drożdży *Saccharomyces* ważną grupą tych związków są ceramidy, stanowiące niezbędny element szlaków sygnalizacji komórkowej. Udowodniono również, że w komórkach grzybów zasady sfingoidowe pełnią rolę regulacyjną, hamując kilka kluczowych enzymów biosyntezy fosfolipidowej. Sfingolipidy są również zaangażowane w syntezę glikozylofosfatydyloinozytolu u *Saccharomyces*, i są głównym magazynem długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (C24 i C26) [56 -58].

Pomimo podobieństwa szlaków biosyntezy sfingolipidów u ludzi i w komórkach grzybów, grzyby posiadają pewne enzymy unikatowe, które pozwalają na uzyskanie selektywności związków przeciwgrzybiczych. W tym przypadku można rozpatrywać trzy enzymy: palmitoilotransferazę serynową, syntazę ceramidową i syntazę inozytolofosfoceramidu (IPC). Z naturalnych źródeł wyselekcjonowano inhibitory każdego z tych enzymów. Przykłady tych związków i źródła ich pozyskiwania przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Naturalne inhibitory biosyntezy sfingolipidów.

Związek	Gatunek, z którego są otrzymanywane
Sfingofunginy	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Paecilomyces variotii</i>
Lipoksamycyna	<i>Streptomyces</i> sp.
Wiridiofunginy	<i>Trichoderma viride</i>
Myriocyna	<i>Isaria sinclairii</i>
Fumonizyna B1	<i>Fusarium moniliforme</i>
Australifungina	<i>Sporormiella australis</i>
Aureobazydyna A	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Khafrefungina	Niezidentyfikowany organizm
Rustmicyna	<i>Micromonospora chalcea</i> <i>Streptomyces galbus</i> <i>Micromonospora</i> sp.
Galbonolid B	<i>Micromonospora</i> sp.
Minimoidyna	<i>Sporormiella minimoides</i>

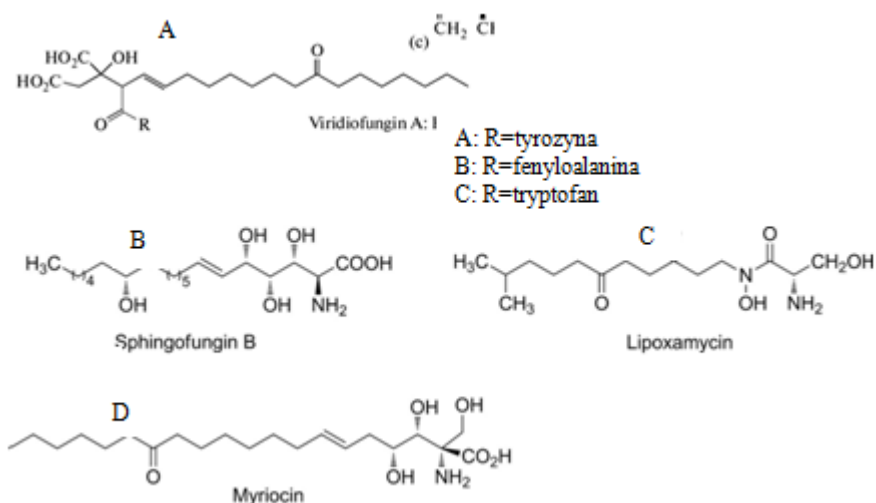
Źródło: [17]

4.1. Inhibitory palmitoilotransferazy serynowej

Jedną z grup inhibitorów tego enzymu są sfingofunginy oznaczone od A do F, które stanowią rodzinę związków strukturalnie przypominających długołańcuchowe zasadowe produkty pośrednie w szlaku sfingolipidowym. Są to środki przeciwgrzybicze o szerokim spektrum aktywności, hamujące wzrost różnych gatunków *Candida* oraz wykazujące szczególnie silne działanie przeciwko *C. neoformans*, lecz nieaktywne wobec grzybów nitkowatych [59, 60].

Innymi inhibitorami są lipoksamycyna (rysunek 6C) i jej analogowy produkt fermentacji hydroksylipoksamycyna, które zawierają długie łańcuchy alkilowe i aminowe polarne ugrupowania, lecz nie stanowią analogów zasad sfingoidowych jak sfingofunginy. Obydwa związki wykazują działanie przeciwgrzybicze wobec szerokiego panelu ludzkich patogenów, m.in. szczepów *Candida* i *C. neoformans* [55].

Aktywność palmitoilotransferazy serynowej jest również hamowana przez wiridiofunginy A, B i C (rysunek 6A). Są to związki o silnym działaniu przeciwgrzybiczym wobec takich patogenów jak *C. neoformans*, różnych gatunków *Candida* i *A. fumigatus*. Jednocześnie nie są tak specyficzne wobec palmitoilotransferazy serynowej jak dwie poprzednie grupy, ponieważ wykazują aktywność również wobec syntazy skwalenu i innych enzymów, które są wrażliwe na kwasy dikarboksyłowe, chociaż w wyższych stężeniach niż w przypadku palmitoilotransferazy serynowej [61]. Niestety, wykorzystanie opisanych inhibitorów jako leków okazało się być niemożliwe, ponieważ związki te wykazują również silną aktywność przeciwko enzymom ssaków [54, 55, 59].

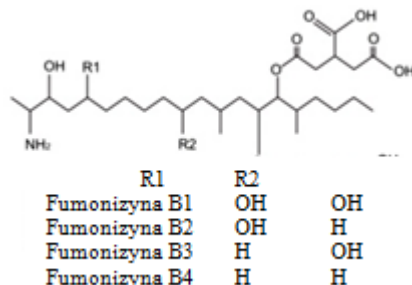


Rysunek 6. Inhibitory palmitoilotransferazy serynowej: A-wiridiofunginy A, B, C, B-sfingofungina B, C-lipoksamycyna, D-myriocyna. Źródło: [17]

Inhibitorem palmitoilotransferazy serynowej jest również inny naturalny produkt izolowany z grzyba *Isaria sinclairii*, silny immunosupresant ISP-1/myriocyna [62].

4.2. Inhibitory syntazy ceramidowej

Jedną z naturalnych grup inhibitorów syntazy ceramidowej biorącej udział w biosyntezie sfingolipidów są fumonizyny (rys. 7). Chociaż wykazano skuteczność fumonizyny B1 w hamowaniu tego enzymu u grzybów w badaniach *in vitro*, niestety aktywność ta jest ograniczona ze względu na słabą penetrację do komórek grzybów [57].



Rysunek 7. Struktury chemiczne fumonizyn. Źródło: [63]

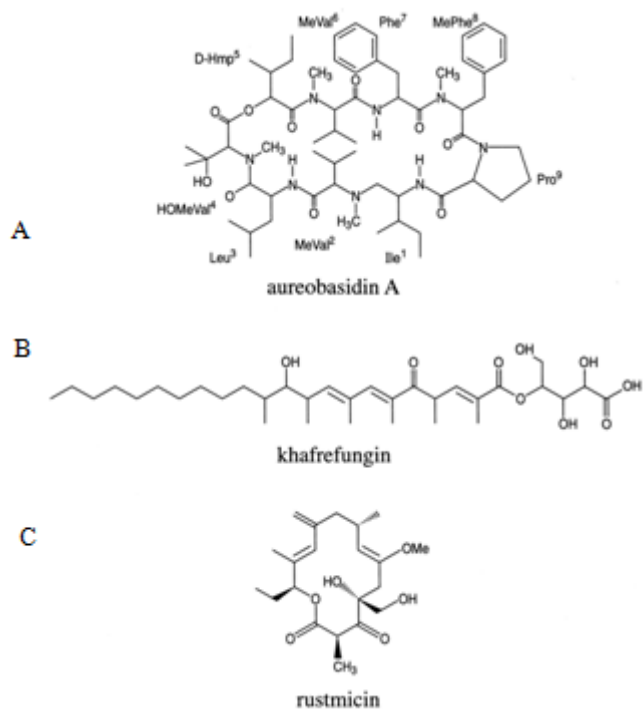
Kolejnym inhibitorem syntazy ceramidowej jest australifungina, związek przeciwgrzybiczy zawierający unikalne strukturalne połączenie dwóch grup funkcyjnych: α -diketonu i β -ketoaldehydu. Szczególnie wysoką aktywność wykazuje przeciw *Candida pseudotropicalis*, *C. tropicalis* i *C. neoformans*. Ograniczeniem stosowania tego antybiotyku jest słaba selektywność w stosunku do komórek ssaczych. Stwierdzono m.in., że australifungina hamuje aktywność syntazy ceramidowej w ludzkich komórkach nowotworu HepG2 (z ang. *liver hepatocellular cells*) [55].

4.3. Inhibitory syntazy inozytolofosfoceramidu (IPC)

W przypadku tego enzymu zidentyfikowano grupę cyklicznych depsiptydów o nazwie aureobazydyny, oznaczone od A do R. Są to związki o wysokim potencjale przeciwgrzybiczym, szczególnie wobec *C. albicans*, z czego aureobazydyny A, B, C i E są najsilniejsze [64].

Podobną aktywność biologiczną wykazuje również khafrefungina. Jest to naturalny związek o szerokim spektrum aktywności przeciwgrzybiczej, najsilniej działający na *C. albicans* [65].

Identyczny sposób działania przeciwgrzybiczego wykazała również rustmicyna (znana również jako galbonolid A). Jest to makrolidowy środek przeciwgrzybiczy o silnej aktywności wobec *Puccinia graminis*, *Botrytis cinerea* i kilku innym fitopatogenom. Związek ten wykazuje również działanie wobec patogenów ludzkich, zwłaszcza *C. neoformans* [66, 67].



Rysunek 8. Inhibitory syntazy IPC: A- aureobazydyna A, B- khafrefungina, C- rustmicyna. Źródło: [68]

Co ciekawe jednym z niewielu ludzkich patogenów niewrażliwych na wszelkie znane inhibitory syntazy IPC jest *A. fumigatus*, chociaż niektóre inhibitory wcześniejszych etapów biosyntezy sfingolipidowej hamują wzrost tego organizmu [55, 61]. Powód tej oporności jest nieznan. Khafrefungina co prawda hamuje wzrost tego grzyba, ale w o wiele wyższych stężeniach niż w przypadku innych gatunków. Khafrefungina i rustmicyna nie wykazują wpływu na syntezę lipidów w komórkach ssaków [65]. Ponadto rustmicyna i aureobazydyna nie wykazują toksyczności w badaniach na zwierzętach, co potwierdza, że syntaza IPC stanowi selektywny punkt uchwytu terapii przeciwgrzybiczej [64, 66]. Struktury wybranych inhibitorów IPC przedstawiono na rysunku 8.

4.4. Inhibitory elongacji kwasów tłuszczowych

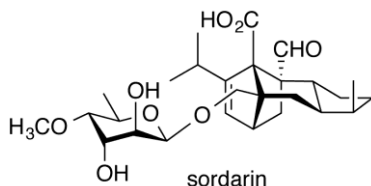
Inny mechanizm hamowania syntezy sfingolipidów opiera się na blokowaniu szlaku wydłużania kwasów tłuszczowych co pozbawia syntazę ceramidową substratu. Aktywność taką wykazuje minimoidyna wyizolowana z *Sporomiella minimoides* [69].

5. Inhibitory syntezy białek

Synteza białek zawsze była uważana za jeden z bardziej atrakcyjnych punktów uchwytu w opracowywaniu nowych środków przeciwdrobnoustrojowych. Jednak wykorzystanie tego celu molekularnego w terapii przeciwgrzybiczej nie jest łatwym zadaniem, ze względu na eukariotyczny charakter grzybów, a tym samym duży stopień podobieństwa mechanizmów syntezy białka w komórkach grzybów i ssaków.

W tym przypadku wykorzystano dwa cele molekularne, niezbędne dla syntezy białek grzybów, czynniki elongacji EF3 i EF2. Pierwszy wymagany jest jedynie przez rybosomy grzybów [71,72], natomiast drugi posiada co najmniej jedno funkcjonalne rozróżnienie w porównaniu ze swoim odpowiednikiem u ssaków [73,74].

Najważniejszą rodziną środków przeciwgrzybiczych działających na poziomie syntezy białek są sordaryny (rys. 9). Pierwszy związek z tej grupy został wyizolowany z grzyba *Sordaria araneosa* i opatentowany w 1969 r. pod nazwą SL [17, 74]. Obecnie stosowane sordaryny są silnymi inhibitorami translacji, o bardzo wysokim poziomie selektywności. Ich aktywność opiera się na specyficznej interakcji z czynnikiem EF2. Wszystkie związki tej klasy wykazują aktywność wobec *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefir* i *C. neoformans*. Brak aktywności sordaryn przeciwko *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. parapsilosis* w porównaniu z bardzo wysokimi poziomami aktywności przeciwko *C. albicans*, sugeruje, że związki te wykazują wysoką specyficzność wiązania ze swoim celem molekularnym [74].



Rysunek 9. Sordaryna. Źródło: [19]

Po odkryciu sordaryn w kolejnych latach wyizolowano związki pokrewne strukturalnie, z różnych gatunków grzybów, których przykłady umieszczono w tabeli 3.

Tabela 3. Inhibitory syntezy białka u grzybów.

Związek	Gatunek, z którego są otrzymywane
Sordaryna	<i>Sordaria araneosa</i>
Zofimarin	<i>Zopfiella marina</i>
BE31405	<i>Penicillium minioluteum</i>
SCH57404	Niezidentyfikowany grzyb
Ksylarin	<i>Xylaria</i> sp.
Hypoksysordaryna	<i>Hypoxylon croceum</i>
GR135402	<i>Graphium putredinis</i>

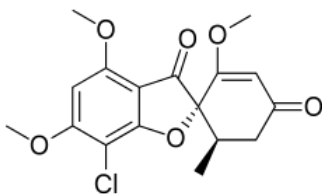
Źródło:[17]

Skuteczność terapeutyczna sordaryn zaowocowała opracowaniem nowych pochodnych o wyższej aktywności wobec patogenów grzybowych i ulepszonych właściwościach farmakologicznych. Opracowano nową grupę pochodnych, azasordaryny, które wykazują znaczącą aktywność przeciw gatunkom *Candida*, w tym również opornym na flukonazol, *C. parapsilosis*, *P. carinii*, *Rhizopus arrhizus* i *Blastoschizomyces capitatus*. Ponadto azasordaryny wykazują niską cytotoksyczność [75, 76].

Silne działanie o szerokim spektrum *in vitro* i fakt, że niektóre sordaryny są skuteczne po podaniu doustnym w modelach zwierzęcych uzasadniają zainteresowanie rozwojem i ulepszaniem kolejnych pochodnych tej grupy inhibitorów i ich wykorzystaniem w terapii przeciwgrzybiczej.

6. Inhibitory syntezy mikrotubuli

Mikrotubule są dynamicznymi dimerami α - i β -tubuliny, które tworzą wysoce zorganizowany szkielet we wszystkich komórkach eukariotycznych. Skutecznym i selektywnym antybiotykiem przeciwgrzybiczym jest gryzeofulwina (rys. 10), ekstrahowana z *Penicillium griseofulvum*, która hamuje produkcję mikrotubuli i tym samym blokuje mitozę. Gryzeofulwina jest stosowana u ludzi i zwierząt w leczeniu zakażeń grzybiczych skóry, włosów oraz paznokci. Jej niewątpliwą zaletą jest możliwość podania doustnego [19].



Rysunek 10. Struktura chemiczna gryzeofulwiny. Źródło: [19]

7. Inhibitory transportu elektronów w mitochondriach

W opracowywaniu skutecznej terapii przeciwgrzybiczej podjęto również próby wykorzystania jednego z kluczowych i podstawowych procesów zachodzących w komórce, mitochondrialnego transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. W tym kierunku testowano dwa związki UK2A, UK3A, strukturalnie zbliżone do antimycyny A. Substancje te zostały wyizolowane z różnych gatunków *Streptomyces*. Składają się z dziewięciocłonowego pierścienia dilaktonu. Wykazują szerokie spektrum aktywności obejmujące *C. albicans* i gatunki *Aspergillus*, ze skutecznością porównywalną antimycyną A. Co ważne są mniej toksyczne wobec komórek gospodarza niż ten antybiotyk [77, 78].

8. Podsumowanie

Produkcja metabolitów o aktywności przeciwgrzybiczej jest powszechna u drobnoustrojów, jednak możliwości wykorzystania ich jako potencjalnych leków są ograniczone, a powodów tych ograniczeń jest kilka.

Badania przesiewowe prowadzone w celu identyfikacji nowych antybiotyków wskazują na słabe zróżnicowanie chemiczne związków, co ogranicza ich właściwości biologiczne. W poszukiwaniu nowych terapii przeciwgrzybiczych istotne jest opracowanie innowacyjnych rozwiązań opartych m.in. na pozyskaniu nowych związków na znane lub zupełnie nowe cele molekularne.

Kolejny problem to często zbyt słabe aktywności i wąskie spektrum działania tych związków, co czyni je mało atrakcyjnymi przede wszystkim z ekonomicznego punktu widzenia.

Istotnym aspektem jest również trudność w uzyskaniu specyficzności wobec patogennych grzybów w stosunku do eukariotycznych komórek gospodarza.

Wreszcie, wiele związków z obiecującą aktywnością *in vitro* jest nieaktywna lub słabo aktywna w badaniach przedklinicznych lub klinicznych. Może to wynikać z ich właściwości farmakokinetycznych, słabej absorpcji, inaktywacji w komórkach, czy wysokich wartości klirensu.

Z drugiej jednak strony ogromna ilość metabolitów wtórnych drobnoustrojów daje duże możliwości pozyskania nowych leków przeciwgrzybiczych. Do niedawna, zagrażające życiu zakażenia grzybicze były leczone tylko przez zastosowanie azoli czy amfoterycyny B. Mimo, że nowe generacje triazoli są znacznie ulepszone w porównaniu z poprzednimi związkami tej klasy, pojawiły się szczepy odporne na ich działanie. Amfoterycyna B wykazuje szerszy i skuteczniejszy profil aktywności, ale także niepożądaną toksyczność. Chociaż nowy liposomalny preparat antybiotyku jest bardziej bezpieczny, nadal problemem pozostaje niska specyficzność antybiotyku. Poszukiwanie nowych rozwiązań i możliwości leczenia grzybic wśród naturalnych mikrobiologicznych metabolitów zaowocowało pozyskaniem nowego leku kaspofunginy. Ten, jeden z najnowszych antybiotyków jest skuteczny w terapii inwazyjnej aspergilozy i kandydozy. Ogromny potencjał wykazują inhibitory syntezy glukanu i pochodne sordaryn, w kierunku których prowadzone są intensywne badania, które być może w niedalekiej przyszłości zakończą się kolejnym sukcesem.

Literatura

1. Mayer F. L., Wilson D. Hube B. *Candida albicans pathogenicity mechanisms*, Virulence., 4 (2013), s. 119–128.
2. Kathiravan M. K., Salake A. B., Chothe A.S, Dudhe P. B., Watode R.P., Mukta M. S., Gadhw S. *The biology and chemistry of antifungal agents: a review*, Bioorganic & Medicinal Chemistry., 1;20(19) (2012), s. 5678-98.
3. Beck-Sague C.M., Jarvis W.R. *Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. 1980–90. National Nosocomial Infections Surveillance System.*, The Journal of Infectious Diseases., 167 (1993), s. 1247–51.
4. Diamond R.D. *The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus*, Reviews of infectious diseases., 13 (1991),s. 480–6.

5. Onnis V., De Logu A., Cocco M. T., Fadda R., Meleddu R., Congiu C. *2-Acylhydrazino-5-arylpyrrole derivatives: synthesis and antifungal activity evaluation*, The European Journal of Medical Chemistry., 44 (2009), s. 1288-95.
6. Georgopapadakou N. H. *Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs*, Current Opinion in Microbiology., 1 (1998), s. 547-557.
7. Mehta S. K., Stevens D. A., Mishra S. K., Feroze F., Pierson D. L. *Diagn. Distribution of Candida albicans genotypes among family members*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease., 34 (1999), s. 19-25.
8. De Pauw B. E., Picazo J. J. *Present situation in the treatment of invasive fungal infection*, International Journal of Antimicrobial Agents., 32 (2008), s. 167-71.
9. Hoyer L. L. *The ALS gene family of Candida albicans*, Trends in Microbiology., 9 (2001), s. 176-80.
10. Tourneau H., Serneels J., Van Dijck P. *Fungal pathogens research: novel and improved molecular approaches for the discovery of antifungal drug targets*, Current Drug Targets., 6 (2005), s. 909-22.
11. Krcmery V., Barnes A. J. J. *Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance*, Journal of Hospital Infection., 50 (2002), s. 243-60.
12. Swinne D., Wattle M., Suetens C., Mertens K., Fonteyne P. A., Nolard N. A. *A one-year survey of candidemia in Belgium in 2002*, Epidemiology and Infection., 132 (2004), s. 1175-80.
13. Lin S. J., Schranz J., Teutsch S. M. *Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature*, Clinical Infectious Diseases., 32 (2001), s. 358-66.
14. Georgopapadakou N.H., Walsh T.J. *Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogen*, Science., 264 (1994), s. 371-3.
15. Carledge J.D., Midgley J., Gazzard B.G. *Clinically significant azole cross-resistance in Candida isolates from HIV-positive patients with oral candidiasis*, AIDS., 11 (1997), s. 1839-44.
16. Granier F. *Invasive fungal infections. Epidemiology and new therapies*, Presse Medicale., 29 (2000), s. 2051-60.
17. Vicente M.F., Basilio A., Cabello A., Peláez F. *Microbial natural products as a source of antifungals*, Clinical Microbiology and Infection., 9 (2003), s. 15-32.
18. Jensen R.H. *Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment*, Danish Medical Journal 63 (2016), s. 5288.
19. Sharma P., Kumar D., Mahajan G., Minto M.J. *Complete update on antifungal therapy*, International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences., 3 (2016), s. 1- 9.
20. Andriole V.T. *Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy*, International Journal Antimicrobial Agents., 16 (2000), s. 317-21.
21. Onishi J., Meinz M., Thompson J., Curotto, Dreikorn J. S., Rosenbach M., Douglas C., Abruzzo G., Flattery A., Kong L., Cabello A., Vicente F., Pelaez F., Diez M.T., Martin I., Bills G., Giacobbe R., Dombrowski A., Schwartz R., Morris S., Harris G., Tsiouras A., Wilson K., Kurtz M. B. *Discovery of Novel Antifungal (1,3)- β -D-Glucan Synthase Inhibitors*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 44 (2000), s. 368-377.
22. Nyfeler R., Keller S.W. *Metabolites of microorganisms. Echinocandin B, a novel polypeptideantibiotic from Aspergillus nidulans var. echinulatus: isolation and structural components*, Helvetica Chimica Acta., 57 (1974), s. 2459-77.

23. Bouffard F.A., Zambias R.A., Dropinski J.F. *Synthesis and antifungal activity of novel cationic pneumocandin B_o derivatives*, Journal of Medicinal Chemistry., 37 (1994), s. 222–5.
24. Abruzzo G.K., Flattery A.M., Gill C.J. *Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L- 743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis and cryptococcosis*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 41 (1997), s. 2333–8.
25. Powles M.A., Liberator P., Anderson J. *Efficacy of MK-991 (L-743,872), a semisynthetic, pneumocandin, in murine models of Pneumocystis carini*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 42 (1998), s. 1985–9.
26. González G.M., Tijerina R., Najvar L.K. *Correlation between antifungal susceptibilities of Coccidioides immitis in vitro and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 45 (2001), s. 1854–9.
27. Arathoon A., Gotuzzo E., Noriega L. *A randomized, double-blind, multicenter trial of MK-0991, an echinocandin antifungal agent, vs. amphotericin B for the treatment (Tx) of oropharyngeal (OPC) and esophageal (EC) candidiasis in adults*, Clinical Infection and Diseases., 27 (1998), s. 939–49.
28. Akins R.A. *An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in Candida albicans*, Medical Mycology., 43 (2005), s. 285-318.
29. Wiederhold N.P., Lewis R.E. *The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy*. Expert Opinion on Investigational Drugs., 12 (2003),s. 1313-33.
30. van Burik J.A., Ratanatharathorn V., Stepan D.E., Miller C.B., Lipton J.H., Vesole D.H., Bunin N., Wall D.A., Hiemenz J.W., Satoi Y., Lee J.M., Walsh T.J., National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *Micafungin versus fluconazole for prophylaxis against invasive fungal infections during neutropenia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation*, Clinical Infection and Diseases., 15 (2004), s. 1407-16.
31. Dowell J.A., Knebel W., Ludden T., Stogniew M., Krause D., Henkel T.J. *Population pharmacokinetic analysis of anidulafungin, an echinocandin antifunga*, Clinical Pharmacology., 44 (2004), s. 590-8.
32. Arévalo M.P., Carrillo-Muñoz A.J., Salgado J., Cardenas D., Brió S., Quindós G., Espinel-Ingroff A.J. *Antifungal activity of the echinocandin anidulafungin (VER002, LY-303366) against yeast pathogens: a comparative study with M27-A microdilution method*. Antimicrobial Chemotherapy., 51 (2003),s. 163-6.
33. Ohyama T., Kurihara Y., Ono Y. *Arborcandins A, B, C, D, E and F, novel 1, 3-j-glucan synthase inhibitors: production and biological activity*, The Journal of Antibiotics., 53 (2000),s. 1108–16.
34. Fujie A., Iwamoto T., Muramatsu H. *FR901469, a novel antifungal antibiotic from an unidentified fungus no. 11243 I. Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical properties and biological properties*, Journal of Antibiotics., 53 (2000), s. 912–19.
35. Kaida K., Fudou R., Kameyama T. *New cyclic depsipeptide antibiotics, clavariopsins A and B, produced by an aquatic hyphomycete, Clavariopsis aquatica. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties*, Journal of Antibiotics., 54 (2001), s. 17–21.
36. Traxler P., Gruner J., Auden A. *Papulacandins, a new family of antibiotics with antifungal activity. I. Fermentation, isolation, chemical and biological characterization of papulacandins A, B, C, D and E*, Journal of Antibiotics., 30 (1977), s. 289–96.
37. Georgopapadakou N.H., Tkacz J.S. *The fungal cell wall as a drug target*, Trends in Microbiology., 3 (1995), s. 98–104.

38. Van der Kaaden M., Breukink E., Pieters R. J. *Synthesis and antifungal properties of papulacandin derivatives*, Beilstein Journal of Organic Chemistry., 8 (2012), s. 732–737.
39. Cabello M.A., Platas G., Collado J. *The discovery of arundifungin, a novel antifungal compound produced by fungi. Biological activity and taxonomy of the producing organisms*, International Microbiology., 4 (2001), s. 93–102.
40. Peláez F., Cabello A., Platas G. *The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic Hormonema species. Biological activity and taxonomy of the producing organism*, Systematic and Applied Microbiology., 23 (2000), s. 333–43.
41. Vicente M.F., Cabello A., Platas G. *Antimicrobial activity of ergokonin A from Trichoderma longibrachiatum*, Journal of Applied Microbiology., 91 (2001), s. 806–13.
42. Ruiz-Herrera J., Sentandreu R., Martinez JP. *Chitin biosynthesis in fungi*. In: Arora DK, Elander RP, Mukerji KG, eds. Handbook of Applied Mycology. New York: Marcel Dekker., 4 (1992), s. 281–312.
43. Shaw J.A., Mol P.C., Bowers B. *The function of chitin synthases 2 and 3 in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle*, Journal of Cell Biology., 114 (1991), s. 111–23.
44. Gabib E. *Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from Saccharomyces cerevisiae by polyoxin D and nikkomycins*, Antimicrobial Agents Chemotherapy., 35 (1991), s. 170–3.
45. Cohen E. *Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action*, Archives of Insect Biochemistry and Physiology., 22 (1993), s. 245–61.
46. Hwang E.I., Yun B.S., Kim Y.K. *Phellinsin A, a novel chitin synthesis inhibitor produced by Phellinus sp. Pl3*, The Journal of Antibiotics., 53 (2000), s. 903–11.
47. Vijayakumar E.K.S., Roy K., Chatterjee S. *Arthrichitin. A new cell wall active metabolite from Arthrinium phaeospermum*, Journal of Organic Chemistry., 61 (1996), s. 6591–3.
48. Schlingmann G., Milne L., Williams D.R. *Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus Hypoxylon oceanium LL-15G256 II. Isolation and structure determination*, The Journal of Antibiotics., 51 (1998), s. 303–16.
49. Van Der Vaart J.M., Van Schagen F.A., Mooren A.T. *The retention mechanism of cell wall proteins in Sccharomyces cerevisiae. Wall bound Cwp2p is b1, 6-glucosylated*, Biochimica and Biophysica Acta., 1291 (1996), s. 206–14.
50. Oki T., Konishi M., Tomatsu K. *Pradimicin, a novel class of potent antifungal antibiotics*, The Journal of Antibiotics., 41 (1988), s. 1701–4.
51. Takeuchi T., Hara T., Naganawa H. *New antifungal antibiotics benanomicins A and B from an Actinomycete*, The Journal of Antibiotics., 41 (1988), s. 807–10.
52. Fromtling R.A. *Human mycoses and current antifungal therapy*, Drug News Perspect., 111 (1998), s. 185–91.
53. Wells G.B., Lester R.L. *The isolation and characterization of a mutant strain of Saccharomyces cerevisiae that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids*, The Journal of Biological Chemistry., 258 (1983), s. 10200–3.
54. Zweerink M.M., Edison A.M., Wells G.B., Pinto W., Lester R.L. *Characterization of a novel, potent, and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase*, The Journal of Biological Chemistry., 267 (1992), s. 25032–8
55. Mandala S.M., Thornton R.A., Frommer B.R. *The discovery of australifungin, a novel inhibitor of sphinganine N-acyltransferase from Sporormiella australis. Producing organism, fermentation, isolation and biological activit*, The Journal of Antibiotics., 48 (1995), s. 349–56

56. Nickels J.T., Broach J.R. *A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G1 arrest of Saccharomyces cerevisiae*, Genes and Development., 10 (1996), s. 382–94.
57. Wu W.I., McDonough V.M., Nickels J.T. Jr *Regulation of lipid biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae by fumonisin B1*, The Journal of Biological Chemistry., 270 (1995), s. 13171–8.
58. Oh C.S., Toke D.A., Mandala S., Martin C.E. *Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Saccharomyces cerevisiae*, The Journal of Biological Chemistry., 272 (1997), s. 17376–84.
59. Horn W.S., Smith J.L., Bills G.F. *Sphingofungins E and F. Novel serine palmitoyltransferase inhibitors from Paecilomyces variotii*, The Journal of Antibiotics., 47 (1992), s. 376–9.
60. Van Middlesworth F.M., Giacobbe R.A., Lopez M. *Sphingofungins A, B, C, and D; a new family of antifungal agents. I. Fermentation, isolation and biological activity*, The Journal of Antibiotics., 45 (1992), s. 861–7.
61. Onishi J.C., Milligan J.A., Basilio A. *Antimicrobial activity of viridiodfungins*, The Journal of Antibiotics., 50 (1997), s. 334–8.
62. Miyake Y., Kozutsumi Y., Nakamura S., Fujita T., Kawasaki T. *Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine.like immunosuppressant, ISP.1/Myriocin*, Biochemical and Biophysical Research Communications., 211 (1995), s. 396–403.
63. Delgado A., Casas J., Llebaria A., Abad J. L., Fabrias G. *Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes*, Biochimica et Biophysica Acta., 1758(12) (2007), s. 1957-77.
64. Takesako K., Ikai K., Haruna F. *Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation, and properties*, The Journal of Antibiotics., 44 (1991), s. 919–22.
65. Mandala S.M., Thornton R.A., Rosenbach M. *Khafrefungin, a novel inhibitor of sphingolipid synthesis*, The Journal of Biological Chemistry., 272 (1997), s. 32709–14.
66. Takatsu T., Nakayama H., Shimazu A. *Rustmicin, a new macrolide antibiotic active against wheat stem rust fungus*, The Journal of Antibiotics., 38 (1985), s.1806–9.
67. Fauth U., Zahner H., Muhlenfeld A., Achenbach H., Galbonolides A and B- two non glycosidic antifungal macrolides. The Journal of Antibiotics., 39, (1986), s. 1760–4.
68. Cardenas M.E., Cruz C., del Poeta M., Chung N., Perfect J. R., Heitman J. *Antifungal Activities of Antineoplastic Agents: Saccharomycescerevisiaeas a Model System To Study Drug Action*, Clinical Microbiology Reviews., 1 (1999), s. 583–611.
69. Mandala S.M., Harris G.H. *Isolation and characterization of novel inhibitors of sphingolipid synthesis: australifungin, viridiodfungins, rustmicin, and khafrefungin*, Methods in Enzymology., 311 (2001), s. 335–48.
70. Kamath A., Chakraburty K. *Role of yeast Elongation Factor 3 in the Elongation Cycle*, The Journal of Biological Chemistry., 264 (1989), s. 15423–8.
71. Skogerson L., Engelhardt D. *Dissimilarity in chain elongation factor requirements between yeasts and rat liver ribosomes*. The Journal of Biological Chemistry., 252 (1977), s. 1471–5.
72. Dominguez J.M., Kelly V.A., Kinsman O.S., Marriot M.S., Gomez de las Heras F., Martin J.J. *Sordarins: a new class of antifungal with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts*. Antimicrobial Agents Chemotherapy., 42 (1998), s. 2274–8.

73. Justice M., Hsu M.J., Tse B. *Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis*, The Journal of Biological Chemistry., 273 (1998), s. 3148–51.
74. Dominguez J.M., Martin J.J. *Identification of elongation Factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in Candida albicans*, Antimicrobial Agents Chemotherapy., 42 (1998), s. 2279–83.
75. Herreros E., Martinez A., Almela M. *Preliminary toxicology of azasordarins*, [abstract 1691]. In: Proceedings of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto. American Society for Microbiology: Washington, DC, (2000), 389.
76. Herreros E., Almela M.J., Lozano S. *Antifungal activities and cytotoxicity studies of six new azasordarins*. Antimicrobial Agents Chemotherapy., 45 (2001), s. 3132–9.
77. Ueki M., Abe K., Hanafi M., Shibata K., Tnaka T., Taniguchi M. *UK-2A, B and C, novel antifungal antibiotics from Streptomyces sp. Fermentation, isolation, and biological properties*, The Journal of Antibiotics., 49 (1996), s. 639–43.
78. Ueki M., Kusumoto A., Hanafi M., Shibata K., Tnaka T., Taniguchi M. *UK-3A, a novel antifungal antibiotics from Streptomyces sp. Fermentation, isolation, structural elucidation and biological properties*, The Journal of Antibiotics., 50 (1997), s. 551–5.

Substancje o potencjale przeciwwgrzybiczym produkowane przez mikroorganizmy

Streszczenie

Wtórne metabolity mikroorganizmów stanowią niewyczerpane źródło potencjalnych leków przeciwdrobnoustrojowych, przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Często są wykorzystywane jako farmakofory syntetycznych i półsyntetycznych pochodnych o polepszonych właściwościach farmakologicznych. Dotychczas opisano prawie 20 000 metabolitów drobnoustrojów. Ogromna ich liczba i różnorodność przyczyniła się w znaczący sposób do skutecznego leczenia infekcji bakteryjnych w ubiegłym stuleciu. Natomiast w leczeniu zakażeń grzybiczych nadal dostępne są ograniczone ilości środków terapeutycznych (polieny, azole, echinokandyny). Ponadto, w ciągu ostatniej dekady obserwowany jest wzrost częstotści występowania ogólnoustrojowych zakażeń grzybiczych. Z tego powodu pilną potrzebą jest opracowywanie nowych antymikotyków, wykazujących zupełnie nowe mechanizmy działania. Obecnie w różnych fazach badań znajduje się szereg środków przeciwwgrzybiczych, wytwarzanych przez drobnoustroje. Związki te obejmują inhibitory syntezy składników ścian komórkowych, inhibitory syntezy sfingolipidów, syntezy białek, oraz destabilizatory błon komórkowych.

Słowa kluczowe: substancje przeciwwgrzybicze, metabolity wtórne, antybiotyki

Substances with antifungal potential produced by microorganisms

Abstract

Secondary metabolites of microorganisms are an inexhaustible source of potential antimicrobial, antiviral and antitumor drugs. They are often used as pharmacophore of synthetic and semi-synthetic derivatives with improved pharmacological properties. Hitherto, nearly 20,000 microbial metabolites have been described. Their large amount and variety has contributed significantly to the successful treatment of bacterial infections in the last century. In contrast, limited amounts of therapeutic agents (polyenes, azoles, echinocandins) are still available in the treatment of fungal infections. In addition, over the past decade there has been an increase in the incidence of systemic fungal infections. For this reason, it is urgent to develop new antifungal drugs with completely new mechanisms of action. Currently, various antimycotics produced by microorganisms are tested in different phases of research. These compounds belong to the inhibitors of the synthesis of cell wall components, inhibitors of sphingolipids synthesis, protein synthesis, and destabilizers of cell membranes.

Keywords: Antifungal agents, secondary metabolites, antibiotics

Związki biologicznie czynne obecne w grzybach wyższych

1. Wstęp

Grzyby są spożywane przez ludzi głównie ze względu na ich walory smakowe, jednak coraz częściej doceniane są także aspekty prozdrowotne. Grzyby posiadają większą ilość białka niż znaczna część warzyw, są bogatym źródłem minerałów, witamin i błonnika pokarmowego, zawierają mało lipidów i są niskokaloryczne [1]. Są one źródłem związków biologicznie czynnych, które wspomagają układ immunologiczny, zapobiegają chorobom zagrażającym życiu, takim jak choroby serca, nadciśnienie tętnicze, udary mózgu, nowotwory (Tab. 1). Mają one również działanie przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, hipolipemizujące oraz przeciwwakrzepowe. [2]. Grzyby dziko rosnące wykazują wyższą zawartość związków bioaktywnych, niż grzyby uprawiane. Jest to związane z pochodzącymi z natury czynnikami stresowymi, które w mniejszym stopniu dotyczą grzybów uprawianych [1].

Do pozyskiwania związków biologicznie czynnych z grzybów alternatywą dla tradycyjnej uprawy i zbioru owocników jest uprawa samej grzybni. Uprawa grzybni jest mniej wymagająca i mniej czasochłonna, gdyż czas potrzebny na jej wzrost jest krótszy niż okres powstawania owocników. Z tego też względu pozyskiwanie związków z grzybów jest bardziej opłacalne niż z roślin, które zwykle potrzebują więcej czasu na wzrost [3].

Celem niniejszego przeglądu literatury jest przedstawienie najnowszych doniesień na temat dobroczynnego wpływu związków zawartych w grzybach wyższych na organizm człowieka.

2. Działanie związków biologicznie czynnych zawartych w grzybach

2.1. Działanie antynowotworowe

Działanie immunomodulacyjne substancji zawartych w grzybach polega na pobudzaniu komórek układu odpornościowego (m.in. makrofagów, limfocytów T, komórek NK) do produkcji cytokin takich jak: TNF- α (ang. Tumor Necrosis Factor Alfa), IFN- γ (ang. Interferon Gamma) oraz IL-1b (ang. interleukin 1b), które mogą hamować proliferację komórek nowotworowych oraz indukować ich apoptozę [4]. Takie działanie wykazują, np. preparaty z grzybów Shiitake, które pozbawione

¹ qaula16822@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, <https://www.cm.umk.pl/wydzialy/wydzialfarmaceutyczny/jednostki-wydzialowe/katedrapatobiochemii-i-chemii-klinicznej.html>

² igaholynska@cm.umk.pl, Pracownia Elektrofizjologii Skóry i Tkanki Nabłonkowej, Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, <https://www.cm.umk.pl/wydzialy/wydzialfarmaceutyczny/jednostki-wydzialowe/katedrapatobiochemii-i-chemii-klinicznej.html>

endotoksyny LPS (lipopolisacharyd), mają działanie immunostymulujące, które związane jest z aktywacją monocytów i może prowadzić do zwalczania komórek nowotworowych [5]. Polisacharydy zwarte w *Ganoderma lucidum* hamują angiogenezę, która jest charakterystyczna dla etapu progresji nowotworu. Posiadają one również możliwość hamowania produkcji tlenu azotu (NO), który jest czynnikiem indukującym angiogenezę w nowotworach [6].

2.2. Aktywność antyoksydacyjna

Aktywność antyoksydacyjna grzybów warunkowana jest obecnością związków biologicznie czynnych takich jak kwasy fenolowe. Mierzone stężenie kwasu p-hydroksybenzoowego, p-kumarowego i kwasu cynamonowego w grzybni i pożywkach hodowlanych jest zbliżona, a czasami nawet wyższa od tej, którą obserwujemy w owocnikach. Obecność tych związków w pożywkach hodowlanych spowodowana jest wpływem grzybni, a nie składnikami pożywki. Stwarza to możliwość wykorzystania pożywki, która zwykle jest tylko produktem ubocznym hodowli grzybów. Wadą wykorzystania pożywki hodowlanej jest fakt, że nie wszystkie związki odpowiedzialne za aktywność antyoksydacyjną są do niej uwalniane. W analizie przeprowadzonej przez Fedia Souillem i wsp. [3] wykazano, że w grzybni i podłożu hodowlanym *S. bellini* występuje większa aktywność antyoksydacyjna, niż w tych samych składnikach *P. eryngii*. Związki antyoksydacyjne zawarte w grzybach to fenole, polisacharydy, tokoferole, flawonoidy, karotenoidy, glikozydy, kwas askorbinowy [7]. Grzyby są również źródłem ergotioneiny i glutationu, wykazujących właściwości antyoksydacyjne [8]. Związki fenolowe wykazują aktywność przeciwutleniającą w układach biologicznych, działają jako inhibitory wolnych rodników, rozkładają nadtlenki, inaktywują metale i neutralizują reaktywne formy tlenu [9]. Właściwości antyoksydacyjne przypisuje się głównie β -glukanom – polisacharydom wchodzącym w skład ściany komórkowej grzybów [10]. Ze względu na zawartość antyoksydantów, spożywanie grzybów może wiązać się z redukcją chorób i zaburzeń związanych ze stresem oksydacyjnym.

2.3. Działanie przeciwzapalne

Istotne działanie regulacyjne w procesach zapalnych mają makrofagi, które są głównymi składnikami wrodzonego układu immunologicznego. Nadmierna produkcja mediatorów zapalnych powoduje niekorzystne konsekwencje w patogenezie chorób takich jak: cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory [11]. Bakteryjny LPS może indukować produkcję tlenu azotu, cytokin prozapalnych a także czynnika martwicy nowotworu w makrofagach. W badaniach oceny aktywności przeciwzapalnej grzybów wykorzystano linię komórkową RAW264.7 stymulowaną lipopolisacharydem bakteryjnym. W badaniach wykazano, że grzybnia *P. eryngii* posiada większą aktywność przeciwzapalną, niż forma owocnikowa tego grzyba. W formach owocnikowych za aktywność przeciwzapalną odpowiedzialne są zawarte w nich związki fenolowe. Przypuszcza się, że za aktywność przeciwzapalną grzybni odpowiedzialne są zawarte w niej heteropolisacharydy, triterpeny, i/lub karotenoidy [3].

2.4. Działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe

Grzyby mogą stanowić potencjalne źródło naturalnych antybiotyków, które mogą zostać wykorzystane przez człowieka. Związki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, obecne w grzybach wyższych umożliwiają im przetrwanie w środowisku naturalnym. Związki mające taką aktywność to m. in. kwas pentadekanowy, ergosterol, 5-hydroksymetylofurfaral [11]. W badaniach Sandrina Heleno i wsp. [12] wykazano, że ekstrakty fenolowe z *Volvopluteus gloiocephalus* i *Clitocybe subconnexa* posiadają większą aktywność antybakteryjną, niż liofilizowane próbki strawione alfa amylazą, proteazą i amylo-glukozydazą *in vitro*. Wszystkie przebadane próbki wykazywały większą aktywność przeciwbakteryjną niż ampicylina, niemal we wszystkich przypadkach również wyższą niż streptomycyna. Jeżeli chodzi o działanie przeciwgrzybicze to próbki strawione *in vitro* wykazywały podobne zachowanie co ekstrakt fenolowy. Wszystkie próbki wykazywały wyższą aktywność niż ketonazol, a w niemal wszystkich przypadkach również bifonazol.

Wśród poszczególnych kwasów fenolowych analizowanych przed trawieniem *in vitro*, najbardziej aktywny wobec: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, był kwas cyjanonowy, następnie kwasy p-hydroksybenzoesowy (DHA) i p-kumarynowy. Najniższą aktywność przeciwbakteryjną wykazywały kwas galusowy (DGA) i protokatecholowy (PA). Po trawieniu *in vivo* najwyższą aktywność antybakteryjną wykazywały kwasy p-hydroksybenzoesowy (DHA) i prokatecholowy (DPA), następnie p-kumarynowy oraz cyjanonowy (DCA). Najniższą aktywność wykazywał kwas galusanowy (DGA). Wśród poszczególnych kwasów fenolowych, kwas cyjanonowy (CA) wykazywał najwyższą aktywność przeciwgrzybiczną, a następnie kwas galusanowy (GA), protokatecholowy (PA) i p-hydroksybenzoesowy (HA), przy czym kwas p-kumarynowy wykazuje najniższą aktywność. W przypadku kwasów fenolowych strawionych *in vitro*, ich działanie przeciwgrzybicze było bardzo podobne [12].

Działanie antywirusowe wykazują triterpeny (np. kwas ganodermowy, ganodermadiol) oraz związki fenolowe [13, 14, 15]

Tabela 1. Działanie grzybów i substancje w nich zawarte wywierające korzystny wpływ na zdrowie człowieka [opracowanie własne na podstawie 3, 5, 6-8, 11, 13-16, 18, 21-23]

Funkcja	Substancje wykazujące działanie
antynowotworowa	glukany, lentinian, lektyny
bakterio-, grzybo-, wiruso-bójcza	triterpenoidy, antybiotyki, steroidy, kwasy fenolowe, ergosterol, 5-hydroksymetylofurfaral
przeciwalergiczna	kwasy ganodermowe
przeciwmiążdżycowa	lowastatyna, eritadenin, ergosterol
antyoksydacyjna	fenole, polisacharydy, tokoferole, flawonoidy, karotenoidy, glikozydy, kwas askorbinowy, ergotioneina, glutation
hipoglikemizująca	polisacharydy, lektyny, komatyna
stymulująca układ immunologiczny	lektyny
przeciwzapalna	związki fenolowe, heteropolisacharydy, triterpeny, karotenoidy

2.5. Działanie antyalergiczne

Za działanie antyalergiczne grzybów odpowiedzialna jest zawartość w nich kwasów ganodermowych C i D. Hamują one reakcję histaminową [16]. Również obecny w grzybach nadtlenek ergosterolu ma działanie immunosupresyjne w chorobach alergicznych [17].

Tabela. 2. Grupy związków biologicznie czynnych zawartych w grzybach i ich działanie [opracowanie własne na podstawie 2, 3, 5-8, 11, 13-16, 18, 20-23]

Grupy związków	Przykłady związków z danej grupy	Działanie
polisacharydy	pleuran, lentinian, genoderan, agarityna, calocyban	przeciwnowotworowe, immunomodulujące, antyoksydacyjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne
białka i peptydy	lektyny, białka immunomodulujące, rybonukleazy, lakaza	hamowanie proliferacji komórek nowotworowych, immunomodulujące
terpeny	monoterpeny, sesquiterpenoidy, flammilina, flammulinoidy, lanostan,	przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, antymalaryczne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne
antyoksydanty	fenole, tokoferol, kwas askorbinowy, karotenoidy	wspomaganie układu odpornościowego, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, łagodzenie toksycznego wpływu chemioterapii i radioterapii

2.6. Wpływ na układ sercowo-naczyniowy

Obecne w grzybach wyższych sterole wpływają ochronnie na układ sercowo-naczyniowy. Spożywanie fitosteroli, które są strukturalnie zbliżone do ergosterolu, jest związane z obniżaniem poziomu cholesterolu w surowicy krwi. Głównym steroidem zawartym w grzybach jest ergosterol będący także prekursorem witaminy D2 i naturalnym przeciwutleniaczem [18].

Ponadto, triterpenoidy zawarte w grzybach mają zdolność hamowania syntezy cholesterolu, obniżania ciśnienia krwi oraz zmniejszania agregacji płytek krwi, wpływając tym samym na zmniejszenie ryzyka występowania chorób układu sercowo-naczyniowego [19]. Natomiast, eritadenin wykazuje zdolność do przyspieszania wydalania cholesterolu endogennego i jego metabolitów oraz zmniejszenia produkcji homocysteiny, która jest czynnikiem ryzyka chorób serca [20]. Lowastatyna występująca w niektórych grzybach hamuje aktywność głównego enzymu syntezy cholesterolu – reduktazy hydroksymetyloglutarylo-CoA (EC 1.1.1.88; reduktaza HMG CoA) przez co wykazuje działanie hipocholesterolemiczne [21].

2.7. Działanie hipoglikemizujące

Zawarte w grzybach polisacharydy, lektyny oraz komatyna mają działanie hipoglikemizujące, które wynika z przyspieszenia metabolizmu glukozy przez zwiększoną aktywność glukokinazy (EC 2.7.1.2) [22,23]. Działanie hipoglikemizujące grzybów wynika z przyspieszenia metabolizmu glukozy przez zwiększoną aktywność glukokinazy. Ponadto, grzyby mogą zawierać także związki, które pełnią rolę aktywatorów glukokinazy. Wykazano, iż polisacharydy *Cordyceps sinensis* zwiększają poziom glukokinazy u myszy z cukrzycą, stymulując wydzielanie insuliny [24]. *Agaricus bisporus* powodował zwiększenie stężenia insuliny w surowicy oraz zwiększenie komórkowości wysepek Langerhansa [25].

3. Podsumowanie

Wiele badań przeprowadzonych do tej pory udowadnia dobroczynny wpływ spożywania grzybów na zdrowie człowieka (Tab.2). Coraz częściej ekstrakty grzybów stosowane są do produkcji leków i suplementów diety. Dzięki zawartości związków biologicznie czynnych mogą mieć zastosowanie w prewencji chorób, a także być stosowane w leczeniu wspomagającym [26]. Grzyby można spożywać zarówno świeże, jak i w formie przetworzonej: suszone, marynowane, mrożone. Grzyby poza tym, że zawierają substancje biologicznie czynne są też bardzo dobrym źródłem łatwo przyswajalnych aminokwasów, witamin z grupy B, zwłaszcza pirydoksyny (B6), niacyny, ryboflawiny (B2) i tiaminy (B1), witaminy C i błonnika pokarmowego [27]. Zawierają także cenne mikro- i makroelementy takie jak: żelazo, potas, fosfor, magnez, cynk, miedź, mangan i selen [28].

Literatura

1. Srikram A., Supapvanich S., *Proximate compositions and bioactive compounds of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand*, Agriculture and Natural Resources, 50 (6) (2016), s. 432-436.
2. Reis F.S., Martins A., Vasconcelos H., Morales P., Ferreira I.C., *Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms*, Trends in Food Science & Technology, 66 (2017), s. 48-62.
3. Souilem F., Fernandes A., Calhelha R.C., Barreira J.C., Barros L., Skhiri F., Martins A., Ferreira I.C., *Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties*, Food Chemistry, 230 (2017), s. 40-48.
4. Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K. *Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides*, International Journal of Medicine Mushrooms, 3 (2001), s. 361-394.
5. Grundemann C., Gracia-Kaufer M., Sauer B., Scheer R., Merdivan S., Bettin P., Huber R., Lindequist U. *Comparative chemical and biological investigations of beta-glucan-containing products from shiitake mushrooms*, Journal of Functional Foods, 18 part A (2015), s. 692-702.
6. Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. *Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom Ganoderma lucidum*, Journal of Ethnopharmacology, 90 (1) (2004), s. 17-20.

7. Sanchez C. *Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms*, Synthetic and Systems Biotechnology, 2 (1) (2017), s. 13-22.
8. Kalaras M.D., Richie J.P., Calcagnotto A., Beelman R. *Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione*, Food Chemistry, 233 (2017), s. 429-433.
9. Dziezak J.D. *Preservatives: Antioxidants. The ultimate answer to oxidation*, Food Technology, 40 (9) (1986), s. 94-102.
10. Kozarski M., Klaus A., Jakovljevic D., Todorovic N., Vunduk J., Petrović P., Niksic M., Vrvic M.M., van Griensven L. *Antioxidants of Edible Mushrooms*, Molecules, 20 (10) (2015) s. 19489-19525.
11. Lopez-Jimenez F., Cortes-Bergoderi M., *Obesity and the Heart*. Rev Esp Cardiol, 64(2) (2011), s. 140-149.
12. Nowsheen S., Azra N. K., Mushtag A., Mascoodi F.A., Parray J.A. *Antimicrobial activity of crude fractions and morel compounds from wild edible mushrooms of North western Himalaya*, Microbial Pathogenesis, 105 (2017), s. 356-360.
13. Heleno S.A., Barros L., Martins A., Morales P., Fernandez-Ruiz V., Glamoclija J., Sokovic M., Ferreira I.C. *Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms*, LWT- Food Science and Technology, 63 (2) (2015), s. 799-806.
14. El-Mekawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N. *Anti-HIV-1 and Anti-HIV-1-protease substances from Ganoderma lucidum*, Phytochemistry, 49 (1998), s. 1651-1657.
15. Mothana R.A.A., Awadh N.A.A., Jansen R., Wegner U., Mentel R., Lindequist U. *Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus Ganoderma pfeifferi Bres*, Fitoterapia, 74 (2003), s. 177-180.
16. Awadh N.A.A., Mothana R.A.A., Lesnau A., Pilgrim H., Lindequist U. *Antiviral activity of extracts and compounds from Inonotus hispidus*, Fitoterapia, 74 (2003), s. 483-485.
17. Sano M., Yoshino K., Matsuzawa T., Ikekawa T. *Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushrooms extracts on mouse type IV allergy*, International Journal of Medicinal Mushrooms, 4 (2002), s. 37-41.
18. Kreisel H., Lindequist U., Horak M. *Distribution, ecology, and immunosuppressive properties of Tricholoma populinum (basidiomycetes)*, Zentralblatt für Mikrobiologie, 145 (5) (1990), s. 393-396.
19. Hammann S., Lehnert K., Vetter W. *Estrified sterols and their contribution to the total sterols in edible mushrooms*. Journal of Food Composition and Analysis, 54 (2016), s. 48-54.
20. Berger A., Rein D., Kratky E., Monnard I., Hajjaj H., Meirim I., Piguët-Welsch C., Hauser J., Mace, K., Niederberger P. *Cholesterol-lowering properties of Ganoderma lucidum in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs*, Lipids in Health and Disease, 3 (2004), s. 2.
21. Fukada S.I., Setoue M., Morita T., Sugiyama K. *Dietary eritadenine suppresses guanidinoacetic acid - induced hyperhomocysteinemia in rats*, Journal of Nutrition, 136 (2006), s. 2797-2802.
22. Mizuno T. *Yamabushitake, Hericium erinaceum: bioactive substances and medicinal utilization*, Food Review International, 11 (1) (1995), s. 173-178.
23. Konno S., Aynehchi S., Dolin D. J., Schwartz A. M., Choudhury M. S., Tazaki H. *Anticancer and hypoglycemic effects of polysaccharides in edible and medicinal Maitake*

- mushrooms (Grifola frondosa)*, International Journal of Medicinal Mushrooms, 4 (2002), s. 185–195.
24. Ding Z., Lu Y., Lu Z., Lv F., Wang Y., Bie X., Wang F., Zhang K. *Hypoglycaemic effect of comatin, an anti-diabetic substance separated from Coprinus comatus broth, on alloxan-induced-diabetic rat*, Food Chemistry, 121 (2010), s. 39–43.
 25. Kiho T., Ookubo K., Usui S., Ukai S., Hirano K. *Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the cultured mycelium of Cordyceps sinensis*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 22 (9) (1999), s. 966–970.
 26. Yamac M., Kanbak G., Zeytinoglu M., Senturk H., Bayramoglu G., Dokumacioglu A., van Griensven L., *Pancreas Protective Effect of Button Mushroom Agaricus bisporus (J.E.Lange) Imbach (Agaricomycetidae) Extract on Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes*, International Journal of Medicinal Mushrooms, 12 (4) (2010), s. 379–389.
 27. Wasser S.P., Akavia E. *Regulatory issues of mushrooms as functional foods and dietary supplements, safety and efficacy*. Mushrooms as functional foods. Ed. Cheung P.C.K. New York (2008), s. 199–221.
 28. Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L.M., Ferreira I.C.F.R. *Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals*, Food and Chemical Toxicology, 46 (2008), s. 2742–2747.
 29. Mattila P., Kõnkõ K., Eurola M., Pihlava J.A., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V. *Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (2001) s. 2343–2348.

Zastosowanie terapeutyczne związków biologicznie czynnych zawartych w grzybach wyższych

Streszczenie

Surowce pochodzenia naturalnego posiadają wiele zalet. Przede wszystkim są znacznie lepiej przyswajane przez organizm, niż suplementy diety otrzymywane syntetycznie, oraz rzadziej wywołują niepożądane reakcje ze strony organizmu. Celem pracy jest przedstawienie dobroczynnego wpływu substancji zawartych w grzybach na zdrowie człowieka, na podstawie przeglądu dostępnej literatury. Istnieje powszechnie krążący mit, który głosi, że grzyby są pozbawione wartości dietetycznych i leczniczych. Jest to przekonanie błędne, gdyż związki zawarte w grzybach mają działanie: przeciwnowotworowe (glukany, lentinan, lektyny), przeciwmiażdżycowe (lowastatyna, eritadenina), przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe (triterpenoidy, antybiotyki, steroidy), antyoksydacyjne (fenole, beta-tokoferol, beta-karoten), hipoglikemiczne (polisacharydy, lektyny), przeciwalergiczne (kwasy ganodermove). Substancje aktywne biologicznie zawarte w grzybach mają również zdolność do aktywowania układu odpornościowego (lektyny). Zawartość tak wielu substancji czynnych w grzybach pozwala na rozważanie stosowania ich w leczeniu, bądź profilaktyce różnych schorzeń cywilizacyjnych, jak cukrzyca, miażdżycza, alergie, nowotwory. Pozytywny efekt terapeutyczny można uzyskać stosując odpowiednie grzyby w diecie, bądź przyjmując je w postaci preparatów mających w składzie ekstrakty grzybowe. Wyniki przeprowadzonych badań są obiecujące, wiele właściwości grzybów zostało już udokumentowanych, ale też coraz to nowsze prace donoszą o kolejnych odkryciach w tym temacie.

Słowa kluczowe: związki biologicznie czynne, grzyby, funkcje

Therapeutic use of biologically active compounds contained in higher fungi

Abstract

Raw materials of natural origin have many advantages. In the first place they are much better absorbed by the body than dietary supplements obtained synthetically, and they are less likely to cause unwanted reactions from the body. The purpose of this paper is to show the beneficial effects of substances contained in mushrooms on human health, based on a review of available literature. There is a circulating myth widely circulating that fungi are devoid of dietary and medicinal value. This is a misconception because the compounds contained in the mushrooms have antitumor effects (glucan, lentin, lectins), anti-atherogenic (lovastatin, eritadenin), antimicrobial, antifungal, antiviral (triterpenoids, antibiotics, steroids), antioxidants (phenols, beta-tocopherol, Beta-carotene), hypoglycemic (polysaccharides, lectins), antiallergic (ganodermic acids). Bioactive substances contained in fungi also have the ability to activate the immune system (lectin). The content of so many active substances in mushrooms allows us to consider their use in the treatment or prophylaxis of various diseases of the civilization, such as diabetes, atherosclerosis, allergies, cancer. Positive therapeutic effects can be obtained by using appropriate fungi in the diet, or by taking them in the form of preparations containing mushroom extracts. The results of the research are promising, many of the properties of mushrooms have already been documented, but more and more recent works report further discoveries in this topic.

Key words: biologically active compounds, fungi, functions

Wpływ fotouczulaczy na biofilm drobnoustrojów

1. Wprowadzenie

W warunkach środowiska naturalnego drobnoustroje rzadko bytują jako pojedyncze komórki wolnopływające, planktonoidalne. Najczęściej spotykane są w postaci skupisk zwanych biofilmem, biowarstwą lub błoną biologiczną [1,2]. Podaje się, wliczając drobnoustroje naturalnie kolonizujące organizm człowieka, że 95% wszystkich mikroorganizmów występuje w środowisku naturalnym w postaci biofilmu [3]. Pierwsze wzmianki o strukturach stacjonarnych tworzonych przez bakterie otoczonych śluzową substancją zewnątrzkomórkową pochodzą z XVII wieku. Ówczesny badacz Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723) stosując prosty mikroskop opisywał występowanie takich form życia na własnych zębach [4]. W latach 40-ych poprzedniego stulecia wskazywano na istnienie specyficznych zespołów bakteryjnych, ale wciąż nie nazywano ich biofilmem. Dopiero trzydzieści lat później podjęto próby analizy stacjonarnych subkultur drobnoustrojowych i zaczęto je nazywać biofilmem. Jednocześnie, od tego momentu zaprzestano postrzegać biofilm jako bezładną strukturę złożoną z losowo rozrzuconych komórek mikroorganizmów otoczonych zewnątrzkomórkową substancją [5]. Postęp w technikach badawczych szczególnie w zakresie mikroskopii fluorescencyjnej oraz skaningowej fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej, jak również skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), pozwolił na rekonstrukcję i skrupulatną analizę trójwymiarowych obrazów. Dzięki pracy zespołów naukowych zajmujących się tematyką biofilmów mikrobiologicznych udało się poznać wiele aspektów budowy biofilmów. Badania te pozwoliły określić strukturę, skład oraz wygląd przestrzenny, jak również mechanizmy i procesy metaboliczne zachodzące we wnętrzu subpopulacji [4,6-8]. Celem niniejszej pracy jest przybliżenie cech strukturalnych oraz funkcjonalnych biofilmu drobnoustrojów, w szczególności biofilmu drożdżaków. Ponadto, celem jest zapoznanie czytelnika z nową metodą eradykacji biofilmu, jaką jest fotodynamiczna inaktywacja drobnoustrojów.

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin beatachudzikrzad@umlub.pl tel. 81 448 7107

² Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin anna.malm@umlub.pl tel. 81 448 7100

³ Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin jan.sobczynski@umlub.pl tel. 81 448 7044

2. Charakterystyka biofilmu

2.1. Budowa

Biofilm to skomplikowana, ale jednocześnie wyraźnie uporządkowana przestrzenne forma życia drobnoustrojów należących do jednego lub wielu gatunków, a nawet rodzajów. W skład biofilmu mikrobiologicznego mogą wchodzić zarówno Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne bakterie, grzyby, pierwotniaki lub glony występujące w monokulturze albo stanowiące mieszaninę gatunkową lub nawet rodzajową mikroorganizmów [4, 9-14]. Biofilm mikrobiologiczny jest silnie przytwierdzony do podłoża stałego i otoczony warstwą pozakomórkowej substancji polisacharydowej (EPS, *extracellular polymeric substance*). U bakterii macierz pozakomórkowa składa się z różnych biopolimerów – polisacharydów, białek, DNA, surfaktantów, lipidów i wody [2,15,16,17,18,19]. Ostatnio, wskazuje się, że istotną rolę w budowaniu matriksu odrywają również związki mineralne [20]. U drożdżaków *Candida spp.* macierz zewnątrzkomórkowa składa się z: białek i glikoprotein, które stanowią 55% wszystkich polimerów, węglowodanów (25%), lipidów (15%) i kwasów nukleinowych [21]. Drobnoustroje egzystujące w biofilmie tworzą mikrokolonie oddzielone od siebie siecią kanałów wodnych, które dostarczają substancji odżywczych do głębiej położonych warstw komórek, a odprowadzają wtórne produkty metabolizmu [15,19, 34].

Biofilm może powstawać na powierzchniach sztucznych takich jak: biomateriały stosowane w codziennej praktyce szpitalnej (implanty biomedyczne, sztuczne serce, protezy stawowe i zębowe, soczewki kontaktowe, bioprotezy zastawek serca, cewniki, szwy, protezy naczyń krwionośnych, spirale domaciczne itp.), materiały hydrauliczne, urządzenia mechaniczne. Ponadto, drobnoustroje mają doskonałą zdolność kolonizacji żywych komórek i tkanek [2, 22-24].

W organizmie człowieka występują również tak zwane biofilmy naturalne. Są to głównie biofilmy bakteryjne pełniące w zdrowym organizmie funkcje fizjologiczne – biofilm płytki nazębnej, pochwy, czy biofilm jelita grubego. W skład biofilmu pochwy, czy końcowego odcinka przewodu pokarmowego wchodzi również drożdżaki bytujące w organizmie człowieka na zasadzie komensalizmu [21,25-28].

2.2. Proces powstawania

Powstawanie biofilmu wiąże się ze zdolnością drobnoustrojów do przylegania do siebie nawzajem jak i/lub do naturalnych lub sztucznych powierzchni stałych tworząc struktury jedno lub wielowarstwowe [16,29]. Zdolność do wzrostu w postaci zorganizowanej struktury mają zarówno drobnoustroje autotroficzne jak i heterotroficzne, w tym mikroorganizmy saprofityczne i chorobotwórcze. Wiele czynników ma wpływ na kolonizację a następnie tworzenie biofilmu na powierzchni komórek gospodarza lub stałych materiałach sztucznych. Najważniejsze z nich to: właściwości mikroorganizmów, takie jak między innymi zdolność do wytwarzania polimerów zewnątrzkomórkowych, lipopolisacharydów, obecność białek ściany komórkowej jak również obecność struktur zewnątrzkomórkowych drobnoustrojów takich jak fimbrie czy rzęski, stan układu immunologicznego gospodarza, zdolność wiązania drobnoustrojów

do komórek makroorganizmu, struktura i własności powierzchni stałych, w tym chropowatość biomateriałów [1,29].

W procesie powstawania biofilmu można wyróżnić kilka etapów. Pierwszym jest adhezja czyli przyleganie pojedynczych komórek drobnoustrojów do naturalnych bądź sztucznych powierzchni stałych. W procesie adhezji można wyróżnić dwa okresy – adhezję odwracalną i nieodwracalną. Kolejnym etapem jest dojrzewanie i formułowanie się biofilmu. Ostatnią fazę stanowi dyspersja komórek drobnoustrojów z utworzonej struktury w nowe nisze biologiczne [13,21,30].

Za początek adhezji przyjmuje się stan, w którym wolnoptywujące komórki mikroorganizmów zasiedlają powierzchnie stałe; wiążą się z nimi za pomocą niespecyficznych oddziaływań fizycznych, takich jak: siły hydrodynamiczne, dyfuzja, grawitacja, siły termodynamiczne, ruchy Browna, siły van der Waalsa, elektrostatyczny ładunek powierzchni. Wiązania tworzą się pomiędzy adhezynami, otaczającym środowiskiem płynnym, a powierzchnią stałą. Opisana faza powstawania biofilmu jest uważana za odwracalną [31]. Biofilm utworzony na tym etapie może być z dużą łatwością usunięty z powierzchni stałej za pomocą dostępnych środków fizycznych lub chemicznych [2, 32].

W następnym etapie, w którym duże znaczenie odgrywiają specyficzne wiązania chemiczne, takie jak: wiązania wodorowe, tworzenie par i kompleksów jonowych dochodzi do powstawania stabilnego biofilmu. Kluczową rolę odgrywiają wiązania kowalencyjne typu węgiel-węgiel oraz polimery glikokaliksu [2,33]. W omawianej fazie kolonizacja podłoża stałego przez mikroorganizmy następuje w sposób nieodwracalny. Tworzą się specyficzne wiązania pomiędzy powierzchnią stałą, a adhezynami obecnymi na powierzchni komórek [15]. Obserwuje się postępującą proliferację komórek kolonizujących podłoże, tworzenie mikrokolonii oraz dalszą produkcję pozakomórkowej substancji polisacharydowej [34].

U bakterii w opisywanym etapie tworzenia biofilmu szczególną rolę przypisuje się ich strukturom obecnym na powierzchni komórki – fimbriom i rzęskom [2]. Fimbrie zwane również pili to proste, nitkowate twory cytoplazmatyczne. Znane są dwa typy fimbrii – zwykłe i płciowe. Białka fimbrii zwykłych należą do lektyn, które rozpoznają i wiążą swoiste receptory polisacharydowe w komórkach gospodarza [35]. Rzęski to długie, puste w środku, spiralne filamenty (nici), które umożliwiają poruszanie się bakteriom i dotarcie do powierzchni stałej. Po dotarciu do niej poszukują innych drobnoustrojów, z którymi mogą utworzyć mikrokolonie lub powiększyć już istniejące. Drugi etap adhezji zachodzi, gdy odległość bakterii do powierzchni stałej jest nie większa niż 1,5 nm [36,37].

Z kolei, u drożdżaków *Candida spp.* obserwuje się powstawanie form dimorficznych, gdyż dochodzi do przekształcania się blastospor w formy nitkowate [21,38,39]. Zasadniczą rolę odgrywiają interakcje pomiędzy specyficznymi adhezynami znajdującymi się na powierzchni komórki drożdżaka, a docelowymi ligandami umieszczonymi w cząsteczkach prezentowanych na powierzchni komórki eukariotycznej lub sztucznego biomateriału wprowadzonego do organizmu człowieka [13]. Czynniki, które sprzyjają powstawaniu stabilnych wiązań pomiędzy komórkami

mikro- a makroorganizmu lub powierzchnią stałą to między innymi: glikoproteiny zewnątrzkomórkowej matriks (fibrynogen, kolageny, fibronektyna) [15]. Architektura biofilmu może być dodatkowo stabilizowana przez interakcje zachodzące pomiędzy zewnątrzkomórkowymi anionowymi substancjami polimerycznymi, które zawierają ugrupowania karboksylowe a wielowalentnymi kationami, na przykład jonami wapnia (Ca^{2+}); dochodzi do tworzenia swego rodzaju „pomostu” pomiędzy molekułami alginianu i zwiększenia tym samym stabilności biofilmu [40]. U drożdżaków *Candida spp.* faza odpowiedzialna za specyficzną adhezję odbywa się za pomocą białek powierzchniowych kodowanych przez geny z rodziny ALS, EAP1, HWP1 [21,22,41-44].

2.3. Dojrzwianie

Następny etap w procesie powstawania biofilmu to jego dojrzwianie. Drobnoustroje zaangażowane w nowe subkultury intensywnie rozmnażają się i różnicują. Podczas tej fazy dochodzi do zmian w ekspresji wielu genów i wystąpienia nowych cech fenotypowych, które przekazywane są innym komórkom znajdującym się w pobliżu lub komórkom potomnym [2,13]. Następuje aktywacja genów kodujących enzymy odpowiedzialne za rozkładanie substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Zwiększa się ekspresja genów kodujących białka działające jak pompy błonowe – wypompowywanie leków z wnętrza komórki (*drug efflux pomp*) [45-47]. Drobnoustroje egzystujące w biofilmie zmniejszają swój metabolizm i tempo wzrostu z uwagi na ograniczony dostęp tlenu [16,48]. Obserwuje się zwiększoną aktywność beztlenowych szlaków metabolicznych, takich jak: desulfurikacja, denitryfikacja, glikoliza czy fermentacja. Zahamowana jest synteza niektórych enzymów, na przykład proteaz, fosfolipazy C oraz toksyn [2,46,47,49]. Dojrzały biofilm bakteryjny jest otoczony grubą warstwą substancji pozakomórkowej. Mogą docierać do niej drobnocząsteczkowe substancje nieorganiczne, związki organiczne jak również inne mikroorganizmy. Woda w biofilmie stanowi 60% jego objętości [6].

W procesie tworzenia biofilmu drożdżaków *Candida spp.* wyróżnia się przynajmniej 3 fazy – wczesną, która trwa do 11 godzin, pośrednią – trwa od 12 do 30 godzin i dojrzwiania – 38-72 godziny [21,22,28,31,22,50]. W ciągu pierwszych dwóch godzin blastospor planktonialnych *C. albicans* kolonizują powierzchnię stałą i dochodzi do adhezji blastospor na powierzchni stałej. Pierwsze mikrokolonie widoczne są już po 3-4 godzinach. W fazie pośredniej widoczne jest powstawanie zewnątrzkomórkowej macierzy. Etap dojrzwiania biofilmu to dalsze przyrastanie matriks, aż do całkowitego otoczenia subpopulacji drożdżakowej [28,45,50,51]. W biofilmie u drożdżaków *Candida albicans* istnieją dwa regulatory transkrypcyjne odpowiedzialne za produkcję matriks zewnątrzkomórkowego tj. Rlm1 i Zap1. Delecja genu RLM1 powoduje redukcję w poziomie matriks, zaś delecja genu ZAP1 prowadzi do zwiększenia zewnątrzkomórkowego matriks [52,53]. Dojrzały biofilm drożdżaków *Candida spp.* składa się z różnych form morfologicznych – blastosporów, strzępek i pseudostrzępek zanurzonych w mieszaninie białek, węglowodanów i innych składników chemicznych otoczonych zewnątrzkomórkowym matrix [50,54]. Elementem zapewniającym integralność i wielowarstwowość biofilmu *Candida spp.* są nitkowate postaci

drożdżaków [19]. Regulator proteinowy Efg1 jest istotnym czynnikiem koniecznym w formowaniu a następnie dojrzewaniu biofilmu *Candida albicans* na powierzchniach biologicznych i sztucznych [55-57]. Struktura i morfologia biofilmu *Candida albicans* a innych drożdżaków (*Candida nie-albicans*) charakteryzuje się dużą odmiennością [58]. W biofilmach *C. nie-albicans* stwierdza się pojedynczą warstwę komórek zawierającą nieregularne skupiska blastospor, otoczonych niewielką ilością substancji pozakomórkowej [21,28,50,59].

2.4. Komunikacja drobnoustrojów

Cały proces formowania się biofilmu, a następnie egzystencji drobnoustrojów w opisywanych agregatach nie jest przypadkowy. Biofilmy sterowane są przy pomocy unikalnego systemu komunikacji międzykomórkowej znanej również jako mechanizm oceny liczebności lub sygnalizacja zagęszczenia (*quorum sensing*), który przyczynia się dodatkowo do zwiększenia zdolności adaptacyjnych biofilmu do życia [15,60]. Spośród całego świata mikroorganizmów zjawisko *quorum sensing* najlepiej poznane jest u bakterii. Porozumiewanie się bakterii polega na wydzielaniu sygnałów chemicznych tak zwanych autoinduktorów i obecności białek tzw. receptorów zdolnych do przyjęcia przekazywanej informacji [39]. Wydzielane autoinduktory w ściśle określony sposób wpływają na aktywność własną komórki jak i innych komórek drobnoustrojów znajdujących się w sąsiedztwie [2].

Bakterie Gram ujemne jako substancje sygnałowe wytwarzają cząsteczki AHL (*homoserine lactone*). Są to niskocząsteczkowe acylowane laktony homoseryny. Cząsteczki AHL w biofilmie swobodnie przechodzą z jednej komórki do drugiej, a odczytanie sygnału możliwe jest dopiero po osiągnięciu odpowiednio wysokiego ich zagęszczenia w otaczającym środowisku [61]. Bakterie Gram dodatnie jako autoinduktory wykorzystują cząsteczki białkowe – AIPs (*autoinducing polypeptides*). Są one wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej przy udziale białka transportującego zależnego od ATP. Po osiągnięciu odpowiednio wysokiego zagęszczenia następuje przyłączenie AIPs do błonowej kinazy białkowej. W komórce regulator białkowy może wiązać promotor DNA i regulować ekspresję odpowiednich genów [62]. Oligopeptydy znane są jako cząsteczki sygnałowe u *Bacillus subtilis*, cykliczne oktapeptydy u *Staphylococcus aureus*, u *S. griseus* – butyrolaktony, siderofory u *Bacillus spp.* [63].

U drożdżaków *Candida albicans* cząsteczkami sygnałowymi są farnesol i tyrozol [64]. Farnesol to alkohol z grupy terpenów, który hamuje powstawanie form filamentaryjnych i dojrzewanie biofilmu. Ponadto, stymuluje drożdżaki do produkcji chlamydospor – form przetrwalnych *C. albicans*; chroni blastosporę przed działaniem nadtlenu wodoru [39,65]. Tyrozol ma wpływ na wytwarzanie strzępek w pośredniej fazie tworzenia biofilmu przez drożdżaki, zabezpiecza przed zmniejszeniem ekspresji genów odpowiedzialnych za kodowanie replikacji DNA, segregacji chromosomów oraz regulacji cyklu komórkowego [66]. Grzyby *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzają dwa typy autoinduktorów – fenyloetanolu i tryptofolu, które przyczyniają się do regulacji transformacji i transkrypcji genów związanych z metabolizmem drożdżaków

[67]. Proces *quorum sensing* oraz formowanie się biofilmu grzybów *Candida spp.* są regulowane przez dwuskładnikowy system regulacyjny Chk1p [68].

Końcowa faza w rozwoju biofilmu polega na odrywaniu się pojedynczych komórek lub ich małych skupisk od utworzonej subkultury i migracji do nowych miejsc, gdzie mogą rozpocząć ich zasiedlanie [19, 21, 30]. Opisany etap jest szczególnie niebezpieczny, gdy odbywa się w organizmie człowieka, gdyż może stanowić zagrożenie dla jego zdrowia a nawet życia [30]. Biofilm drobnoustrojów jest strukturą biologiczną szczególnie trudną do całkowitego usunięcia w warunkach *in vivo*. Obecność matriksu zewnątrzkomórkowego, różna dostępność i zmniejszona zawartość tlenu, zmienione pH to tylko niektóre czynniki istotnie wpływające na obniżenie lub brak aktywności powszechnie znanych substancji przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu [12,15].

3. Fotodynamiczna inaktywacja drobnoustrojów

3.1. Działanie fotouczulaczy na komórki drobnoustrojów

Poszukuje się nowych substancji chemicznych otrzymywanych na drodze syntezy do walki z bakteryjnym, grzybiczym lub mieszanym biofilmem. Warto zauważyć, że biofilm bakteryjny i mieszany są odpowiedzialne za rozwój wielu chorób, m.in. chorób przyzębia, stopy cukrzycowej, trudno gojących się ran, oraz zakażeń dróg moczowych u pacjentów cewnikowanych. Wprowadzenie do leczenia nowych terapii pozwoliłoby zmniejszyć koszty terapii i leczenia powikłań wynikających z zakażeń bakteryjnych, ograniczyć działania niepożądane, jak również skrócić okres leczenia i ograniczyć nawroty choroby. Formą terapii, w której upatruje się dużych nadziei jest fotodynamiczna inaktywacja mikroorganizmów (*photodynamic inactivation*, PDI). Opiera się na zastosowaniu cząsteczki nietoksycznego, fotoreaktywnego barwnika, fotouczulacza. Fotouczulacz ulega wzbudzeniu światłem o określonej długości fali, przechodząc w stan wzbudzony. W wyniku reakcji z tlenem, nadmiar energii zostaje przeniesiony na cząsteczkę tlenu trypletowego, i dochodzi do wytworzenia wysoce reaktywnego tlenu singletowego [69]. W wyniku reakcji fotochemicznych może również dojść do utworzenia innych wolnych rodników lub reaktywnych form tlenu (ROS). Tak więc wysoka reaktywność fotochemiczna (tj. wysoki współczynnik absorpcji molowej i zdolność do wytwarzania ROS w dużych ilościach) ma decydujące znaczenie dla efektu fotodynamicznego [70]. Cechy idealnego fotouczulacza zebrano w tabeli 1. ROS, reagując z białkami, lipidami lub DNA uszkadzają komórki w otoczeniu fotouczulacza, co prowadzi do ich śmierci. Ze względu na niespecyficzny mechanizm działania taka terapia nie powoduje rozwoju oporności drobnoustrojów na fotouczulacze i pozwala uzyskać dobry efekt terapeutyczny. Skuteczny fotouczulacz będzie lokalizował się w pobliżu organelli komórkowych, które są najbardziej podatne na uszkodzenia PDI. Błona komórkowa jest głównym celem w fotodynamicznej inaktywacji drobnoustrojów [71, 72]. Fotouczulacze o dodatnim ładunku są łatwiej transportowane do komórki za pośrednictwem endocytozy, ze względu na oddziaływanie elektrostatyczne z ujemnie naładowaną błoną komórkową, co skutkuje wyższą cytotoksycznością i fotocytotoksycznością

Tabela 1. Cechy idealnego fotouczulacza

Właściwości	Cechy fotouczulacza
Chemiczne	Czystość, nieskomplikowana synteza Stabilność chemiczna
Fizyczne	Wysoki współczynnik absorpcji promieniowania świetlnego Zdolność do wydajnej produkcji wolnych rodników Długi okres półtrwania stanu wzbudzonego
Biologiczne	Brak toksyczności Zdolność do szybkiej akumulacji w komórkach patogenów przy jednoczesnym braku akumulacji w tkankach ludzkich Zdolność do gromadzenia się w organellach komórkowych wrażliwych na działanie wolnych rodników
Farmaceutyczne	Wysoka rozpuszczalność w wodzie

Źródło: Opracowanie własne

3.2. Zwalczenie biofilmu przy użyciu fotouczulaczy

Ribeiro i wsp. [73] przygotowali nanoemulsje wykorzystując kationowe i anionowe środki powierzchniowo czynne i rozpuścili w nich chlorek glinowo ftalocyjaninowy (AlPcCl, *aluminum chloride phthalocyanine*). Nanoemulsją kationową była toksyczna w stosunku do komórek *C. albicans* nawet bez zastosowania fotouczulacza. W przypadku kultur planktonalnych nanoemulsje nie zmieniły znacząco aktywności fotouczulacza. Jednak nanoemulsja kationowa pozwoliła na zwiększenie penetracji AlPcCl przez barierę biofilmu, co zwiększyło efekt bakteriobójczy związku. Mikroskopia konfokalna wykazała różne wzorce przenikania AlPcCl w warstwach biofilmu w zależności od rodzaju nanoemulsji. Wolny fotouczulacz wiązał się ze strzępkami, a nie z komórkami drożdży. W przypadku AlPcCl związanego z nanoemulsją kationową, zaobserwowano lepszą dystrybucję do komórek drożdży, co pozwoliło uzyskać większą skuteczność w zmniejszaniu metabolizmu biofilmu. Anionowa nanoemulsja wykazała głęboką penetrację w warstwie podstawowej biofilmu. Jednak w tym przypadku penetracja do komórek drożdży była znikoma.

Junqueira i wsp. [74] zbadali wpływ kationowej nanoemulsji na aktywność przeciwgrzybiczą 2,9,16,23-tetrakis(fenylotio)-29H,31H-ftalocyjaniny cynkowej (ZnPc). Faza olejowa zawierała lecytynę sojową, natomiast faza wodna zawierała emulgujący biopolimer. Średni spadek żywotności o 0,45 logarytmu CFU (colony forming unit) osiągnięto dla drożdżaków *Candida spp.* (*C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida norvegensis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*). Większą redukcję żywotności osiągnięto dla biofilmów utworzonych przez *Trichosporon mucoides* i *Kodamaea ohmeri*.

Khan i wsp. [75] odkryli, że nanocząstki złota zwiększyły skuteczność fotouczulacza błękitu metylenowego w stosunku do biofilmów *C. albicans*. O ile nanocząstki złota w stężeniu 0,2 mg/ml nie wykazały aktywności przeciwko *C. albicans*, o tyle połączenie błękitu metylenowego z nanocząstkami skutkowało

synergistycznym efektem grzybobójczym. Minimalne stężenie hamujące (MIC) błękitu metylenowego obniżyło się z 62,5 mg/ml, do 31,2 mg/ml po polaczeniu z nanocząstkami złota. Ponadto, minimalna wartość grzybobójcza samego błękitu metylenowego wynosiła 125,0 mg/ml, a dla połączeń osiągnęła wartość 62,5 mg/ml. Zarówno transmisyjna mikroskopia elektronowa jak i mikroskopia konfokalna wykazały, że ściany komórek poddanych działaniu połączeń zostały uszkodzone, co zwiększyło wnikanie fotouczulacza do wnętrza komórek. Obrazowanie metodą laserowej mikroskopii konfokalnej przy użyciu barwników specyficznych dla różnych organelli komórkowych pozwoliło wykazać, że spadek żywotności metabolicznej komórek *Candida* był wynikiem niszczenia jądra komórkowego i degradacji jądrowego DNA.

4. Podsumowanie

Biofilm jest to złożona, trójwymiarowa struktura utworzona z komórek jednego, bądź wielu gatunków drobnoustrojów. Proces tworzenia biofilmu jest możliwy dzięki zdolności komórek drobnoustrojów do przylegania do powierzchni stałych jak również do innych komórek znajdujących się w ich najbliższym otoczeniu. W procesie powstawania biofilmu można wyróżnić kilka etapów. Pierwszym jest adhezja, następnie dochodzi do dojrzewiania biofilmu. Natomiast w ostatnim etapie pojedyncze komórki odrywają się od biofilmu, aby skolonizować nowe powierzchnie. Z uwagi na obecność zewnątrzkomórkowych polisacharydów penetracja leków wewnątrz biofilmu jest utrudniona. Jedną z nowoczesnych form terapii, nakierowanych na zniszczenie biofilmu jest fotodynamiczna inaktywacja drobnoustrojów. Metoda ta wykorzystuje fotouczulacze – cząsteczki zdolne do produkowania wolnych rodników w wyniku pochłonięcia światła widzialnego. Fotouczulacze wykazują wysoką aktywność bakterio- i grzybobójczą, szczególnie w połączeniu z nanocząsteczkowymi nośnikami.

Literatura

1. Donlan R.M. *Biofilms: Microbial life on the surfaces*. Emerging Infectious Diseases., 8 (2002), s. 136-151.
2. Kołwzan B. Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona środowiska.*, 4 (2011), s. 4-14.
3. Mészáros J. *Czy biofilmy stanowią zagrożenie dla człowieka?* *Terapia i leki.*, 5 (2002), s. 20-25.
4. Høiby N. *A short history of microbial biofilms and biofilm infections*. *Acta Pathologica. Microbiologica et Immunologica Scandinavica.*, 125 (2017), s. 272-275.
5. Donlan R.M., Costerton J.W. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. *Clinical Microbiology Reviews.*, 19 (2002), s. 139-143.
6. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L., López-Ribot J.L. *Characteristics of biofilm formation by Candida albicans*. *Revista Iberoamericana Micología.*, 18 (2001), s. 163-170.
7. Marrie T.J., Costerton J.W. *Scanning and transmission elektron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters*. *Journal of Clinical Microbiology.*, 19 (1984), s. 687-693.
8. Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. *Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance*. *Journal of Bacteriology.*, 183 (2001), s. 5385-5394.

9. Røder H.L., Sørensen S.J., Burmølle M. *Studying bacterial multispecies biofilms: where to start?* Trends in Microbiology., 24 (2016), s. 503-513.
10. Chandra J., Zhou G., Channoum M.A. *Fungal biofilms and antimycotics*. Current Drug Targets., 8 (2005), s. 887-894.
11. Currie C.R. *A community of ants, fungi and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis*. Annual Review of Microbiology., 55 (2001), s. 357-380.
12. Gominet M., Compain F., Beloin C., Lebeaux D. *Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017?* Acta Pathologica. Microbiologica Et Immunologica Scandinavica., 125 (2017), s. 365-375.
13. Maciejewska M., Bauer M., Dawgul M. *Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego*. Postępy Mikrobiologii., 55 (2016), s. 3-11.
14. Donlan R.M. *Biofilms and device-associated infections*. Emerging Infectious Diseases., 7 (2001), s. 277-281.
15. Flemming H.C., Wingender J. *The biofilm matrix*. Nature Reviews Microbiology., 8 (2010), s. 623-633.
16. Brandwein M., Steinberg D., Meshner S. *Microbial biofilms and the human skin microbiome*. NPJ Biofilms and Microbiomes., 3 (2016), s. 1-6.
17. O'Toole G.A. *To build a biofilm*. Journal of Bacteriology., 185 (2003), s. 2687-2689.
18. Czaczyk K., Wojciechowska K. *Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań*. Biotechnologia., 3 (2003), s. 49-64.
19. Pierce C.G., Vila T., Romo J.A., Montelongo-Jauregui D., Wall G., Ramasubramanian A., Lopez-Ribot J.L. *The Candida albicans biofilm matrix: composition, structure and function*. Journal of Fungi., 3 (2017), s. 1-10.
20. Oppenheimer-Shaanan Y., Sibony-Nevo O., Bloom-Acermann Z., Suissa R., Steinberg N., Kartvelishvily E., Brumfeld V., Kolodkin-Gal I. *Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms*. NPJ Biofilms and Microbiomes., 2 (2016), s. 15031
21. Nobile C.J., Johnson A.D. *Candida albicans biofilms and human disease*. Annual Review of Microbiology., 69 (2015), s. 71-92.
22. Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. *Biofilm Formation by the Fungal Pathogen Candida albicans: Development, Architecture, and Drug Resistance*. Journal of Bacteriology., 183 (2001), s. 5385-5394.
23. Costerton J.W., Montanaro L, Aciola C.R. *Biofilm in implant infections: Its production and regulation*. International Journal of Artificial Organs., 28 (2005), s. 1062-1068.
24. Bryers J.D. *Medical biofilms*. Biotechnology and Bioengineering., 1 (2008), s. 1-18.
25. Ganguly S., Mitchell A.P. *Mucosal biofilms of Candida albicans*. Current Opinion in Microbiology., 14 (2011), s. 380-385.
26. Kumamoto C.A. *Inflammation and gastrointestinal Candida colonization*. Current Opinion in Microbiology., 14 (2011), s. 386-391.
27. Donlan R.M. *Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process*. CID 33 (2001), s. 1387-1392.
28. Dorocka-Bobkowska B., Konopka K. *Powstawanie biofilmu Candida i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa*. Dental and Medical Problems., 40 (2003), s. 405-410.
29. Stacy A., McNally L., Darch S.E., Brown S.P., Whiteley M. *The biogeography of polymicrobial infection*. Nature Reviews Microbiology., 14 (2016), s. 93-105.

30. Uppuluri P., Chaturvedii A.K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramaniam A.K., Köhler J.R., Kadosh D., Lopez-Ribot J.L. *Dispersion as an important step in the Candida albicans biofilm development al cycle*. PLOS Pathogens., 6 (2010), s. 1-13.
31. Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., López-Ribot J.L. *Candida biofilms: an update*. Eukaryotic Cell., 4 (2005), s. 633-638.
32. Czaczyk K. *Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych*. Postępy Mikrobiologii., 43 (2004), s. 267-283.
33. Czaczyk K., Myszka K. *Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation*. Polish Journal of Environmental Studies., 16 (2007), s. 799-806.
34. Baranowska K., Rodziewicz A. *Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych*. Kosmos., 57 (2008), s. 29-38.
35. Rijnaarts H.M., Norde W., Bouwer E.J., Lyklema J., Zehnder J.B. *Bacterial adhesion under static and dynamic conditions*. Applied and Environmental Microbiology., 59 (1993), s. 3255-3265.
36. Le Thi T.T., Prigent-Combaret C., Dorel C., Lejeune P. *First stages of biofilm formation: characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process*. Methods in Enzymology., 336 (2001), s. 152-159.
37. Percival S.L., Malic S., Cruz H., Williams D.W. *Introduction to biofilms*. Biofilms and Veterinary Medicine., 6 (2011), s. 41-68.
38. Baillie G.S, Douglas L.J. *Role of dimorphism in the development of Candida albicans biofilms*. Journal of Medical Microbiology., 48 (1999), s. 671-679.
39. Polke M., Leonhardt I., Kurzai O., Jacobsen I.D. *Farnesol signalling in Candida albicans – more than just communications*. Critical Reviews in Microbiology., 13 (2017), s. 1-14.
40. Körstgens V., Flemming H.C., Wingender J., Borchard W. *Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid Pseudomonas aeruginosa*. Water Science and Technology., 43 (2001), s. 49-57.
41. Zhao X., Daniels K.J., Oh S.H., Green C.B., Yeater K.M., Soll D.R., Hoyer L.L. *Candida albicans Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces*. Microbiology., 152 (2006), s. 2287-2299.
42. Li F., Palecek S.P. *EAP1, a Candida albicans gene involved in binding human epithelial cells*. Eukaryotic Cell., 2 (2003), s. 1266-1273.
43. Nobile C.J., Nett J.E., Andes D.R., Mitchell A.P. *Function of Candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation*. Eucaryotic Cell., 5 (2006), s. 1604-1610.
44. Zhao X., Daniels K.J., Oh S.H., Green C.B., Yeater K.M., Soll D.R., Hoyer L.L. *Candida albicans Als3p is required for Wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces*. Microbiology. 152 (2006), s. 2287-2299.
45. Erna M.K., Rabih O.D. *Candida infections of medical devices*. Clinical Microbiology Reviews., 17 (2004), s. 255-267.
46. Parsek M.R., Fuqua C. *Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life*. Journal of Bacteriology., 186 (2004), s. 4427-4440.
47. Douglas L.J. *Candida biofilms and their role in infection*. Trends in Microbiology., 11 (2003), s. 30-36.
48. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nature Reviews Microbiology., 2 (2004), s. 95-108.
49. Bryers J.D. *Medical biofilms*. Biotechnology and Bioengineering., 100 (2008), s. 1-18.

50. Chandra J., Mukherjee P.K. *Candida biofilms: development, architecture, and resistance*. Microbiology Spectrum., 3 (2015), s. 1-24.
51. Brown A.J., Gow N.A.R. *Regulatory networks controlling Candida albicans morphogenesis*. Trends in Microbiology., 7 (1999), s. 333-338.
52. Nett J.E., Sanchez H., Cain M.T., Ross K.M., Andes D.R. *Interface of Candida albicans biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation*. Eucaryotic Cells., 10 (2011), s.1660-1669.
53. Nobile C.J., Nett J.E., Hernday A.D., Homann O.R., Deneault J.S., Nantel A., Andes D.R., Johnson A.D., Mitchell A.P. *Biofilm matrix regulation by Candida albicans Zap1*. PLOS Biology., 7 (2009), s. 1-15.
54. Hawser S.P., Douglas L.J. *Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro*. Infection and Immunity., 62 (1994), s. 915-921.
55. Dieterich C., Schandar M., Noll M., Johannes F.J., Brunner H., Graeve T., Rupp S. *In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of Candida albicans EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion*. Microbiology., 148 (2002), s. 497-506.
56. Garcia-Sánchez S., Aubert S., Iraqui I., Janbon G., Ghigo J.M., d'Enfert C. *Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns*. Eukaryotic Cells., 3 (2004), s. 536-545.
57. Levis R.E., Lo H.J., Raad I.I., Kontoyiannis D.P. *Lack of catheter infection by the efg1/efg1 cph1/cph1 double-null mutant, a Candida albicans strain that is defective in filamentous growth*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 46 (2002), s. 1153-1155.
58. Ramage G., Martinez J.P., Lopez-Ribot J.L. *Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem*. FEMS Yeast Research., 6 (2006), s. 979-986.
59. Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. *Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces*. Infection and Immunity., 70 (2002), s. 878-888.
60. Fischbach M.A., Segre J.A. *Signaling in host-associated microbial communities*. Cell., 164 (2016), s. 1288-1300.
61. Taga M.E., Bassler B.L. *Chemical communication among bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 100 (2003), s. 14549-14554.
62. Camilli A., Bassler B.L. *Bacterial small-molecule signaling pathways*. Science., 311 (2006), s. 1113-1116.
63. López D., Vlamakis H., Kolter R. *Biofilms*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology., 2 (2010), s. 1-11.
64. Alem M.A., Otef M.D., Flowers T.H., Douglas L.J. *Production of tyrosol by Candida albicans biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development*. Eukaryotic Cells., 5 (2006), s. 1770-1779.
65. Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K.W. *Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol*. Applied in Environmental Microbiology., 67 (2001), s. 2982-2999.
66. Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R. *Tyrosol is a quorum sensing molecule in Candida albicans*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America., 101 (2004), s. 5048-5052.
67. Dworecka-Kaszak B. *Czy grzyby plotkują? Signaling i quorum sensing – zjawiska warunkujące komunikację drobnoustrojów*. Mikologia Lekarska., 15 (2008), s.164-171.

68. Kruppa M., Krom B.P., Chauhan N., Bambach A.V., Cihlar R.L., Calderone R.A. *The two-component signal transduction protein Chk1 regulates quorum sensing in Candida*. Eukaryotic Cell., 3(2004), s. 1062-1065.
69. Dai T., Fuchs B.B., Coleman J.J., Prates R.A., Astrakas C., StDenis T.G., Ribeiro M.S., Mylonakis E., Hamblin M.R., Tegos G.P. *Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform*. Frontiers in Microbiology., 3, (2012), s. 120.
70. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mróz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Gołąb J. *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA Cancer Journal for Clinicians., 61 (2011), s. 250-281.
71. Almeida A., Cunha A., Faustino M.A.F., Tomé A.C., Neves M.G.M.S. *Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents*. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications., 11, (2011), s. 83-160.
72. Sobczyński J., Polski A. *Nanocarriers for Photosensitizers for Use in Antimicrobial Photodynamic Therapy* w: Ficaí A., Grumezescu A. M. *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*. Elsevier. Nowy Jork (2017), s. 481-502.
73. Ribeiro A.P.D., Andrade M.C., Bagnato V.S., Vergani C.E., Primo F.L., Tedesco A.C., Pavarina A.C. *Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions*. Lasers in Medical Science., 30 (2013), s. 549-559.
74. Junqueira J., Jorge A., Barbosa J., Rossoni R., Vilela S., Costa A., Primo F., Gonçalves J., Tedesco A., Suleiman J. *Photodynamic inactivation of biofilms formed by spp., and by cationic nanoemulsion of zinc 2, 9, 16, 23-tetrakis (phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc)*. Lasers in Medical Science., 6 (2012), s. 1205-1212.
75. Khan S., Alam F., Azam A., Khan A.U. *Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit Candida albicans biofilm*. International Journal of Nanomedicine., 7, (2012), s. 3245-3257.

Wpływ fotouczulaczy na biofilm drobnoustrojów

Streszczenie

Biofilm to skomplikowana jedno- lub wielogatunkowa postać życia drobnoustrojów, silnie przytwierdzona do podłoża stałego i otoczona warstwą egzopolisacharydów. Komórki mikroorganizmów, zarówno bakterii, jak i grzybów tworzą w biofilmie mikrokolonie oddzielone od siebie kanałami wodnymi dzięki którym zdobywane są potrzebne do życia substancje odżywcze, a odprowadzane wtórne produkty metabolizmu. Biofilm powstaje jako wynik zdolności drobnoustrojów do przylegania do siebie nawzajem jak i/lub do naturalnych lub sztucznych powierzchni stałych. Biofilm drobnoustrojów jest strukturą biologiczną szczególnie trudną do eradykacji w warunkach *in vivo*. Obecność siateczki zewnątrzkomórkowych polisacharydów, różna dostępność i zmniejszona zawartość tlenu, zmienione pH to tylko niektóre czynniki istotnie wpływające na obniżenie lub brak aktywności powszechnie znanych substancji przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu. Poszukuje się nowych postaci leków do walki z bakteryjnym, grzybiczym lub mieszanym biofilmem. Formą terapii, w której upatruje się duże nadzieje jest fotodynamiczna inaktywacja patogenów. Fotouczulacze pochłaniając światło widzialne ulegają aktywacji. Następnie, przekazują pochłoniętą energię na tlen tworząc tzw. tlen singletowy. Ten ostatni wraz z innymi wolnymi rodnikami jest odpowiedzialny za zniszczenie komórek drobnoustrojów. Ze względu na niespecyficzny mechanizm działania zastosowana terapia nie powoduje rozwoju oporności drobnoustrojów na fotouczulacze i pozwala uzyskać dobry efekt terapeutyczny.

Słowa kluczowe: biofilm, fotouczulacze, fotodynamiczna inaktywacja drobnoustrojów,

Influence of photosensitizers on the microbial biofilmin

Abstract

Biofilm is a complex single or multi-species form of microbial life, firmly attached to a solid surface and surrounded by a layer of exopolysaccharides. Microbial cells, both bacteria and fungi, form in the biofilm micrococularies separated by water channels, through which vital nutrients are obtained, and secondary metabolic products are discharged. Biofilms are produced as a result of the ability of the microorganisms to adhere to each other and / or to natural or artificial solid surfaces. Microbial biofilm is a biological structure particularly difficult to eradicate *in vivo*. The presence of extracellular polysaccharides, different availability and reduced oxygen content, altered pH are just some of the factors that significantly reduce or no activity of commonly known antimicrobial biofilms. There is an ongoing search for new forms of drugs to fight bacterial, fungal or mixed biofilm. The form of therapy, which seems promising is the photodynamic inactivation of pathogens. Photosensitizers absorb visible light and undergo and become activated. Then, they transfer the absorbed energy to the oxygen creating the so-called singlet oxygen. The latter, along with other free radicals, is responsible for the destruction of microbial cells. Due to the non-specific mechanism of action, the treatment used does not cause the development of microbial resistance to photosensitizers and gives a good therapeutic effect

Keywords: biofilm, photosensitizers, photodynamic inactivation of microbes

Laktoferyna jako jedno z białek siary o potencjale terapeutycznym

1. Wprowadzenie

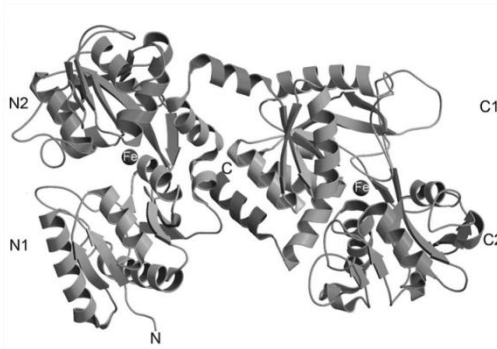
Siara jest wydzieliną gruczołów mlekowych człowieka, stanowiącą bogactwo witamin i substancji mineralnych kluczowych dla właściwego rozwoju noworodka. W swoim składzie zawiera wiele białek, m.in. immunoglobuliny, lizozym czy laktoferynę, wykazujących właściwości antybakteryjne. Laktoferyna (LF) jest białkiem, występującym oprócz siary także w neutrofilach, płynach ustrojowych i wydzielinach śluzowych człowieka. Cząsteczka laktoferyny od kilku dekad absorbuje uwagę naukowców, gdyż wykazuje wiele różnorodnych aktywności na zróżnicowanych płaszczyznach funkcjonowania organizmu ssaka. Artykuł ma na celu zebranie dotychczasowych informacji zdobytych o tym białku i usystematyzowanie ich. Bez wątpienia niezbędne jest prowadzenie dalszych badań, które dadzą możliwość wykorzystania pełnego zasobu możliwości laktoferyny i odkrycia jej nieznanych dotąd funkcji, mogących służyć człowiekowi w ochronie zdrowia.

2. Budowa cząsteczki laktoferyny

Ludzka laktoferyna jest dodatnio naładowanym białkiem składającym się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, w którego skład wchodzi 703 aminokwasy (w formie prebiałka). Cząsteczka składa się z dwóch fragmentów (płatów) podzielonych na dwie odrębne domeny – fragment N-końcowy, składający się z domen N1 i N2 oraz C-końcowy, w skład którego wchodzi domeny C1 i C2. Oba regiony są względem siebie w 33-41% homologiczne. Każdy z nich posiada jedno miejsce dla wiązania jonów żelaza na +II lub +III stopniu utlenienia oraz jedno lub kilka miejsc, które potencjalnie mogą okazać się centrum dla reakcji glikozylacji. Liczba miejsc wiązania żelaza oraz obecność miejsc glikozylacji zależy od gatunku osobnika, z którego wyizolowano laktoferynę. Struktura przestrzenna LF definiowana jest przez stopień wysycenia tego białka żelazem (rys. 1). Laktoferynę nie wysyconą żelazem nazywamy apolaktoferyną (apo-LF), jednym jonem żelaza – monolaktoferyną (mono-LF), zaś laktoferynę wysyconą dwoma jonami Fe^{3+} – hololaktoferyną (holo-LF) [1,2]. Miejsce wiązania jonów zbudowane jest z czterech reszt aminokwasowych (Asp, Tyr, Tyr, His) oraz dwóch arginin wiążących jony CO_3^{3-} . W przypadku, gdy jon Fe^{3+} zostanie usunięty, laktoferyna wykazuje (z mniejszym powinowactwem) zdolność do tworzenia kompleksów z innymi jonami, m.in. Al^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} czy Zn^{2+} . Do reszt aminokwasów tworzących łańcuch białkowy cząsteczki LF dołączone są wiązania N-glikozydowymi łańcuchy cukrowe, stanowiące 6,5% całkowitej masy cząsteczki [3].

¹ anna.michalicha@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

² alekklepka@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie



Rysunek 1. Struktura przestrzenna hololaktoferyny [4]

Początkowo laktoferynę nazywano laktotransferyną, gdyż jest ona glikoproteina pochodzącą z mleka i posiadającą zdolność chelatowania jonów żelaza. Białko to należy do rodziny transferyn, wśród których ponadto wyróżnia się owotransferynę (ovoTf), izolowaną z ptasich jaj, czy transferynę (Tf) izolowaną z osocza i limfy ssaków. Laktoferyna wyróżnia się na tle tych białek, gdyż wykazuje najwyższe wśród nich powinowactwo do jonów żelaza. Syntetyzowana jest przez gruczoł sutkowy, a jej wysoką zawartość stwierdza się w siarce i mleku. Wskazuje to na uczestnictwo laktoferyny w pierwotnej linii obrony organizmu noworodka. W zestawieniu z mlekiem innych ssaków, mleko ludzkie zawiera najwięcej laktoferyny. Dla porównania, mleko ludzkie zawiera 2,6 mg LF/ml, natomiast mleko bydlęce jedynie 0,09 mg LF/ml.

Po raz pierwszy laktoferynę zidentyfikowano w 1939 roku, zaś w 1960 roku wyizolowano zarówno z mleka ludzkiego jak i krowiego. Obecnie trwające badania mają na celu odkryć nowe kierunki działania laktoferyny w organizmach ssaków. Ekspresja laktoferyny została zaobserwowana w przedimplantacyjnym stadium rozwoju zarodków mysich, utrzymującym się do momentu stadium blastocysty. Ponowny wzrost jej stężenia następuje w drugiej połowie ciąży. Na tym etapie obecność laktoferyny obserwuje się w neutrofilach i komórkach nabłonkowych rozwijających się układów pokarmowego i oddechowego. W organizmie dorosłego człowieka białko to syntetyzowane jest przez gruczolowe komórki nabłonkowe różnych narządów i uwalniane do odpowiednich wydzielin. Najwyższe stężenie laktoferyna osiąga w siarce i mleku, niższy jej poziom obserwowany jest w ślinie, łzach, śluzie z nosa i oskrzeli, wydzielinach przewodu pokarmowego i narządów płciowych. Obecność laktoferyny ostatecznie potwierdzono w ziarnach swoistych neutrofilii, gdzie podczas granulopoezy w stadium mielocytowym zachodzi jej synteza [1].

Laktoferyna wrażliwa jest na obróbkę termiczną i ulega denaturacji w środowisku obojętnym przy 90°C (80°C w alkalicznym). W przemyśle mleczarskim wymaga do tej reakcji warunków UHT (*ultra-high temperature*) [5].

3. Właściwości biologiczne laktoferyny

3.1. Działanie przeciwbakteryjne

Zdolność do wywoływania efektu bakteriobójczego czyni laktoferynę ciekawą alternatywą w walce z antybiotykoopornością. Bakteriostatyczna aktywność LF wynika m.in. z jej zdolności do chelatowania jonów żelaza, będących ważnym czynnikiem pobudzającym wzrost i proliferację komórek bakteryjnych. Aktywność tę wykazano po raz pierwszy w 1966 r. na przykładzie Gram-dodatniego gronkowca, *Staphylococcus albus* [6]. Poza tym, dzięki obecności w swej strukturze silnie dodatnio naładowanego regionu N-końcowego, laktoferyna może wywierać bakteriobójcze działanie także bezpośrednio. Poprzez ten mechanizm LF zwiększa przepuszczalność i dezintegruje ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich, indukując tym samym ich śmierć.

Laktoferyna ma także zdolność do wiązania lipopolisacharydu (LPS) w ścianie komórkowej bakterii Gram-ujemnych [1]. Ujemnie naładowana warstwa powierzchni błony zewnętrznej, stabilizowana przez bakteryjny lipopolisacharyd, łatwo wiąże się za pomocą oddziaływań elektrostatycznych z naładowaną dodatnio cząsteczką laktoferyny. Ta, odrywając się wraz z cząsteczką LPS, wywołuje szok osmotyczny i rozrywa ścianę komórkową bakterii. Dodatkowo, laktoferyna może wiązać się z porynami obecnymi w błonie zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, tym samym uniemożliwiając komórce dystrybucję niezbędnych do przeżycia jonów i cząsteczek [7].

Wiele gatunków bakterii patogennych ma zdolność do tworzenia biofilmu, czyli złożonej struktury komórkowej, wysyczonej substancjami przez nie produkowanymi, przylegającej ściśle do podłoża. W czasie infekcji podłoże to stanowią ludzkie tkanki nabłonkowe, do których w procesie adhezji przylegają bakterie. Jest to jeden z ważniejszych czynników wirulencji bakterii. Sam proces warunkowany jest obecnością na ich fimbriach pospolitych białek adhezyjnych (CAM). Laktoferyna może hamować proces powstawania biofilmu, a także unieczynnić już istniejący. Jest to możliwe dzięki zdolności do wiązania się z adhezynami i uniemożliwianiu komórkom bakteryjnym adhezji, a także poprzez sekwestrację żelaza, która wzmacnia u bakterii ruchliwość i powoduje ich odłączenie od biofilmu [8].

3.2. Działanie przeciwwirusowe

Laktoferyna, a także jej pochodna – laktoferycyna (będąca N-końcowym fragmentem cząsteczki LF) posiadają zdolność do wiązania się z proteoglikanami (np. siarczanem heparanu) obecnymi na powierzchni komórek gospodarza. W ten sposób na zasadzie konkurencji blokują wiązanie cząsteczek wirusa do receptorów obecnych na błonie komórkowej. Zarówno laktoferyna, jak i laktoferycyna będąc dodatkowo naładowanymi cząsteczkami łączą się z anionowymi proteoglikanami na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych. Oprócz tego, mogą oddziaływać bezpośrednio z białkami wirusa. Dzięki temu uniemożliwiają wirusom adhezję do komórki. LF

wykazuje powinowactwo zarówno do wirusów otoczkowych (HIV, HSV-1 i -2, HCV), jak i bezotoczkowych (HPV).

Prócz tego, laktoferyna wykazuje zdolność wnikania poprzez błony lipidowe do cytoplazmy i jądra komórkowego, regulując w nich szlaki sygnałowe. Obecność czterech arginin w regionie N-terminalnym stanowi sygnał transportu do jądra komórkowego. LF wykazuje powinowactwo do DNA i wpływa na ekspresję niektórych genów (np. genu IL-1 β) [9, 10]. Ponadto zdolność do wnikania w głąb komórki umożliwia laktoferynie hamowanie replikacji wirusowego genomu w limfocytach Th, co możliwe jest dzięki inhibicji wirusowych enzymów (rewertazy i integrazy HIV). Ta cecha może mieć istotne znaczenie w poszukiwaniu środków terapeutycznych w zespole nabytego niedoboru odporności (AIDS) [11].

W wynikach badań opublikowanych w 1999 r. wykazano istotne znaczenie laktoferyny w zapobieganiu infekcji wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV). Aktywność tego białka badano na linii ludzkich komórek wątroby zainfekowanych wirusem zapalenia wątroby typu C. Wykazano, że LF może swoiście wiązać się z antygenem CD81, stanowiącym receptor dla wirusa HCV. Dzięki temu blokowane jest wiązanie białek kapsydu wirusa (E1 oraz E2) do powierzchni hepatocytów i hamowanie infekcji na etapie adsorpcji [12].

3.3. Wpływ na infekcje grzybicze i pasożytnicze

Aktywność przeciwgrzybicza laktoferyny wiąże się z jej zdolnością do chelatowania jonów żelaza. LF ponadto zwiększa przepuszczalność błony komórkowej komórek grzyba, a także jako silnie dodatnio naładowana cząsteczka wchodzi w interakcje ze ścianą komórkową, powodując tym samym jej dezintegrację. Jak dotąd wykonano dużą ilość testów na zwierzętach oraz pojedyncze próby na ludziach z użyciem LF w leczeniu grzybic o różnej etiologii. Cząsteczka ta zdolna jest m.in. do zahamowania infekcji jamy ustnej grzybem *Candida albicans* [13].

Zdolność do chelatowania jonów żelaza przez laktoferynę ma także znaczenie w infekcjach pasożytniczych. Hamuje ona wzrost pasożyta, dzięki uniemożliwieniu mu wchłaniania jonów Fe³⁺. Aktywność tę wykazano na *Pneumocystis carinii*. Udowodniono też, że trofozoity *Toxoplasma gondii* inkubowane z laktoferyną wykazują mniejszą zdolność zakażenia swoich żywicieli, choć mechanizmu tego zjawiska jak dotąd nie wyjaśniono. Podejrzewa się, iż ma ono związek z zaburzeniem integralności błony komórkowej pierwotniaka, a także z pozytywnym wpływem LF na tkanki gospodarza [14].

3.4. Właściwości przeciwnowotworowe

Laktoferyna wpływa na zdolności organizmu do walki z komórkami nowotworowymi głównie przez stymulację i modulację działania układu immunologicznego. W badaniach przeprowadzonych w 1999 r. wykazano, że laktoferyna wpływa hamująco na etap proliferacji w kancerogenezie. Wynika to z jej zdolności do modulacji funkcjonowania białek regulatorowych, np. białka p53, mającego zdolność do regulacji cyklu życiowego komórki. Udowodniono ponadto, że po poddaniu tkanki limfatycznej

związanej z układem pokarmowym (GALT) działaniu LF, wywołana zostaje odpowiedź immunologiczna. Jest ona efektem pobudzenia komórek nabłonka jelitowego do wzmożonej sekrecji IL-18, wpływającej na aktywność komórek NK i limfocytów CD8+. Komórki te zdolne są do unieszkodliwiania już istniejących zmian powstałych w komórkach nowotworowych oraz do hamowania metastazy [15].

Opracowano dwie teorie tłumaczące działanie LF, w kontekście których omówić można wpływ tego białka na guzy nowotworowe. Pierwszą z nich jest tzw. teoria „bilardu”. Mówi o bezpośrednim działaniu na komórki nowotworowe obecne w układzie pokarmowym. W ten sposób stymulowany jest GALT, z którego do krwi i chłonki docierają aktywowane komórki odpornościowe stymulujące odpowiedź immunologiczną przeciwnowotworową w całym organizmie. Według teorii „syczoryka szwajcarskiego” natomiast, laktoferyna przedostając się przez śluzówkę jelit do krwioobiegu dociera bezpośrednio w okolice guza, gdzie współpracując z komórkami odpornościowymi hamuje angiogenezę i proliferację, oraz indukuje apoptozę niewłaściwie działających komórek [8, 16].

Wśród ważniejszych funkcji laktoferyny o znaczeniu przeciwnowotworowym wymienia się także jej zdolność do chelatowania jonów Fe^{3+} , która ogranicza proliferację komórek nowotworowych wymagających łatwo przyswajalnego ze środowiska żelaza. Właściwości antyoksydacyjne LF umożliwiają natomiast ochronę zdrowych komórek organizmu przed działaniem wolnych rodników, w tym reaktywnych form tlenu. Mogą one doprowadzać do uszkodzeń komórki, w tym do mutacji DNA, stanowiących początek kancerogenezy. Laktoferyna może także pobudzać procesy naprawy uszkodzonego DNA w komórce, a także obniżać ekspresję onkogenów [8].

3.5. Wpływ na układ immunologiczny

Laktoferyna jest syntetyzowana podczas naturalnego przekształcania promielocytów do mielocytów i można ją zidentyfikować w ziarnistościach wtórnych (swoistych) neutrofilii ($3-15 \mu\text{g}/10^6$ neutrofilii). Jest tam magazynowana w formie apolaktoferyny [17]. W czasie infekcji w otoczeniu obecne są m.in. antygeny bakteryjne i cytokiny. W rezultacie następuje aktywacja neutrofilii i uwolnienie LF do środowiska reakcji. W osoczu stężenie laktoferyny wynosi $0,4-2 \mu\text{g}/\text{ml}$. Kiedy jednak w organizmie pacjenta dochodzi do sepsy, aktywowane we krwi neutrofile w procesie degranulacji dostarczają do osocza duże ilości laktoferyny ($0,2 \text{ mg}/\text{ml}$). Mogą również uwalniać laktoferynę do światła jelita (skąd trafia do kału) podczas procesów zapalnych w przebiegu zakażeń bakteryjnych, mających miejsce m.in. w nieswoistym zapaleniu jelit (IBD), w tym: wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (CU) czy w chorobie Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) [18].

Laktoferyna łączy się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek nabłonka i układu immunologicznego, a także ma zdolność do wiązania lipo polisacharydu w ścianie komórkowej bakterii. Działając za pośrednictwem dwóch wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych (NF- κ B oraz kinaz MAP), może wpływać na różnicowanie, dojrzewanie, proliferację, aktywację i migrację komórek

układu odpornościowego, w tym limfocytów T i B, neutrofilii, monocytów i makrofagów oraz komórek dendrytycznych (APC) [19].

Makrofagi biorą udział w odpowiedzi immunologicznej swoistej poprzez prezentację antygenów limfocytom T. Prócz tego mają zdolność do fagocytozy obcych cząstek i uwalniania mediatorów prozapalnych. Badania *in vitro* dowiodły, iż makrofagi ludzkie posiadają na swojej powierzchni receptory dla laktoferyny. LF zmniejsza ilość produkowanych cytokin prozapalnych (TNF- α) oraz interleukin IL-1 i IL-6, a także indukuje wydzielanie interferonu α i β (IFN α/β). Dodatkowo wpływa na zdolność makrofagów do prezentowania limfocytom T CD4⁺ antygenów. W komórkach nabłonkowych LF zwiększa ekspresję białek adhezyjnych, powodując tym samym naciekanie leukocytów w miejscu stanu zapalnego [1, 20].

Komórki dendrytyczne także mają zdolność do fagocytozy, biorą udział w różnicowaniu limfocytów T i regulują funkcjonowanie limfocytów T pamięci immunologicznej. Istotną rolę odgrywają w stymulacji limfocytów Th1, wzmagając wydzielanie cytokin. Komórki dendrytyczne również mogą wiązać laktoferynę, która stymuluje ich funkcje oraz działa jako sygnał do różnicowania w komórki prezentujące antygen (APC), uczestniczące w swoistej odpowiedzi immunologicznej [21].

Laktoferyna jest także zaangażowana w regulację funkcji limfocytów B i subpopulacji limfocytów T, które na swej powierzchni mają receptory dla tego białka. Redukuje ona odpowiedź na stan zapalny przy katarze siennym (ANN) poprzez hamowanie aktywności limfocytów Th2, Th17 i limfocytów T regulatorowych (Treg). Ponadto, LF może pobudzać odpowiedź limfocytów Th1 hamując jednocześnie odpowiedź limfocytów Th2, co prowadzi do zahamowania aktywacji limfocytów T, inhibicji uwalniania mediatorów prozapalnych (IL-5 czy IL-17) i ograniczenia zapalenia, poprzez sieciowanie receptorów tych komórek. Ta zdolność daje laktoferynie możliwość modulacji działania limfocytów T i komórek NK [22].

3.6. Wpływ na rozwój noworodka

Siara jest substancją wydzielaną przez gruczoły mleczne ssaków w ciągu pierwszych kilku dni po porodzie. Proces najintensywniejszego wydzielania siary ma miejsce jedynie przez kilka dni po porodzie. Jej właściwości odżywcze i immunomodulacyjne nieco odbiegają od właściwości mleka, gdyż poza białkami, węglowodanami, tłuszczami, witaminami oraz minerałami w swoim składzie zawiera czynniki wzrostu, takie jak np. insulinopodobny czynniki wzrostu I i II (IGF I i II), transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β), czy czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Jednym ze składników zarówno siary, jak i dojrzałego mleka jest także laktoferyna, syntetyzowana w nabłonku wydzielniczym gruczołu mlekowego matki [23].

Laktoferyna wykazuje powinowactwo do receptorów umiejscowionych na powierzchni enterocytów w śluzówce jelita cienkiego. Takie połączenie ułatwia wchłanianie składników odżywczych, głównie Fe z diety. Dzięki temu wzrasta absorpcja składników pokarmowych przez jelito. Mechanizm ten stanowi także element ochronny przed patogenami wnikającymi do ustroju przez układ pokarmowy. Jest to istotny aspekt, który należy wziąć pod uwagę dbając o ochronę delikatnego

przewodu pokarmowego wcześniaków, którego błona śluzowa tego przewodu jest dość cienka i niesprawna immunologicznie, a enzymy trawienne działają z niską wydajnością.

Skład mikroflory jelitowej noworodka zależy od rodzaju przyjmowanego pokarmu. Mikroflora dzieci karmionych sztucznie zawiera częściej patogenne szczepy bakterii (*Enterobacter* sp. czy *Enterococcus* sp.), natomiast dzieci karmione piersią posiadają w swym mikrobiomie niepatogenne szczepy *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp. Mają one kluczowe znaczenie w obniżaniu pH w jelitach, zwalczaniu karcynogenów i syntezie witamin. Dodatkowo konkurują w jelicie o substancje odżywcze z mikroorganizmami patogennymi. Laktoferyna dzięki swym właściwościom chelatującym dostarcza komórkom *Bifidobacterium* sp. żelaza niezbędnego do rozwoju [6].

Mechanizmy regulujące metabolizm żelaza dojrzewają stopniowo i skorelowane są z dojrzewaniem organizmu noworodka jako całości, przy zachowaniu właściwej dla każdego z etapów rozwoju homeostazy ustroju. Dzięki wysokiej biodostępności i przyswajalności dla organizmu dziecka żelaza pochodzącego z mleka matki, jest ono w stanie pokryć nawet 50% ogólnego zapotrzebowania na ten pierwiastek. Żelazo pojawiające się w produktach trawienia występuje jednak w formie jonu Fe^{3+} , trudno rozpuszczalnego i mało biodostępnego. By zostać pobranym przez enterocyt jon musi zostać zredukowany do Fe^{2+} przy udziale ferroksydazy. Następnie przez transporter metali dwuwartościowych (DMT-1) wchłaniany jest ze światła jelita do wnętrza enterocyty.

W przenoszeniu jonu do osocza udział bierze ferroportyna – białko transbłonowe, którego aktywność jest regulowana ujemnie przez hepcydynę (HAMP). W jej obecności zachodzi rozkład ferroportyny, co skutkuje obniżeniem stężenia żelaza we krwi. Gdy jony Fe^{3+} opuszczają enterocyty zostają związane przez transferynę i mogą być rozprowadzane do różnych komórek organizmu w zależności od zapotrzebowania. W organizmie noworodka mogą mieć miejsce naturalne wahania poziomu tego pierwiastka, począwszy od niedoborów do jego nadmiernego nagromadzenia. W rezultacie procesów będących następstwem niestabilnego poziomu żelaza możemy mieć do czynienia z anemią lub stresem oksydacyjnym spowodowanym nadmierną syntezą reaktywnych form tlenu. Przeprowadzone badania *in vitro* wskazują na możliwość wprowadzenia laktoferyny w kompleksie z żelazem do wnętrza enterocytów, jako bezinwazyjny sposób dostarczenia tego pierwiastka do krwiobiegu. Proces ten zachodzi dzięki regulacji syntezy receptorów dla cząsteczki białka. Regulacja następuje w odpowiedzi na aktualny poziom żelaza wewnątrzkomórkowego. Mechanizm ten umożliwi pobór jonów Fe^{3+} tylko w przypadku ich niskiego stężenia, co zapewnia stabilny poziom tego pierwiastka i wyeliminowanie jego niebezpiecznych dysproporcji [24, 25].

4. Laktoferyna w terapii

Helicobacter pylori to Gram-ujemna bakteria, nieodłącznie związana z organizmem człowieka na przestrzeni wieków, mimo że jej odkrycie odnotowano dopiero w 1980 roku. Zakażenie tym mikroorganizmem zazwyczaj ma miejsce w dzieciństwie, a jego następstwem mogą być choroby żołądkowo-jelitowe. *H. pylori* wykazuje szerokie

spektrum działania, wywołuje różne objawy i następstwa chorobowe – od przewlekłych chorób gastrycznych, do choroby nowotworowej żołądka [26].

Laktoferyna wykazuje zdolność do wiązania się z lipopolisacharydem bakterii Gram-ujemnych, tym samym powodując dezintegrację ich ściany komórkowej. Skutkiem tego bakterie pozbawione ściany komórkowej zostają wyeksponowane na działanie terapii antybiotykowej. Laktoferyna, obecnie używana w próbach klinicznych w celu eradykacji *H. pylori* to głównie laktoferyna bydłęca (bLF) oraz ludzka rekombinowana laktoferyna (rhLF), którą pozyskuje się w wyniku ekstrakcji ze zmodyfikowanych bakterii, drożdży czy też ryżu [27].

Wysokie stężenie laktoferyny w sianie, jak i jej obecność w mleku zdają się mieć istotne znaczenie we wspomaganiu organizmu dziecka w ochronie przed zakażeniami bakteryjnymi. Patogenne drobnoustroje są niebezpieczne dla przewodu pokarmowego dorosłego człowieka, szczególnie zaś dla noworodka, ponieważ hamują rozwój jego mikroflory jelitowej, a kolonizując przewód pokarmowy prowadzą do niebezpiecznych infekcji [28]. Zarówno Amerykańska Akademia Pediatrii oraz Europejskie Stowarzyszenie Neonatologii i Perinatologii zalecają, aby kobiety niezdolne do karmienia naturalnego swoich dzieci po urodzeniu zdecydowały się podawać niemowlętom mleko ludzkie dostępne w bankach mleka. Pokarm tego typu stanowi rezerwuuar substancji korzystnie wpływających na rozwój noworodka, ze szczególnym uwzględnieniem pierwszych dni życia. Dzięki zastosowaniu mleka pochodzenia ludzkiego w karmieniu niemowląt możemy wpłynąć na zmniejszenie wystąpienia infekcji dróg oddechowych, martwiczego zapalenia jelit, a w szczególności zapobiec wystąpieniu sepsy. Opóźnianie decyzji o dojelitowym karmieniu wcześniaków wpływa często na spadek poziomu laktoferyny u dzieci przedwcześnie urodzonych. Takie straty mogą okazać się niebezpieczne dla wcześniaków i wzmacniać ryzyko wystąpienia sepsy. Laktoferyna bydłęca wykazuje 70% homologię do laktoferyny ludzkiej, charakteryzując się przy tym wysoką aktywnością antybakteryjną. Czyni ją to obiecującym zamiennikiem przy sporządzaniu preparatów tego białka oraz mieszanek sztucznego mleka dla niemowląt [29].

Preparaty zawierające zarówno ludzką (hLF), jak i bydłęcą laktoferynę (bLF) zostały szeroko zbadane pod kątem działania tych związków w zwalczaniu komórek nowotworowych [30].

W eksperymentach wykonywanych *in vitro* wykazano hamujący wpływ laktoferyny ludzkiej na wzrost linii ciągłych (nieśmiertelnych) raka piersi i raka okrężnicy [14]. Z kolei laktoferyna pochodzenia bydłęcego ma zdolność hamowania wzrostu komórek wywodzących się z linii zmienionych nowotworowo komórek szyjki macicy [31].

Wyżej wymienione aktywności *in vitro* znajdują swoje potwierdzenie w badaniach przedklinicznych, np. w doświadczeniu demonstrującym inhibicję rozwoju komórek nowotworowych u myszy przy zastosowaniu laktoferyny bydłeczej [32]. Dodatkowo laktoferyna testowana była u pacjentów cierpiących na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuc. U chorych, w przypadku których uprzednio prowadzone standardowe terapie antynowotworowe zawiodły, odnotowano pozytywny wpływ rekombinowanej ludzkiej laktoferyny (rhLF) [33, 34].

5. Podsumowanie

Wielokierunkowe działanie laktoferyny wydaje się mieć istotne znaczenie w rozwoju osobniczym człowieka. Z użyciem tego białka opracowano jak dotąd wiele leków i suplementów diety mających zastosowanie w ochronie zdrowia. Szersza wiedza na temat działania laktoferyny może okazać się nieoceniona w medycynie, farmaceutyce czy biotechnologii. Warto zatem przyjrzeć się bliżej temu niezwykle białku, by odkryć nowe ścieżki jego wykorzystania dla potrzeb człowieka.

Literatura

1. Trybek G., Metlerski M., Szumilas K., Aniko-Włodarczyk M., Preuss O., Grocholewicz K., Wiszniewska B. *The biological properties of lactoferrin*, Central European Journal of Sport Sciences and Medicine, 15 (2016), s. 15-22.
2. Jameson G.B., Anderson B.F., Norris G.E., Thomas D.H., Baker E.N. *Structure of human apolactoferrin at 2.0 °A resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change*, Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 54 (1998), s. 1319–1335.
3. Gajda-Morszewski P., Śpiewak K. *Laktoferyna – białko multipotencjalne*, Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe 10 (2015), s. 178-186.
4. Baker E.N. Baker H.M. *A structural perspective on lactoferrin function*, Biochem. Cell Biol. 90 (2012), s. 322.
5. Zander Z., Zander L., Mickiewicz D. *Laktoferyna - multipotencjalne białko mleka*, Intensywne Mleczarstwo (2014), s. 18-21.
6. Artym J. *Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część II: Działanie przeciwmikrobiologiczne i przeciwzapalne poprzez sekwestrację żelaza.*, Postępy Hig. Med. Dosw. 64 (2012), s. 604-616.
7. Valenti P., Antonini G. *Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack.*, Cellular and Molecular Life Sciences 62 (2005), s. 2576–2587.
8. Artym J. *Laktoferyna – niezwykle białko*, wyd. Borgis (2012), s. 7-10, 77-85, 139-149, 151-162.
9. Son K.-N., Park J., Chung C.-K., Chung D.K., Yu D.-Y., Lee K.-K., Kim J. *Human lactoferrin activates transcription of IL-1 β gene in mammalian cells* Biochem. Bioph. Res. Co. 290 (2002), s. 236-241.
10. Andersen J.H., Jenssen H., Sandvik K., Gutteberg T.J. *Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface.*, J. Med. Virol. 74 (2004), s. 262–271.
11. Berlutti F., Pantanella F., Natalizi T., Frioni A., Paesano R., Polimeni A., Valenti P. *Antiviral properties of lactoferrin – a natural immunity molecule.*, Molecules 16 (2011), s. 6992-7018.
12. Tanaka K., Ikeda M., Nozaki A., Kato N., Tsuda H., Saito S., Sekihara H. *Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study.*, Jpn. J. Cancer Res. 90 (1999), s. 367-371.
13. Velliyagounder K., Alsaedi W., Alabdulmohsen W., Markowitz K., Fine D.H. *Oral lactoferrin protects against experimental candidiasis in mice*, J. Appl. Microbiol. 118 (2015), 212–221.
14. Małaczewska J., Rotkiewicz Z. *Laktoferyna – białko multipotencjalne.*, Medycyna Wet. 63 (2007), s. 136–139..

15. Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y., 1999, *Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells*, J. Cell Biochem. 74 (1999), s. 486-498.
16. Wolf J.S., Li D., Taylor R.J., O'Malley B.W. Jr 2003, Jr: *Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck*, ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 65 (2003), s. 245-249.
17. Farnaud S., Evans R.W. *Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties*, Mol. Immunol. 40 (2003), s. 395–405..
18. Drago-Serrano M.E., Campos-Rodríguez R., Julio César Carrero, de la Garza M. *Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections*, Int. J. Mol. Sci 18 (2017), s. 501-526.
19. Gahr M., Speer C.P., Damerau B., Sawatzki G. *Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes*, J. Leukoc. Biol. 49 (1991), s. 427–433..
20. Kim C.W., Lee T.H., Park K.H., Choi S.Y., Kim J. *Human lactoferrin suppresses TNF- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via competition with NF- κ B in endothelial cells*, FEBS Letters 586 (2012), s. 229-234.
21. Yang D., de la Rosa G., Tewary P., Oppenheim J.J. *Alarmins link neutrophils and dendritic cells*, Trends Immunol. 30 (2009), s. 531–537.
22. Siqueiros-Cendón T., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F., García-Montoya I.A., Salazar-Martínez J., Rascón-Cruz Q. *Immunomodulatory effects of lactoferrin*, Acta Pharmacol. Sin. 35 (2014), s. 557–566.
23. Macierzyńska A., Pierzchała E. *Siara bydlęca - właściwości i zastosowanie*, Dermatologia Estetyczna 6 (2011).
24. Collard K. J. *Iron homeostasis in the neonate*, Pediatrics 123 (2009), s. 1208-1216.
25. Ashida K., Sasaki H., Suzuki Y.A., Lonnerdal B. *Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells*, Biometals 17 (2004), s. 311-315.
26. Manfredi M, Bizzarri B., Sacchero R.I., Maccari S., Calabrese L, Fabbian F., De' Angelis G.L. *Helicobacter pylori infection in clinical practice: probiotics and a combination of probiotics + lactoferrin improve compliance, but not eradication, in sequential therapy*, Helicobacter 17 (2012), s. 254-263.
27. Yuping Y., Qinyi W., Guoxiang C, Xuefang L., Siguo L., Juan L., Aimin Z., Li B., Jianquan C., Jiajun L.V., Xiangqian D., Gang Y., Yunzhen Z., Lanqing M. *Recombinant human lactoferrin enhances the efficacy of triple therapy in mice infected with Helicobacter pylori*, Int. J. Mol. Med. 36 (2015), s. 363-368.
28. Lis J., Orczyk-Pawłowicz M., Kątnik-Prastowska I. *Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne*, Postepy Hig. Med. Dosw. 67 (2013), s. 529-547.
29. Ramasethu J. *Prevention and treatment of neonatal nosocomial infections*, Matern Health Neonatol. Perinatol. 3 (2017).
30. Vogel H.J. *Lactoferrin , a bird's eye view*, Biochem. Cell Biol. 90 (2012), s. 233–244.
31. Zemann N., Klein P., Wetzel E., Huettinger F., Huettinger M. *Lactoferrin induces growth arrest and nuclear accumulation of Smad-2 in HeLa cells*, Biochimie 92 (2010): s. 880–884.
32. Yoo Y., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I. *Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice*, Japanese J. Cancer Res. 88 (1997): s. 184-190.

33. Parikh P.M., Vaid A., Advani S.H., Digumarti R., Madhavan J. *Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of single agent oral talactoferrin in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer that progressed after chemotherapy*. J. Clin. Oncol. 29 (2012): s. 4129–4136.
34. Arias M., Hilchie A.L., Haney E.F., Bolscher J.G., Hyndman M.E., Hancock R.E., Vogel H.J. *Anticancer activities of bovine and human lactoferricin - derived peptide*, Biochem. Cell Biol. 95 (2017), s. 91-98.

Laktoferyna jako jedno z białek siary o potencjale terapeutycznym

Streszczenie

Laktoferyna jest białkiem występującym w dużym stężeniu w sianie i mleku, zaś w mniejszej ilości w innych wydzielinach człowieka. Jest peptydem złożonym z 703 aminokwasów o masie molekularnej 77 kDa. Posiada szerokie spektrum działania obejmujące między innymi działanie antybakteryjne, przeciwnowotworowe, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, immunomodulacyjne i wiele innych. Laktoferyna uczestniczy również w procesach metabolizmu żelaza: odpowiada za jego wchłanianie w jelicie. Ma również zdolność do ograniczania dostępności tego pierwiastka dla patogennych drobnoustrojów. Ponadto, laktoferyna należąc do rodziny transferyn ma zdolność do tworzenia kompleksów z żelazem, będąc przy tym jednym z czynników warunkujących jego wchłanianie. Dzięki temu jest wykorzystywana przy sporządzaniu preparatów żelaza o zwiększonym wchłanianiu. Wpływa również na procesy oksydoredukcyjne regulując dostępność katalizującego je żelaza. W odżywkach dla dzieci buduje system naturalnej odporności organizmu. Białko to jest bardzo interesujące ze względu na różnorodność pełnionych funkcji przy jednoczesnym braku toksyczności. Dalsze badania działania laktoferyny mogą w przyszłości poszerzyć jej terapeutyczne zastosowania.

Słowa kluczowe: laktoferyna- funkcje biologiczne, siara, bakterie

Lactoferrin as one of the colostrum proteins with therapeutic potential

Lactoferrin is a protein that occurs in high concentration in colostrum and milk, and in less quantity in other human secretions. It is a peptide consisting of 703 aminoacids with molecular weight 77 kDa. It has a wide range of activities, including antibacterial, anticancer, antifungal, antiviral, immunomodulatory effects and many others. Lactoferrin is also involved in iron metabolism processes: it is responsible for its intestinal absorption. As well, it has ability to reduce availability of that chemical element for pathogenesis microbes. Furthermore, lactoferrin can form a complex with iron and at the same time condition its absorption. Owing to that it is used for producing iron specimens with higher absorption level. It also alters on redox reactions because it regulates availability of iron which catalyses them. In nutrients for children it stimulates development of natural immunity. This protein is very interesting because of its various functions and non-toxicity. Thanks to further researches on functioning of this peptide in future, it can show a new, wider therapeutic use.

Keywords: lactoferrin- biological functions, colostrum, bacteria,

Hepcydyna i erytroferon – nowe białka przydatne w ocenie metabolizmu żelaza

1. Wstęp

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Mikroelement ten bierze udział w wielu procesach zachodzących w ustroju. Należą do nich m.in. transport tlenu, synteza kwasów nukleinowych oraz udział w regulacji cyklu komórkowego. Dodatkowo istnieje związek pomiędzy stężeniem żelaza w surowicy, a dojrzewaniem limfocytów i prawidłowym funkcjonowaniem narządu wzroku. Z drugiej natomiast strony podkreśla się również jego toksyczność w związku z przeładowaniem żelazem organizmu [20].

Metabolizm żelaza jest nadzorowany przez wiele białek, których udział jest niezbędny i stale poznawany. Jednym z nich jest hepcydyna, czyli główny czynnik regulujący homeostazę żelaza całego organizmu [3, 21].

Podczas badań nad hepcydyną w gospodarce żelazowej w ostatnim czasie poznano nowe białko regulujące metabolizm – erytroferon. Właściwości tego białka wpływają na związek z metabolizmem erytropoetyny. Zaczęto wiązać udział białka w chorobach związanych zarówno z przeładowaniem żelazem np. w β -talasemii, jak i w stanach niedoborowych spowodowanych chorobami przewlekłymi.

2. Metabolizm żelaza

Niemal wszystkie komórki organizmu wykorzystują żelazo w przemianach biochemicznych. Jest to spowodowane elastyczną koordynacją chemiczną, którą wykazuje reaktywność żelaza [2]. Krytyczna rola żelaza w metabolizmie ssaków jest związana z jego zdolnością do utleniania i redukcji [25].

Jako składnik hemu odgrywa ono istotną rolę w funkcjonowaniu hemoprotein, takich jak: hemoglobina, mioglobina, katalaza, cytochromy łańcucha oddechowego oraz cytochromy P-450 [25]. W przeciętnej diecie człowiek spożywa 10-15 mg żelaza w postaci hemowej i niehemowej, z czego wchłania się do krwi około 10%, przy czym żelazo hemowe wchłania się prawie w 22%, a niehemowe – zaledwie w 2-5% [17].

Jony żelaza znajdujące się w ustroju człowieka pochodzą z dwóch źródeł: z pokarmu oraz z rozkładu erytrocytów w śledzionie. Metabolizm żelaza w ustroju obejmuje:

¹ dominikaskonieczna19@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK

² paulina.slawianowska@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK

³ agatkasmalczewska@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK

⁴ igaholynska@cm.umk.pl, Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK

1) absorpcję w przewodzie pokarmowym, 2) transport do wszystkich komórek organizmu, 3) przejście żelaza przez błonę komórkową, 4) udział w procesach metabolicznych, 5) odzyskiwanie

żelaza z rozpadłych erytrocytów oraz 6) procesy magazynowania żelaza [4]. W pożywieniu znajduje się żelazo zarówno dwu-, jak i trójwartościowe [4]. W żołądku jest uwalniane ze związków organicznych i w jego kwaśnym środowisku w znacznej części redukowane do postaci Fe^{2+} , która jest rozpuszczalna w wodzie i wchłaniana w jelicie, w optymalnym pH [4]. Środowisko zasadowe powoduje tworzenie się kompleksów dwuwartościowego żelaza, co uniemożliwia wchłanianie w dalszych częściach przewodu pokarmowego.

Absorpcja żelaza odbywa się głównie w dwunastnicy – fragmencie jelita cienkiego położonym między odźwiernikiem, a więzadłem Treitza, najintensywniej w jej odcinku proksymalnym, usytuowanym za żołądkiem [26]. Komórkami biorącymi czynny udział w transporcie żelaza ze światła dwunastnicy do krwi są enterocyty wierzchołkowe, znajdujące się w górnej części kosmków jelitowych [19]. W dwunastniczej redukcji żelaza z trójwartościowego do dwuwartościowego bierze udział cytochrom B, jest to feroreduktaza (E.C.1.16.1.10) obecna na powierzchni rąbka szczoteczkowego dojrzałych jelitowych komórek absorpcyjnych. Zredukowana forma jonów żelaza umożliwia absorpcję tego pierwiastka. Za wchłanianie Fe w enterocytach dwunastnicy odpowiada transporter DMT1 (ang. divalent metal transporter). DMT1 posiada 12 domen błonowych i wykazuje wysokie powinowactwo do jonów Fe^{2+} , których elektrogeniczny transport do cytoplazmy enterocytów powiązany jest z transportem protonów H^+ [10].

Jedynym znanym dotychczas transporterem żelaza jonowego przez błonę bazolateralną enterocyta jest ferroportyna, znana również pod innymi nazwami: Ireg1 (ang. Iron-regulated transporter 1), MTP1 (ang. Metal Transporter Protein 1) i SLC40A1 (ang. Solute Carrier family 40 member 1) [26]. Jest to jedyne u ssaków znane białko, które transportuje jony żelaza z komórki do środowiska pozakomórkowego [26]. W transporcie żelaza przez błonę bazolateralną enterocyta, w parze z ferroportyną, ściśle współdziała hefajstyna (E.C. 1.16.3.1), enzym zależny od jonów miedzi, posiadający aktywność ferooksydazową [6]. Jony Fe^{2+} są transportowane przez ferroportynę, a następnie utleniane do jonów Fe^{3+} przez hefajstynę i w takiej postaci mogą być przyłączone do transferyny [26]. Jedna cząsteczka tego białka wiąże dwa atomy Fe^{3+} i transportuje je do większości komórek ustroju, w tym do szpiku kostnego, gdzie żelazo jest wykorzystywane w procesie erytropoezy, czyli tworzenia krwinek czerwonych [4]. Kompleks receptor-transferyna z żelazem ulega internalizacji w procesie endocytozy, a żelazo jest uwalniane w kwaśnym środowisku utworzonego endosomu [4]. Kompleks receptor-transferyna wraca na powierzchnię komórki, transferyna w fizjologicznym pH odłącza się od niego i jest gotowa do transportu kolejnych jonów żelaza [4].

By pozbawić środowisko wolnego żelaza i uniemożliwić jego pobór przez komórki patogenów, organizm wytworzył liczne związki (tj. głównie białka), które tak ściśle wiążą żelazo, by stało się nieosiągalne dla drobnoustrojów, ograniczając w ten sposób ich wzrost [5]. Do związków tego typu zaliczamy u ssaków: transferynę obecną w osoczu krwi, laktoferynę występującą w wydzielinach nabłonkowych, neutrofilach

i osoczu krwi oraz ferrytynę w przestrzeni wewnątrzkomórkowej [5]. Zaburzenia w funkcjonowaniu białek i enzymów powodują, że metabolizm żelaza jest nieefektywny.

Celem pracy było przedstawienie nowopoznanych związków, które biorą udział w metabolizmie żelaza, na podstawie przeglądu literatury naukowej.

3. Markery w metabolizmie żelaza

3.1. Hepcydyna – rola w homeostazie żelaza

Regulacja metabolizmu żelaza w organizmie jest kontrolowana przez hepcydynę – hormon peptydowy zbudowany z 25 aminokwasów, którego synteza odbywa się głównie w wątrobie, ale także w niewielkim stopniu w adipocytach, makrofagach oraz mózgu [21].

Wpływając na ferroportynę, która jest transporterem żelaza z komórek do krwi, powoduje jej internalizację i lizosomalną degradację, co z kolei prowadzi do zmniejszenia eksportu żelaza komórkowego [23].

Konsekwencją wysokiej ekspresji ferroportyny w enterocytach dwunastnicy i makrofagach jest hamowanie wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego oraz recyklingu żelaza ze starzejących się krwinek czerwonych, w sytuacji gdy poziom hepcydyny jest wysoki [3]. Z kolei, w momencie wystąpienia deficytu żelaza, w celu zwiększenia transportu żelaza do osocza krwi produkcja hepcydyny przez hepatocyty jest obniżona bądź zahamowana [8]. Zarówno dwuferryczna (całkowicie wysycona żelazem) ferrytyna, jak i zmagazynowane w wątrobie żelazo może stymulować syntezę hepcydyny w oddzielnych mechanizmach [24].

Produkcja hepcydyny w hepatocytach odbywa się również pod wpływem substancji prozapalnych, przede wszystkim Il-6, która aktywuje szlak JAK-STAT oraz gp130 [3]. Wzrost syntezy hepcydyny podczas infekcji może być adaptacją do hamowania transportu żelaza do krwi i tkanek, aby w ten sposób ograniczyć wzrost inwazji patogenów [3].

Hormon jest również zaangażowany w mechanizm szlaku regulującego nasilenie wchłaniania żelaza na drodze erytropoezy. Erytropoetyna hamuje syntezę hepcydyny w wątrobie poprzez wiązanie się z receptorem (EPO-R) na powierzchni hepatocytów [29].

Usuwanie hepcydyny z organizmu, ze względu na małe rozmiary i słabe wiązanie z białkami osocza, odbywa się przez nerki oraz endocytozę i proteolizę, w których pośredniczy ferroportyna [9].

3.2. Erytroferon – czynnik regulujący metabolizm żelaza

Erytroferon jest nowo poznany hormonem, który bierze udział w metabolizmie żelaza. Został ujawniony przy okazji badań nad udziałem hepcydyny w gospodarce żelazowej. Definiowanie erytroferonu należy zacząć od rodziny sekwencji analogicznych z sekwencją FAM132b.

Transkrypt FAM132b koduje białko (ERFE), którego ekspresja jest indukowana w szybkim czasie po utracie krwi [15]. Wydzielane białko było opisywane wcześniej jako mionektyna lub CTRP15, członek rodziny białek związanych ze składnikiem dopełniacza C1q i rodziny czynnika martwicy nowotworu TNF (ang. tumor necrosis factor) [15].

Erytroidalny regulator erytroferon (ERFE) to 354-aminokwasowe rozpuszczalne, kwaśne białko, pośredniczy w tłumieniu hepcydyny w czasie zwiększonej stymulacji erytropoezy za pomocą endogennej lub egzogennej erytropoetyny, a także ułatwia kompensację poziomu żelaza po anemii spowodowanej krwotokiem [15]. U ludzi, w czasie krótszym niż jeden dzień po krwotoku lub w wyniku podawania erytropoetyny, dwunastnicze wchłanianie żelaza jest zwiększane przez mechanizm, który prawdopodobnie ewoluował dla zapewnienia wymaganego poziomu żelaza w zwiększonej erytropoezie [14].

ERFE jest produkowany przez erytroidalne prekursorzy w szpiku i śledzionie, działa bezpośrednio w wątrobie przez zmniejszenie produkcji hepcydyny, a poprzez to zwiększenie dostępności żelaza do produkcji nowych krwinek czerwonych [12]. Kautz i wsp. [15] przy pomocy cytometrii przepływowej wykazali, że gen kodujący ERFE ulega ekspresji w różnych prekursorach erytroidalnych, najwyższy był w erytoblastach zasadochłonnych i polichromatofilnych.

Erytroferon ze względu na swoje właściwości jest związany z metabolizmem erytropoetyny. Aktywacja genu erytropoetyny jest związana z aktywacją szlaku sygnalizacji JAK2-STAT5 [15]. Region regulacyjny genu dla erytroferonu posiada kilka miejsc wiążących STAT5 [15]. Ekspresja erytroferonu po podaniu erytropoetyny jest mniejsza, co wskazuje na zależność ekspresji erytroferonu od aktywacji JAK2-STAT5 [15].

W przeciwieństwie adaptacyjnej roli w fizjologicznym odzyskiwaniu Fe, ERFE może również działać patologicznie, tłumiąc produkcję hepcydyny i pośrednicząc w przeładowaniu żelazem [16].

Tab. 1 Białka biorące udział w metabolizmie żelaza.

Białko	Występowanie	Rola
Ferroreduktaza (E.C.1.16.1.10)	Enterocyty rąbka szczoteczkowego	Utlenianie jonów Fe ³⁺ do Fe ²⁺ w świetle jelita [19]
DMT1 (ang. divalent metal transporter)	Enterocyty rąbka szczoteczkowego	Transport jonów Fe ²⁺ do enterocytów [10]
Ferroportyna	Enterocyty rąbka szczoteczkowego	Transport jonów Fe ²⁺ z enterocytów do przestrzeni podśluzówkowej [26]
Hefajstyna (E.C.1.16.3.1)	Enterocyty rąbka szczoteczkowego	Redukcja jonów Fe ²⁺ do Fe ³⁺ w przestrzeni podśluzówkowej [6]
Transferyna	Białko osocza	Transport jonów Fe ³⁺ do komórek organizmu [4]
Hepcydyna	Enterocyty rąbka szczoteczkowego	Inhibicja, internalizacja i degradacja ferroportyny [23]
Erytroferon	Wątroba	Hamowanie ekspresji hepcydyny [12]

3.2.1. Wpływ erytroferonu na wystąpienie przeładowania żelazem w β -talasemii

β -talasemie stanowią grupę chorób monogenowych, charakteryzujących się zaburzeniami syntezy białkowej części hemoglobiny, spowodowanymi mutacjami w genach, które je kodują [27]. W konsekwencji dochodzi do obniżenia lub braku ekspresji łańcuchów β -globin hemoglobiny [27]. Zmniejszona produkcja prawidłowej

hemoglobiny prowadzi do niedokrwistości, a zaburzenie proporcji między poszczególnymi łańcuchami globiny, wynikające z niedoboru lub braku łańcucha β -globiny przyczynia się do niestabilności erytrocytów i ich prekursorów, czego wynikiem jest powstanie niedokrwistości hemolitycznej [27].

W przebiegu talasemii erytrocyty wykazują znacznie zwiększoną podatność na stres tlenowy. Powstałe wolne rodniki tlenu prowadzą m.in. do uszkodzeń błon komórkowych, DNA, czyli materiału genetycznego niezbędnego do podziału komórek jądrzastych, inaktywacji enzymów i peroksydacji lipidów [27]. Reaktywne formy tlenu (RFT) mogą również stymulować ekspresję czynnika różnicowania wzrostu 11 (GDF11), odgrywającego istotną rolę w nieefektywnej erytropoezie, która powoduje erytrocytarny rozrost niedojrzałych erytroblastów i hamowanie końcowego etapu dojrzewania erytrocytów [20].

Nieskuteczna erytropoeza w β -talasemii ma również związek ze zjawiskiem przeładownia żelazem [20]. Pacjenci, u których stwierdzono najcięższą postać (β -talasemia major) wymagają ciągłych transfuzji krwinek czerwonych, ale także chelatacji żelaza, w celu zmniejszenia jego poziomu w osoczu i zapobiegnięcia tworzenia się żelaza niezwiązanego z transferryną (NTBI) i związanymi z nim uszkodzeniami narządów m.in. wątroby, serca [12, 20].

Badania nad znaczeniem erytroferonu w przebiegu β -talasemii przeprowadzone przez Kautza i wsp. [12] wykazały, że erytroferon może być patologicznym supresorem hepcydyny w przebiegu nieefektywnej erytropoezy. Jednak należy dodać, że przeprowadzone badania zasugerowały również, że ERFE nie jest jedynym regulatorem hepcydyny, za czym przemawiają wyniki badań, w których myszy wykazujące deficyt erytroferonu, posiadały prawidłowe parametry hematologiczne, a poziom żelaza był w normie [12, 20]. Według Kauza i wsp. [12] poziom Matrycowego RNA EFRE był znacznie podwyższony w szpiku kostnym i śledzionie u myszy z β -talasemią intermedia, a usunięcie transkryptu ERFE, w przypadku myszy z talasemią, przywróciło poziom hepcydyny do normy, natomiast zawartość żelaza w wątrobie oraz jego poziom we krwi uległy znacznemu obniżeniu w porównaniu do myszy z β -talasemią.

W najnowszych badaniach erytroferon zostaje przedstawiony jako nowy czynnik regulujący funkcjonowanie i mechanizm w przebiegu zarówno prawidłowej, jak i patologicznej erytropoezy. Natomiast potrzebne są dodatkowe, bardziej wnikliwe badania w celu sprecyzowania roli, jaką odgrywa, wraz z hepcydyną, w homeostazie żelaza w tkankach i narządach, przede wszystkim w sercu i mózgu, w których jego zaburzenie może prowadzić do uszkodzenia innych tkanek [12, 20].

4. Anemia chorób przewlekłych

Niedokrwistość chorób przewlekłych jest to częste powikłanie chorób zapalnych, w tym infekcji, nowotworów i przewlekłej niewydolności nerek. Anemia ta charakteryzuje się niedokrwistością normobarwliwą i normocytową ze skróconym przeżyciem erytrocytów i upośledzeniem erytropoezy, pomimo odpowiedniego poziomu erytropoetyny [1, 18].

W zaburzeniach zapalnych synteza hepcydyny jest stymulowana przez cytokiny prozapalne, najbardziej poprzez IL-6 za pośrednictwem przetwornika sygnału kinazy

Janus 2 i aktywatora szlaku transkrypcji 3 [22, 28]. Zwiększone stężenie hepcydyny powoduje niedostateczne dostarczanie żelaza w erytropoezie.

Erytroferon jest wytwarzany w erytroblastach w odpowiedzi na erytropoetynę wydzielaną w stanach niedokrwienia. Działanie to z kolei hamuje ekspresję hepcydyny, co powoduje zwiększone uwalnianie żelaza z komórkowych zapasów [13]. Poziom erytroferonu i hepcydyny jest ujemnie skorelowany [11]. Ekspresja erytroferonu w śledzionie i szpiku kostnym wzrasta w czasie anemii spowodowanej chorobą przewlekłą, co w konsekwencji powoduje mobilizację żelaza w organizmie oraz wyleczenie anemii [13].

Zbadano rolę erytroferonu w zdrowieniu myszy po wystąpieniu niedokrwistości chorób przewlekłych wywołanej przez wstrzyknięcie zabitych bakterii *Brucella abortus*. Stwierdzono, że ekspresja erytroferonu w szpiku kostnym i śledzionie znacznie wzrosła podczas niedokrwistości wywołanej wstrzyknięciem bakterii i osiągnęła najwyższy poziom w ciągu 14 dni po wstrzyknięciu, co było czasem zbliżonym do działania wzrostu stężenia erytropoetyny w surowicy [13]. Wskazuje to na fakt, że erytroferon przyczynia się do zdrowienia w anemii chorób przewlekłych, tłumiąc hepcydynę i zwiększając dostępność żelaza.

U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek dochodzi do rozwoju anemii z powodu niedostatecznej produkcji erytropoetyny [1]. Odpowiednie zapasy żelaza muszą być zachowane w celu zapewnienia skutecznego leczenia niedokrwistości nerkowej przy użyciu czynników stymulujących erytropoezę – ESA (ang. erythropoiesis stimulating agents) [30].

Badania potwierdziły, że ESA wpływa na metabolizm żelaza. Wykazano, że ESA zmniejszając stężenie hepcydyny u pacjentów hemodializowanych [11]. Na podstawie powyższych danych można uznać erytroferon za klucz w regulowaniu mobilizacji żelaza z magazynów podczas erytropoezy u pacjentów niewydolnością nerek leczonych ESA.

Literatura

1. Adamson J.W.: *The anemia of inflammation/malignancy: mechanisms and management*, Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) (2008); s:159–165.
2. Aisen, P., Enns, C. and Wessling-Resnick, M. (2001) *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33, 940–959
3. Armitage A., Eddowes L., Gileadi U., Cole S., Spottiswoode N., Ashtalakshmi Selvakumar T., Ho L., Townsend A., Drakesmith H.: *Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli*, Blood, Oct 13; 118(15) (2011); s:4129-39.
4. Artym J.: *Udział laktoferryiny w gospodarce żelazem w organizmie. Część I. Wpływ laktoferryiny na wchłanianie, transport i magazynowanie żelaza*. *The role of lactoferrin in the iron metabolism. Part I. Effect of lactoferrin on intake, transport and iron storage*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 62 (2008); s: 599-611.
5. Artym J.: *Udział laktoferryiny w gospodarce żelazem w organizmie. Część II. Działanie przeciwmikrobiologiczne i przeciwzapalne poprzez sekwestrację żelaza* Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 64 (2010); s: 604-616.
6. Attieh ZK, Alaeddine RM, Su T, Anderson GJ, Vulpe C. *Identification of a ferroxidase activity for hephaestin*. Journal of Clinical Gastroenterology , 34 (2002); s: 370.

7. Falzacappa V., Spasic V., Kessler R., Stolte J, Hentze, Muckenthaler : *STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation*. Blood. 109(1) (2007); s: 353- 358.
8. Ganz T., Nemeth E.: *Hepcidin and iron homeostasis*, Biochimica Biophysica Acta. Sep. 1823(9) (2012); s: 1434–1443.
9. Ganz T., Nemeth E.: *The Hepcidin-Ferroportin System as a Therapeutic Target in Anemias and Iron Overload Disorders*, Hematology American Society of Hematology Education Program, (2011); s: 538–542.
10. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 388 (1997); s: 482-8.
11. Honda H., Kobayashi Y., Onuma S., Shibagaki K., Yuza T., Hirao K., Yamamoto T., Tomosugi N., Shibata T. : *Associations among Erythroferrone and Biomarkers of Erythropoiesis and Iron Metabolism, and Treatment with Long-Term Erythropoiesis-Stimulating Agents in Patients on Hemodialysis*, PloS ONE, 11(3): (2016); s: e0151601.
12. Kautz L., Jung G., Du X., Gabayan V., Chapman J., Nasoff M, Nemeth E., Ganz T.: *Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of b-thalassemia*, Blood Oct 22 126(17) (2015); s: 2031–2037.
13. Kautz L., Jung G., Nemeth E., Ganz T.: *Erythroferrone contributes to recovery from anemia of inflammation*, Blood 124 (2014); s: 2569-2574.
14. Kautz L., Jung G., Nemeth E., Ganz T.: *The Erythroid Factor Erythroferrone and Its Role In Iron Homeostasis* , Blood, 122 (2013); s: 4.
15. Kautz L., Jung G., Valore E.V., Rivella S., Nemeth E., Ganz T.: *Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism*, Nature Genetics. 46(7) (2014); s: 678-684.
16. Kautz L., Jung G., Valore E.V., Rivella S., Nemeth E., Ganz T.: *Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism*, Nature Genetics. 46(7) (2014); s: 678-684.
17. Kuratowska Z., *Niedokrwistości niedoborowe i achrestyczne*. W: Hematologia kliniczna, red.: K. Janicki. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1991, s: 481-512.
18. Lankhorst C.E., Wish J.B.: *Anemia in renal disease: diagnosis and management*, Blood Reviews. 24 (2010); s: 39–47.
19. Lipiński P., Starzyński R.: *Regulacja ogólnoustrojowej homeostazy żelaza przez hepcydynę*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 58 (2004); s: 65–73.
20. Moura I., Hermine O.: *Erythroferrone: the missing link in b-thalassemi*, Blood, 126(17) (2015); s: 1974-1975.
21. Nemeth E., Ganz T.: *The Role of Hepcidin in Iron Metabolism*, Acta Haematologica, Nov 122(2-3) (2009); s: 78–86.
22. Nemeth E., Rivera S., Gabayan V., et al. : *IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. Journal of Clinical Investigation. 113(9) (2004); s: 1271-1276.
23. Nemeth E., Tuttle MS., Powelson J., Vaughn MB., Donovan A., Ward DM., Ganz T., Kaplan J.: *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*, Science. Dec 17; 306(5704) (2004); s: 2090-3.
24. Ramos E., Kautz L., Rodriguez R., Hansen M., Gabayan V., Ginzburg Y., Roth M., Nemeth E. Ganz T.: *Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice*, Hepatology 53 (2011); s: 1333-1341.
25. Sokołowska E., Klimek J.: *Hepcydyna-hormon uczestniczącyw regulacji metabolizmu żelaza w organizmie*, Postępy Biologii Komórki, 34 (2007); 1, s: 1530

26. Staroń R., Styś A., Starzyń R.: *Enterocyt – Wąskie gardło metabolizmu żelaza*, *Enterocyte – The bottleneck of iron metabolism*, *Postępy Biologii Komórki*, 42(2) (2015); s: 329–350.
27. Tejza B., Kurylak A., Pogorzała M., Krenska A.: *Talasemia — patogeneza, diagnostyka, leczenie*. *Przegląd Pediatryczny*, 36 (2006); s: 138–142.
28. Wrighting D.M., Andrews N.C.: *Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3*. *Blood*. 108(9) (2006); s:3204-3209.
29. Zhang A., Caroline A. Enns C.: *Molecular mechanisms of normal iron homeostasis*, *Hematology American Society of Hematology Education Program*, (2009) s: 207-14.
30. Zumbrennen-Bullough K., Babitt J.L.: *The iron cycle in chronic kidney disease (CKD): from genetics and experimental models to CKD patients*, *Nephrol Dial Transplant*. 29 (2014); s: 263–273

Hepcydyna i erytroferon – nowe białka przydatne w ocenie metabolizmu żelaza

Streszczenie

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym w wielu procesach zachodzących w ludzkim organizmie. W znacznej większości występuje we krwi, w postaci hemoglobiny. W mięśniach żelazo wchodzi w skład mioglobiny. Hepcydyna jest bezpośrednim inhibitorem ferroportyny, która ułatwia transport żelaza z komórek, w których jest ono magazynowane. Jej rola polega na regulacji uwalniania jonów żelazowych w zależności od zapotrzebowania organizmu. Nowym białkiem uczestniczącym w gospodarce żelaza jest erytroferon. Funkcją tego hormonu jest inhibicja syntezy hepcydyny, co powoduje zwiększenie dostępności żelaza do produkcji nowych krwinek czerwonych. Dzięki poznaniu związków biorących udział w metabolizmie żelaza możliwe jest kontrolowanie jego zawartości w organizmie, a tym samym przyczynianie się do zapobiegania schorzeń związanych z jego nadmiarem lub niedoborem. Celem pracy jest przedstawienie nowych markerów uczestniczących w przemianach tego pierwiastka oraz wskazanie ich znaczącej roli w stanach takich jak np. anemia chorób przewlekłych i β -talasemia.

Słowa klucze: metabolizm żelaza, hepcydyna, erytroferon, talasemia, anemia

Hepcidin and erythroferrone – new proteins useful in the evaluation of iron metabolism

Iron is undoubtedly an essential chemical element involved in numerous significant processes in human body. The vast majority of the iron is found in hemoglobin. Also it is present in myoglobin by forming complexes with molecular oxygen. Hepcidin decreases cellular iron export by inhibiting ferroportin. This protein regulates iron level depending on the body requirement. A new protein that takes part in the iron metabolism is erythroferrone. The function of this hormone is inhibiting hepcitin synthesis what leads to increase the iron availability and production of red blood cells. The main role of this element is the transport of oxygen. Iron takes part in amino acid metabolism and many processes of high-energy compounds, such as ATP. It is also the component of enzymes. Due to founding out compounds taking part in iron metabolism it is possible to control its content in organism and as a result contributing to prevention of diseases associated with iron deficiency and excess. The aim of the research work is to present new biomarkers involved in iron metabolism and showing their significant roles in diseases such as anemia of chronic disease and β -thalassemia.

Keywords: iron metabolism, hepcidin, erythroferrone, thalassemia, anemia

Kannabinoidy – skutki zdrowotne

1. Wstęp

Rośliny z rodzaju *Cannabis* znajdowały zastosowanie w medycynie ludowej od tysiącleci. W ostatnim czasie obserwujemy rosnące zainteresowanie produktami pochodzącymi z konopi ze względu na próby wprowadzenia ich do praktyki klinicznej, ale także ze względu na postępującą legalizację ich zastosowań rekreacyjnych. Same konopie, jak i preparaty oparte na ekstraktach z konopi znajdują zastosowanie przede wszystkim w leczeniu chronicznego bólu, jak i spastyczności. Kannabinoidy roślinne (fitokannabinoidy) są metabolitami wtórnymi produkowanymi przez rośliny z rodzaju *Cannabis*. Do tej pory opisano ponad 100 fitokannabinoidów, spośród których w najwyższych stężeniach w roślinie występują Δ^9 -tetrahydrokannabinol (THC) oraz kannabidiol (CBD). Z roślin *C. sativa* oraz *C. indica* otrzymuje się marihuanę (suszone liście oraz kwiatostany), haszysz (sprasowana żywica) oraz olej. Produkty te mogą być zażywane poprzez inhalację (palenie, waporyzacja) lub podanie doustne [1]. Efekty psychoaktywne wynikają przede wszystkim z właściwości THC, jednak mogą być do pewnego stopnia modulowane przez CBD – kannabinoid pozbawiony działania psychoaktywnego [2]. Efekty wywoływane zażywaniem produktów otrzymywanych z konopi zależą od przyjętej dawki, sposobu zażywania, wcześniejszych doświadczeń z danym typem używki, ale także od nastawienia i nastroju użytkownika oraz tła społecznego towarzyszącego zażywaniu [3]. Obejmują one uczucie odurzenia, slangowo nazywanego „hajem” (ang. *high*), które najczęściej przejawia się umiarkowaną euforią, odprężeniem, zaburzeniami percepcyjnymi (zniekształcenie odczuwania czasu, intensyfikacja odczuwania bodźców) oraz zwiększoną towarzyskością [3].

Aktywność THC w organizmie człowieka opiera się na oddziaływaniu z receptorami kannabinoidowymi (CB). Receptory te są częścią tzw. systemu endokannabinoidowego, w którego skład wchodzi także substancje będące endogennymi ligandami receptorów CB (endokannabinoidy) oraz enzymy zaangażowane w ich metabolizm. Zidentyfikowano dwa typy receptorów kannabinoidowych: CB1 oraz CB2. CB1 występuje przede wszystkim w korze mózgu, hipokampie, jądrach podstawowych,

¹ pawel717@gmail.com, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, www1.up.poznan.pl/kbib

² nwk.agnieszka@gmail.com, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, www1.up.poznan.pl/kbib

³ jzeyland@gmail.com, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, www1.up.poznan.pl/kbib

⁴ slomski@up.poznan.pl, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, www1.up.poznan.pl/kbib; Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, www.igcz.poznan.pl

mózdzku oraz w rdzeniu kręgowym. Z tego względu receptor ten pośredniczy głównie w efektach mających wpływ na zdolności poznawcze, pamięć oraz kontrolę ruchu [4]. Ekspresja receptorów CB2 jest najwyższa w komórkach układu odpornościowego, jednak odnotowano ich obecność również w systemie nerwowym [5]. Receptory CB należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (ang. *G Protein-Coupled Receptor*, GPCR). Ich aktywacja wywołuje inhibicję cykazy adenylanowej, co prowadzi do spadku stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP. Aktywacja receptorów CB powoduje także inhibicję kanałów sodowych oraz kanałów jonowych bramkowanych napięciem typu N oraz Q. Jednocześnie ma miejsce stymulacja kanałów potasowych dokomórkowych (ang. *inwardly rectifying potassium channels*). Zmiany te wywołują poczucie euforii. Zaobserwowano również, że THC wywołuje efekt antycholinergiczny, który prawdopodobnie odpowiada za zaburzenia poznawcze wywoływane przez marihuanę [4].

Popularny pogląd głosi, iż marihuana jest używką praktycznie nieszkodliwą, pozbawioną potencjału uzależniającego. W obliczu rosnącej popularności zastosowań medycznych kannabinoidów, a także legalizacji *Cannabis* sp., jako używki w wielu krajach, pojawia się potrzeba weryfikacji popularnych opinii oraz mitów dotyczących produktów uzyskiwanych z konopi. Realizacja tego zadania umożliwi podniesienie świadomości społecznej dotyczącej skutków zażywania marihuany, także w porównaniu ze skutkami stosowania innych substancji.

Celem pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego negatywnych skutków oddziaływania marihuany na organizm człowieka, przede wszystkim w przypadku zażywania regularnego.

2. Objawy kliniczne zażywania marihuany

Nasilenie efektów wywoływanych przez palenie marihuany zazwyczaj osiąga maksimum około 30 minut po zażyciu. Typowe objawy kliniczne wywoływane przez tę używkę to niepokój lub pobudzenie, halucynacje, uczucie depersonalizacji, myśli paranoidalne, spowolnienie i osłabienie zdolności do osądów oraz utrzymywania skupienia. Ponadto, występuje zaczerwienienie oczu, suchość w ustach, częstoskurcz serca, zwiększenie apetytu. Efekty zazwyczaj utrzymują się od 2 do 4 godzin po zażyciu, jednak zmiany związane ze zdolnościami poznawczymi mogą się utrzymywać nawet do 12 godzin. Objawy występujące przy zażywaniu doustnym są zazwyczaj mniej istotne ze względu na mniejszą biodostępność kannabinoidów podawanych tą drogą [4].

Ryzyko śmiertelnego przedawkowania marihuany jest wyjątkowo niskie. Śmiertelna dawka dla człowieka, oszacowana na podstawie badań na zwierzętach, wynosi 15-70 g [6, 7]. Jest to ilość znacznie większa, niż dzienne dawki przyjmowane nawet przez wieloletnich użytkowników marihuany. Nie odnotowano dotąd przypadku śmiertelnego przedawkowania omawianej używki [8]. Istnieją jednakże przypadki zgonów sercowo-naczyniowych mających miejsce po zażyciu marihuany [2].

3. Uzależnienie

Marihuana jest najpowszechniej zażywaną nielegalną substancją na świecie [9]. Szacuje się, że uzależnienie rozwija się u około 8.9% osób zażywających ten typ używki. Wartość ta jest znacznie niższa, niż w przypadku kokainy (20.9%), alkoholu (22.7%) lub papierosów (67.5%) [10].

Wykazano, że regularne stosowanie marihuany może prowadzić do rozwoju zespołu abstynencyjnego. Występuje on u około 50% osób zażywających używkę codziennie. Najpowszechniej występujące symptomy to niepokój, zaburzenia snu, zaburzenia apetytu oraz nudności [11, 12]. Objawy mogą być złagodzone poprzez podawanie THC [13].

4. Stosowanie innych używek

Uważa się, że w przypadku stałych użytkowników marihuany istnieje większe prawdopodobieństwo sięgnięcia po inne nielegalne używki, takie jak heroina czy kokaina, niż w przypadku osób niezażywających (ang. *cannabis gateway hypothesis*). Zgodnie z tą hipotezą, osoby zażywające wyjściowo marihuanę przechodzą sekwencyjnie do coraz „cięższych” narkotyków, tj. do kokainy, a następnie do heroiny [14]. Efekt ten może wynikać z samego faktu kontaktu z czarnym rynkiem, co zwiększa dostęp do różnego rodzaju nielegalnych używek lub z przyczyn niezwiązanych bezpośrednio z wcześniejszym zażywaniem marihuany, takich jak uwarunkowania psychiczne, sprawiające, że pewne osoby są bardziej skłonne do zażywania narkotyków [15]. Wyniki dotychczasowych badań wspierają hipotezę, że zażywanie marihuany zwiększa prawdopodobieństwo sięgnięcia po kolejne używki, jednak określenie zależności przyczynowo-skutkowej oraz mechanizmu, na którym opiera się to zjawisko, pozostaje wyzwaniem [16, 17]. Wnioski płynące z badań nad opisanym zjawiskiem pozostają istotne po uwzględnieniu czynników środowiskowych mogących mieć wpływ na wyniki.

5. Rozwój prenatalny oraz efekty postnatalne

Wiele badań epidemiologicznych wykazało, że zażywanie w okresie ciąży używek zawierających kannabinoidy powoduje zmniejszenie wagi urodzeniowej dziecka [18, 19]. Wynik ten pozostaje istotny po statystycznym oszacowaniu wpływu innych używek na otrzymany rezultat. Z drugiej jednak strony, rezultaty mogą być niedoszacowane z powodu wielu ograniczeń tego typu badań.

Istnieją doniesienia wskazujące na asocjację pomiędzy zażywaniem marihuany przez matkę w okresie ciąży, a problemami wychowawczymi z dzieckiem w wieku około 10 lat [20]. Ponadto, prenatalna ekspozycja na kannabinoidy jest powiązana z niższymi wynikami w testach czytania i pisania oraz gorszymi osiągnięciami edukacyjnymi [21]. Wykazano, że wymienione efekty wynikają z obniżonych zdolności poznawczych, zaburzeń nastroju oraz skupiania uwagi, a także z powodu tendencji do wczesnego rozpoczęcia zażywania marihuany (poniżej 14 roku życia) [22].

6. Okres dorastania

System endokannabinoidowy odgrywa istotną rolę w procesach rozwoju i dojrzewania układu nerwowego. Przypuszcza się, że egzogenne kannabinoidy, modulując funkcjonowanie układu endokannabinoidowego, mogą zakłócać przebieg tych procesów w okresie dorastania. Z tego względu, układ nerwowy może być szczególnie podatny na niekorzystne skutki zażywania marihuany w wieku młodzieńczym, a więc wtedy, gdy stosowanie używki zazwyczaj się rozpoczyna [23]. Badania na gryzoniach wykazały, że THC wykazuje znacznie większy negatywny wpływ na pamięć roboczą oraz rozpoznawanie obiektów w przypadku osobników młodocianych, niż osobników dorosłych [23]. Długookresowe podawanie agonistów receptora CB1 młodocianym szczurom powodowało trwałe osłabienie zdolności rozpoznawania obiektów. Zmian tych nie zanotowano w grupie szczurów dorosłych [24, 25]. Zaobserwowane efekty wynikają najprawdopodobniej z faktu, iż THC wywołuje zaburzenia w procesach sygnalizacyjnych, w których system endokannabinoidowy odgrywa kluczową rolę, takich jak proliferacja oraz migracja komórek nerwowych, morfogeneza oraz synaptogeneza [26, 27].

Badania radiologiczne, wykorzystujące m.in. obrazowanie funkcjonalne wykazały istnienie deficytu w sprawności neuropsychologicznej w przypadku młodocianych osób regularnie zażywających marihuanę. Zauważono również zmiany w aktywności poszczególnych obszarów mózgu [28, 29].

7. Zaburzenia poznawcze

Wiele badań wykazało zaburzenia w procesach uczenia się, pamięci oraz skupiania uwagi u osób regularnie zażywających marihuanę. Efekty te były zazwyczaj powiązane z wiekiem inicjacji zażywania, częstotliwością oraz przyjmowaną dawką THC [30, 31]. W przypadku osób, które rozpoczęły zażywanie w późniejszym wieku efekt ten nie był obserwowany. Wynik nie uległ zmianie po analizie wpływu innych czynników, takich jak alkohol czy inne używki lub objawy chorób psychicznych. Z drugiej jednak strony, zależność przyczynowo-skutkowa obserwowanych zjawisk pozostaje niejasna. Istnieją doniesienia, według których rozpoczęcie regularnego zażywania marihuany w młodym wieku może prowadzić do obniżenia IQ w porównaniu do osób niezażywających, jak również badania, które takiego efektu nie wykazały [31-33].

8. Struktura i funkcjonowanie mózgu

Istnieje wiele badań wskazujących na zmiany w mózgu osób regularnie zażywających marihuanę. Za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) wykazano, że w mózgu długotrwałych użytkowników ma miejsce obniżenie ekspresji receptorów kannabinoidowych [34]. Obrazowanie z zastosowaniem rezonansu magnetycznego wykazało zmiany w takich strukturach mózgu, jak hipokamp, kora przedczołowa czy mózdzek [35]. Obrazowanie funkcjonalne mózgu wykazało, że w przypadku osób regularnie zażywających marihuanę ma miejsce obniżenie aktywności regionów mózgu odpowiedzialnych za pamięć oraz skupianie uwagi [36].

9. Wyniki w edukacji

Uważa się, że zażywanie marihuany jest skorelowane z niższymi wynikami edukacyjnymi wśród młodzieży, jednak relacja przyczynowo-skutkowa tych zjawisk jest niejasna. Dotychczasowe badania nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, czy zażywanie marihuany jest czynnikiem powodującym obniżenie wyników w nauce ze względu na wywoływanie deficytów poznawczych i motywacyjnych, czy stosowanie używki jest bardziej prawdopodobne wśród młodzieży o niższych wynikach edukacyjnych, czy też oba te zjawiska są wywoływane wspólnymi czynnikami [37].

Istnieją badania wykazujące, że im niższy jest wiek rozpoczęcia zażywania marihuany, tym niższa jest szansa na ukończenie szkoły [38]. Wynik pozostaje istotny po uwzględnieniu innych czynników, takich jak aspekty socjoekonomiczne.

Z drugiej jednak strony, w badania na bliźniętach nie znaleziono różnic w ryzyku przedwczesnego zakończenia edukacji pomiędzy bliźniętami, które wcześniej rozpoczęły zażywanie marihuany i bliźniętami nie stosującymi używki [37].

10. Wpływ na zdolności kierowania pojazdami mechanicznymi

Podanie THC powoduje obniżenie czasu reakcji, wydajności przetwarzania informacji, koordynacji percepcyjno-motorycznej, a także zdolności skupiania uwagi [39]. Powyższe zjawiska powodują, że zażywanie marihuany może potencjalnie być przyczyną wypadków samochodowych. Badania epidemiologiczne oraz laboratoryjne wykazały, że kierowanie pojazdem pod wpływem marihuany może zwiększyć ryzyko wypadku 2-3 razy (dla porównania: alkohol zwiększa ryzyko 6-15 razy) [2].

11. Zażywanie marihuany a zdrowie psychiczne

Wykazano korelację pomiędzy zażywaniem marihuany a zaburzeniami lękowymi [40]. Zaobserwowano, że zaburzenia lękowe występują ze zwiększoną częstością wśród osób zażywających regularnie marihuanę, jednocześnie wykazano, że pacjenci z zaburzeniami tego typu częściej sięgają po omawianą używkę. Zależność przyczynowo-skutkowa pozostaje również w tym przypadku niejasna [41]. Zażywanie marihuany zostało powiązane także ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zaburzeń depresyjnych [42]. Używka ta może również prowadzić do wzrostu intensywności oraz wydłużenia czasu trwania symptomów maniакаlnych u pacjentów z zaburzeniami dwubiegunowymi [43].

Badania wykazały dwukrotne zwiększenie ryzyka wystąpienia psychozy oraz wcześniejsze występowanie pierwszych epizodów psychotycznych w przypadku osób zażywających regularnie marihuanę [44, 45]. Prawdopodobny mechanizm odpowiadający za obserwowane efekty polega na tym, że kannabinoidy przyjmowane regularnie powodują wystąpienie psychozy u osób podatnych na tego typu zaburzenia, u których w innym wypadku choroba by nie wystąpiła. Zjawiska te mogą mieć podłoże genetyczne. Podejrzewa się, że istnieje powiązanie pomiędzy polimorfizmem genu *AKT1*, kodującego serynowo-treoninową kinazę białkową 1, będącą częścią szlaku sygnalizacyjnego receptorów dopaminowych, a wywoływaniem psychozy przez zażywanie marihuany [46]. Wykazano, że kannabidiol może redukować wywoływane przez THC objawy związane z psychozą [47].

12. Marihuana a nowotwory

Jednym z głównych obaw związanych z medycznym oraz rekreacyjnym zastosowaniem kannabinoidów, szczególnie w drodze inhalacji, jest ich potencjał kancerogeny. Wykazano, że czysty THC nie jest kancerogeny dla gryzoni, kannabinoidy ponadto nie wykazują właściwości mutagennych [48, 49]. Z drugiej strony, w dymie marihuany, oprócz kannabinoidów odpowiedzialnych za jej psychoaktywność, stwierdzono obecność także substancji toksycznych, takich jak amoniak, tlenek węgla czy cyjanowodor oraz substancji i pierwiastków kancerogennych: np. benzen, 4-aminobifenyl, formaldehyd, kadm, ołów [50].

Do tej pory przeprowadzono niewiele badań mających na celu oszacowanie potencjału kancerogennego marihuany. Istotnym problemem w tego typu analizach jest brak możliwości oszacowania wpływu dodatkowych czynników, takich jak palenie papierosów na badany aspekt. Sprawia to, że trudno jest określić w jakim stopniu do rozwoju nowotworu u badanych pacjentów przyczyniło się palenie marihuany *per se*, a w jakim stopniu był to efekt działania innych czynników. Uzyskane dotąd dane nie są jednoznaczne. Istnieją badania wykazujące statystycznie istotny związek pomiędzy paleniem marihuany a występowaniem nowotworów głowy i szyi (iloraz szans = 2.6; 95% przedział ufności, 1.1-6.6 [51], jednakże wiele innych badań nie dowiodło takiego powiązania [52, 53]. Podobnie, w odniesieniu do nowotworów płuc, istnieją badania wykazujące brak powiązania pomiędzy paleniem marihuany a rozwojem choroby [54, 55], a także badania ukazujące zwiększenie ryzyka pojawienia się nowotworu [56-58]. W przypadku osób palących marihuanę, sugeruje się zwiększone ryzyko występowania nowotworów jąder, nowotworów urotelialnych oraz glejaków [59-61]. Powodem rozbieżności w rezultatach badań epidemiologicznych szacujących wpływ zażywania marihuany na rozwój nowotworów mogą być trudności w oszacowaniu ilości używki przyjmowanej przez badanych, określeniu efektu wywieranego przez czynniki zakłócające, takie jak alkohol i papierosy, oraz znaczne różnice w ekspresji receptorów CB pomiędzy różnymi tkankami.

13. Podsumowanie

Powyższy przegląd literatury wskazuje na to, że przedstawianie marihuany, jako używki zupełnie nieszkodliwej i niezależniającej nie ma oparcia w zgromadzonych dotychczas danych naukowych. Posiada ona pewien potencjał uzależniający (choć znacznie niższy, niż alkohol czy nikotyna) oraz jej długotrwałe stosowanie może istotnie wpływać na strukturę pewnych rejonów mózgu. Dotychczasowe doświadczenia sugerują, iż przyjmowanie kannabinoidów ma szczególnie negatywny wpływ na rozwijający się układ nerwowy, a więc wydaje się, że marihuana powinna być unikana przez kobiety w ciąży, dzieci oraz osoby w wieku dorastania.

Z drugiej jednak strony, powinniśmy pamiętać, że nawet pomimo negatywnych skutków zażywania, istotnych w pewnych szczególnych przypadkach, marihuana nadal pozostaje używką o relatywnie niskiej szkodliwości. Nutt i wsp. (2007) oszacował, że pod względem ogólnej szkodliwości marihuana klasyfikuje się na 11 miejscu, za heroiną (1 miejsce), alkoholem (5 miejsce), czy tytoniem (9 miejsce) [62]. Ukazuje to

paradoks tradycyjnego postrzegania używek, według którego alkohol lub papierosy, a więc środki o bardzo wysokiej i niewątpliwej szkodliwości, są w pełni legalne i społecznie akceptowalne, podczas gdy znacznie mniej szkodliwa marihuana jest klasyfikowana jako nielegalny i nieakceptowalny narkotyk. W racjonalnej debacie dotyczącej legalizacji używek powinniśmy kłaść większy nacisk na obiektywne oszacowanie szkodliwości danych substancji, niż na arbitralne klasyfikacje i społeczne uprzedzenia.

Odrębną kwestią pozostaje niedoskonałość dotychczas przeprowadzonych badań. W analizie szkodliwości używek, szczególnie w badaniach prowadzonych na regularnych użytkownikach, trudno jest oddzielić efekty badanej substancji od efektów wywoływanych przez czynniki zakłócające, takie jak inne używki oraz wpływ środowiska socjoekonomicznego. Przede wszystkim w drugim przypadku trudno jest ustalić relację przyczynowo-skutkową, pomiędzy skorelowanymi czynnikami, jak np. zażywaniem marihuany i gorszymi wynikami edukacyjnymi. Aby w pełni oszacować wpływ marihuany na jakość życia, bez wątplenia potrzebujemy więcej badań.

Literatura

1. Kramer JL. *Medical marijuana for cancer*. CA Cancer J Clin; 65 (2015) s.109–122. doi:10.3322/caac.21260.
2. Hall W. *What has research over the past two decades revealed about the adverse health effects of recreational cannabis use?* Addiction; 110 (2015) s. 19–35. doi:10.1111/add.12703.
3. Hall W, Degenhardt L. *Adverse health effects of non-medical cannabis use*. The Lancet 374 (2009) s. 1383–1391. doi:10.1016/S0140-6736(09)61037-0.
4. Zhang MW, Ho RCM. *The Cannabis Dilemma: A Review of Its Associated Risks and Clinical Efficacy*. J Addict; 2015 (2015) s. 707596. doi:10.1155/2015/707596.
5. Atwood BK, Mackie K. *CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis*. Br J Pharmacol; 160 (2010) s. 467–79. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x.
6. *"The Science of Marijuana"*, 2nd edn. Br J Clin Pharmacol; 67 (2009) s. 268. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03355.x.
7. Gable RS. *Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances*. Addict Abingdon Engl; 99 (2004) s. 686–696. doi:10.1111/j.1360-0443.2004.00744.x.
8. Calabria B, Degenhardt L, Hall W, Lynskey M. *Does cannabis use increase the risk of death? Systematic review of epidemiological evidence on adverse effects of cannabis use*. Drug Alcohol Rev; 29 (2010) s. 318–330. doi:10.1111/j.1465-3362.2009.00149.x.
9. Marshall K, Gowing L, Ali R, Le Foll B. *Pharmacotherapies for cannabis dependence*. Cochrane Database Syst. Rev., John Wiley & Sons, Ltd; (2014). doi:10.1002/14651858.CD008940.pub2.
10. Lopez-Quintero C, Pérez de los Cobos J, Hasin DS, Okuda M, Wang S, Grant BF, *Probability and predictors of transition from first use to dependence on nicotine, alcohol, cannabis, and cocaine: results of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC)*. Drug Alcohol Depend; 115 (2011) s. 120–30. doi:10.1016/j.drugalcdep.2010.11.004.
11. Lichtman AH, Martin BR. *Cannabinoid Tolerance and Dependence*. Cannabinoids, vol. 168, Springer Berlin Heidelberg; (2005) s. 691–717.

12. Allsop DJ, Norberg MM, Copeland J, Fu S, Budney AJ. *The Cannabis Withdrawal Scale development: patterns and predictors of cannabis withdrawal and distress*. Drug Alcohol Depend; 119 (2011) s. 123–129. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.06.003.
13. Budney AJ, Vandrey RG, Hughes JR, Moore BA, Bahrenburg B. *Oral delta-9-tetrahydrocannabinol suppresses cannabis withdrawal symptoms*. Drug Alcohol Depend; 86 (2007) s. 22–29. doi:10.1016/j.drugalcdep.2006.04.014.
14. Kandel DB. *Stages and Pathways of Drug Involvement: Examining the Gateway Hypothesis*. Cambridge University Press; (2002).
15. Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ. *The developmental antecedents of illicit drug use: evidence from a 25-year longitudinal study*. Drug Alcohol Depend; (2008) 96 s. 165–177. doi:10.1016/j.drugalcdep.2008.03.003.
16. Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ. *Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis*. Addict Abingdon Engl; 101 (2006) s. 556–569. doi:10.1111/j.1360-0443.2005.01322.x.
17. Lynskey MT, Heath AC, Bucholz KK, Slutske WS, Madden PAF, Nelson EC. *Escalation of drug use in early-onset cannabis users vs co-twin controls*. JAMA; 289 (2003) s. 427–433.
18. Hayatbakhsh MR, Flenady VJ, Gibbons KS, Kingsbury AM, Hurrion E, Mamun AA. *Birth outcomes associated with cannabis use before and during pregnancy*. Pediatr Res; 71 (2012) s. 215–219. doi:10.1038/pr.2011.25.
19. El Marroun H, Tiemeier H, Steegers EAP, Jaddoe VWV, Hofman A, Verhulst FC. *Intrauterine cannabis exposure affects fetal growth trajectories: the Generation R Study*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry; 48 (2009) s. 1173–1181. doi:10.1097/CHI.0b013e3181bfa8ee.
20. Goldschmidt L, Day NL, Richardson GA. *Effects of prenatal marijuana exposure on child behavior problems at age 10*. Neurotoxicol Teratol; 22 (2000) s. 325–336.
21. Goldschmidt L, Richardson GA, Cornelius MD, Day NL. *Prenatal marijuana and alcohol exposure and academic achievement at age 10*. Neurotoxicol Teratol; 26 (2004) s. 521–532. doi:10.1016/j.ntt.2004.04.003.
22. Goldschmidt L, Richardson GA, Willford JA, Severtson SG, Day NL. *School achievement in 14-year-old youths prenatally exposed to marijuana*. Neurotoxicol Teratol; 34 (2012) s. 161–167. doi:10.1016/j.ntt.2011.08.009.
23. Lubman DI, Cheetham A, Yücel M. *Cannabis and adolescent brain development*. Pharmacol Ther; 148 (2015) s. 1–16. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.009.
24. Schneider M, Koch M. *The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion*. Eur Neuropsychopharmacol; 17 (2007) s. 180–186. doi:10.1016/j.euroneuro.2006.03.009.
25. Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N. *Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure*. Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol; 33 (2008) s. 1113–1126. doi:10.1038/sj.npp.1301475.
26. Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM. *Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor*. Proc Natl Acad Sci USA; 102 (2005) s. 19115–19120. doi:10.1073/pnas.0509494102.
27. Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabás K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L. *Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon*

- patterning*. Proc Natl Acad Sci USA; 105 (2008) s. 8760–8765. doi:10.1073/pnas.0803545105.
28. Schweinsburg AD, Brown SA, Tapert SF. *The influence of marijuana use on neurocognitive functioning in adolescents*. Curr Drug Abuse Rev; 1 (2008) 99–111.
 29. Schweinsburg AD, Nagel BJ, Schweinsburg BC, Park A, Theilmann RJ, Tapert SF. *Abstinent adolescent marijuana users show altered fMRI response during spatial working memory*. Psychiatry Res; 163 (2008) s. 40–51. doi:10.1016/j.psychres.2007.04.018.
 30. Crane NA, Schuster RM, Fusar-Poli P, Gonzalez R. *Effects of cannabis on neurocognitive functioning: recent advances, neurodevelopmental influences, and sex differences*. Neuropsychol Rev; 23 (2013) s. 117–137. doi:10.1007/s11065-012-9222-1.
 31. Meier MH, Caspi A, Ambler A, Harrington H, Houts R, Keefe RSE, *Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife*. Proc Natl Acad Sci USA; 109 (2012) s. E2657-2664. doi:10.1073/pnas.1206820109.
 32. Mokrysz C, Landy R, Gage SH, Munafò MR, Roiser JP, Curran HV. *Are IQ and educational outcomes in teenagers related to their cannabis use? A prospective cohort study*. J Psychopharmacol Oxf Engl; 30 (2016) s. 159–168. doi:10.1177/0269881115622241.
 33. Jackson NJ, Isen JD, Khoddam R, Irons D, Tuvblad C, Iacono WG, *Impact of adolescent marijuana use on intelligence: Results from two longitudinal twin studies*. Proc Natl Acad Sci; 113 (2016) s. 500–508. doi:10.1073/pnas.1516648113.
 34. Hirvonen J, Goodwin R, Li C-T, Terry G, Zoghbi S, Morse C, *Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers*. Mol Psychiatry; 17 (2012) s. 642–649. doi:10.1038/mp.2011.82.
 35. Yücel M, Solowij N, Respondek C, Whittle S, Fornito A, Pantelis C, *Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use*. Arch Gen Psychiatry; 65 (2008) s. 694–701. doi:10.1001/archpsyc.65.6.694.
 36. Block RI, O’Leary DS, Hichwa RD, Augustinack JC, Boles Ponto LL, Ghoneim MM, *Effects of frequent marijuana use on memory-related regional cerebral blood flow*. Pharmacol Biochem Behav; 72 (2002) s. 237–250.
 37. Verweij KJH, Huizink AC, Agrawal A, Martin NG, Lynskey MT. *Is the relationship between early-onset cannabis use and educational attainment causal or due to common liability?* Drug Alcohol Depend 2013;133:580–6. doi:10.1016/j.drugalcdep.07 (2013) s. 34.
 38. Horwood LJ, Fergusson DM, Hayatbakhsh MR, Najman JM, Coffey C, Patton GC, *Cannabis use and educational achievement: findings from three Australasian cohort studies*. Drug Alcohol Depend 2010;110:247–53. doi:10.1016/j.drugalcdep.03 (2010) s. 8.
 39. Theunissen EL, Kauert GF, Toennes SW, Moeller MR, Sambeth A, Blanchard MM, *Neurophysiological functioning of occasional and heavy cannabis users during THC intoxication*. Psychopharmacology (Berl); 220 (2012) s. 341–350. doi:10.1007/s00213-011-2479-x.
 40. Kedzior KK, Laeber LT. *A positive association between anxiety disorders and cannabis use or cannabis use disorders in the general population - a meta-analysis of 31 studies*. BMC Psychiatry; 14 (2014) s. 136. doi:10.1186/1471-244X-14-136.
 41. Crippa JA, Zuardi AW, Martín-Santos R, Bhattacharyya S, Atakan Z, McGuire P, *Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence*. Hum Psychopharmacol; 24 (2009) s. 515–523. doi:10.1002/hup.1048.
 42. Lev-Ran S, Roerecke M, Le Foll B, George TP, McKenzie K, Rehm J. *The association between cannabis use and depression: a systematic review and meta-analysis of*

- longitudinal studies*. Psychol Med; 44 (2014) s. 797–810. doi:10.1017/S0033291713001438.
43. Gibbs M, Winsper C, Marwaha S, Gilbert E, Broome M, Singh SP. *Cannabis use and mania symptoms: a systematic review and meta-analysis*. J Affect Disord; 171 (2015) s. 39–47. doi:10.1016/j.jad.2014.09.016.
 44. Large M, Sharma S, Compton MT, Slade T, Nielsen O. *Cannabis use and earlier onset of psychosis: a systematic meta-analysis*. Arch Gen Psychiatry; 68 (2011) s. 555–561. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.5.
 45. Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M. *Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review*. The Lancet; 370 (2007) s. 319–328. doi:10.1016/S0140-6736(07)61162-3.
 46. Morgan CJA, Freeman TP, Powell J, Curran HV. *AKT1 genotype moderates the acute psychotomimetic effects of naturalistically smoked cannabis in young cannabis smokers*. Transl Psychiatry; 6 (2016) s. e738. doi:10.1038/tp.2015.219.
 47. Morgan CJA, Curran HV. *Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis*. Br J Psychiatry J Ment Sci; 192 (2008) s. 306–307. doi:10.1192/bjp.bp.107.046649.
 48. Chan PC, Sills RC, Braun AG, Haseman JK, Bucher JR. *Toxicity and carcinogenicity of delta 9-tetrahydrocannabinol in Fischer rats and B6C3F1 mice*. Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol; 30 (1996) s. 109–117.
 49. Hall W, MacPhee D. *Cannabis use and cancer*. Addict Abingdon Engl; 97 (2002) s. 243–247.
 50. Moir D, Rickert WS, Levasseur G, Larose Y, Maertens R, White P. *A comparison of mainstream and sidestream marijuana and tobacco cigarette smoke produced under two machine smoking conditions*. Chem Res Toxicol; 21 (2008) s. 494–502. doi:10.1021/tx700275p.
 51. Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, Tashkin DP, Yu GP, Marshall JR. *Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol; 8 (1999) s. 1071–1078.
 52. Liang C, McClean MD, Marsit C, Christensen B, Peters E, Nelson HH. *A population-based case-control study of marijuana use and head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Prev Res Phila Pa; 2 (2009) s. 759–768. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0048.
 53. Berthiller J, Lee Y-CA, Boffetta P, Wei Q, Sturgis EM, Greenland S. *Marijuana smoking and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium*. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol; 18 (2009) s. 1544–1551. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0845.
 54. Hashibe M, Morgenstern H, Cui Y, Tashkin DP, Zhang Z-F, Cozen W. *Marijuana use and the risk of lung and upper aerodigestive tract cancers: results of a population-based case-control study*. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol; 15 (2006) s. 1829–1834. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0330.
 55. Mehra R, Moore BA, Crothers K, Tetrault J, Fiellin DA. *The association between marijuana smoking and lung cancer: a systematic review*. Arch Intern Med; 166 (2006) s. 1359–1367. doi:10.1001/archinte.166.13.1359.
 56. Berthiller J, Straif K, Boniol M, Voirin N, Benhaïm-Luzon V, Ayoub WB. *Cannabis smoking and risk of lung cancer in men: a pooled analysis of three studies in Maghreb*. J

- Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer; 3 (2008) s. 1398–1403.
doi:10.1097/JTO.0b013e31818ddcde.
57. Callaghan RC, Allebeck P, Sidorchuk A. *Marijuana use and risk of lung cancer: a 40-year cohort study*. *Cancer Causes Control CCC*; (2013) 24 s. 1811–1820.
doi:10.1007/s10552-013-0259-0.
58. Aldington S, Harwood M, Cox B, Weatherall M, Beckert L, Hansell A, *Cannabis use and risk of lung cancer: a case-control study*. *Eur Respir J*; 31 (2008) s. 280–286.
doi:10.1183/09031936.00065707.
59. Chacko JA, Heiner JG, Siu W, Macy M, Terris MK. *Association between marijuana use and transitional cell carcinoma*. *Urology*; 67 (2006) s. 100–104.
doi:10.1016/j.urology.2005.07.005.
60. Lacson JCA, Carroll JD, Tuazon E, Castelao EJ, Bernstein L, Cortessis VK. *Population-Based Case-Control Study of Recreational Drug Use and Testis Cancer Risk Confirms Association between Marijuana Use and Non-Seminoma Risk*. *Cancer*; 118 (2012) s. 5374–5383. doi:10.1002/cncr.27554.
61. Efird JT, Friedman GD, Sidney S, Klatsky A, Habel LA, Udaltsova NV, *The risk for malignant primary adult-onset glioma in a large, multiethnic, managed-care cohort: cigarette smoking and other lifestyle behaviors*. *J Neurooncol*; 68 (2004) s. 57–69.
62. Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C. *Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse*. *The Lancet*; 369 (2007) s. 1047–1053.
doi:10.1016/S0140-6736(07)60464-4.

Kannabinoidy – negatywne skutki zdrowotne

Streszczenie

Produkty otrzymane z konopi (*Cannabis* sp.) wzbudzają coraz większe zainteresowanie, zarówno ze względu na zastosowania w medycynie, jak i na legalizację jako używki. Za psychoaktywne właściwości marihuany odpowiada Δ^9 -tetrahydrokannabinol (THC) – związek z grupy fitokannabinoidów – metabolitów wtórnych specyficznych dla roślin z rodzaju *Cannabis*. Niniejsza praca stanowi przegląd literatury dotyczącej wpływu kannabinoidów na organizm człowieka. Do najistotniejszych efektów regularnego zażywania marihuany należą zaburzenia poznawcze, zmiany w strukturze mózgu oraz zwiększenie ryzyka rozwoju zaburzeń psychicznych. Kannabinoidy wykazują szczególne niekorzystny wpływ na rozwijający się układ nerwowy. Zależności przyczynowo-skutkowe w części obserwowanych efektów pozostają jednak niejasne. Jednakże z drugiej strony, szkodliwość marihuany pozostaje relatywnie niewielka w porównaniu z innymi używkami, np. alkoholem.

Słowa kluczowe: kannabinoidy, marihuana, tetrahydrokannabinol, THC, psychoaktywność, szkodliwość

Cannabinoids – adverse health effects

Abstract

The products obtained from the *Cannabis* sp. plants are gaining more and more attention, because either their medical applications or their legalization as a recreational drug. The marijuana exhibits psychoactive effects due to containing Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) – compound classified as a phytocannabinoid – a secondary metabolite specific for the *Cannabis* genus. Our text is a review of known effects of cannabinoids for a human health. The most important effects include cognitive impairments, changes in a brain structure and the increase in a risk of mental disorders development. Cannabinoids exhibit especially detrimental effect on a developing nervous system. However, causal relationships of some observed effects remain unclear. Moreover, on the other hand the harmfulness of the marijuana are still relatively small in comparison with other drugs, eg. alcohol.

Keywords: cannabinoids, marijuana, tetrahydrocannabinol, THC, psychoactivity, harmfulness

Witamina C – struktura, występowanie i rola w organizmie człowieka

1. Wstęp

Witamina C jest jedną z najbardziej popularnych i znanych witamin, wykazujących wielotorowe działanie na ludzki organizm [1]. Ok. 1750 r. chirurg James Lind stwierdził, że można zapobiec rozwojowi szkorbutu (*scorbutus*, inaczej gnilca, stąd nazwa kwas askorbinowy) podczas wypraw morskich podając marynarzom codziennie świeże owoce cytrusowe. Po raz pierwszy została ona wyizolowana z papryki w 1928 r. przez Alberta Szenta-Görgyiego – biochemika z Węgier, który otrzymał za to odkrycie Nagrodę Nobla [2-4]. Większość kwasu askorbinowego produkowanego na skalę przemysłową jest wytwarzana metodą opracowaną w 1934 r. przez Reichsteina i Grüssnera, w której jako substrat wykorzystywana jest naturalna D-glukoza [5]. Obecnie terminem witamina C określa się kwas L-askorbinowy oraz kwas L-dehydroaskorbinowy, które wykazują identyczne działanie biologiczne. Kwas askorbinowy $C_6H_8O_6$ jest ketolaktonem charakteryzującym się silnymi właściwościami redukującymi, który przy słabym utlenieniu w ustroju zmienia się w kwas L-dehydroaskorbinowy poprzez rodnikowy związek pośredni – kwas L-monodehydroaskorbinowy. Te trzy związki wchodzą w skład odwracalnego układu oksydo-redukcyjnego organizmu [6].

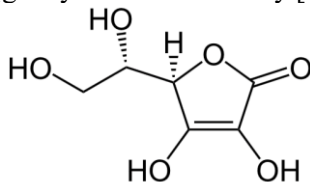
2. Biosynteza i wzór strukturalny witaminy C

Kwas askorbinowy jest sześciowęglowym laktonem, który w organizmach zwierzęcych powstaje z D-glukozy, natomiast w roślinnych z D-glukozy lub D-galaktozy [1]. Jednak w obu królestwach biosynteza tego związku przebiega w inny sposób. U roślin glukoza w pozycji C-2 ulega utlenieniu, po czym przebiega epimeryzacja atomu C-5 i następne utlenianie, w pozycji C-1 [7]. U zwierząt zaś synteza przebiega przez kwas glukuronowy, po czym następuje inwersja szkieletu węglowego, wskutek czego atomy C-1 i C-6 glukozy stają się odpowiednio atomami C-6 i C-1 kwasu askorbinowego [8]. Syntetyzuje go większość gatunków zwierząt (wyjątek stanowią niektóre ptaki, świnki morskie, małpy naczelne, nietoperze owocożerne, pstrągi tęczowe, łososie i karpie) za pośrednictwem enzymu oksydazy L-gulono- γ -laktonowej (GLO), obecnej w wątrobie. Rośliny mają zdolność do biosyntezy tego związku dzięki występowaniu enzymu katalizującego – dehydrogenazy galaktono-laktonowej [1]. Ludzie muszą dostarczać witaminę C w diecie (egzogenny składnik pokarmowy) ze względu na brak szlaków metabolicznych niezbędnych do jej syntezy [7, 9-10].

Strukturalnie witamina C jest jedną z najprostszych witamin. Kwas L -askorbinowy posiadający wzór sumaryczny $C_6H_8O_6$ jest γ -laktonem kwasu 2,3-dehydro-L-

¹ barbaragieroba@poczta.onet.pl, Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

gulonowego (Rys. 1). Pięciowęglowy pierścień γ -laktonowy, znajdujący się w centrum cząsteczki, odpowiada za stabilizację struktury związku. Jego rozerwanie skutkuje oksydacyjnym rozpadem kwasu L-askorbinowego na dwa związki: czterowęglowy kwas L-treonowy oraz dwuwęglowy kwas szczawiowy [1, 8].



Rysunek 1. Wzór strukturalny kwasu L-askorbinowego [11]

Uznaje się, że kwasowy charakter oraz właściwości redukujące kwasu askorbinowego wynikają z obecności dwóch atomów wodoru wykazujących zdolność do dysocjacji w ugrupowaniu endiolowym pomiędzy C-2 i C-3. Dysocjacja przebiega dwuetapowo:



Stałe trwałości są równe odpowiednio:

$$K_1 = 6,77 \cdot 10^{-5}, pK_1 = 4,17 \quad (3)$$

$$K_2 = 2,69 \cdot 10^{-12}, pK_2 = 11,57 \quad (4)$$

Kwas L-askorbinowy może przekształcać się w organizmie w swoją utlenioną formę – kwas L-dehydroaskorbinowy [12]. Istnieje też stereoisomer witaminy C o konfiguracji D – kwas erytrobowy. Obecnie uważa się, że trzy biologicznie czynne formy witaminy C:

- Forma zredukowana: kwas L-askorbinowy,
- Forma utleniona: kwas L-dehydroaskorbinowy i kwas semidehydroaskorbinowy,
- Forma związana: askorbogen [4].

3. Właściwości fizyko-chemiczne witaminy C

Witamina C zarówno wyizolowana, jak i zsyntetyzowana chemicznie jest białym, bezwonny proszkiem o lekko kwaśnym smaku, który ciemnieje na świetle i powietrzu. Jest to związek rozpuszczalny w wodzie, etanolu, glicerynie i glikolu propylenowym (cząsteczka hydrofilowa). Witamina C jest stosunkowo trwała w stanie suchym, zaś w roztworach wodnych ulega rozkładowi pod wpływem wielu różnych czynników: pH środowiska (alkalicznego lub obojętnego), wysokiej temperatury, obecności tlenu, jonów rtęci, żelaza, kobaltu, niklu, miedzi i manganu oraz enzymów utleniających. Stopień rozkładu wywołany tlenem rośnie wraz ze wzrostem temperatury, stąd wysoka termolabilność witaminy C. Roztwory kwasu askorbinowego wykazują najwyższą trwałość w zakresie pH 4-6. W warunkach beztlenowych kwas L-askorbinowy jest odporny na działanie wysokiej temperatury [1, 4, 10]. Najbardziej istotne właściwości fizyko-chemiczne witaminy C przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane właściwości fizyko-chemiczne witaminy C

Parametr	Postać i wartość
Masa molowa	176,13 g/mol
Gęstość	1,65 g/ml
Postać	Biała, bezwonna substancja w formie monokryształów o kwaśnym smaku, ciemniejących na powietrzu i świetle
Temperatura topnienia	190-192 °C
Temperatura wrzenia	553 °C
Rozpuszczalność	– w wodzie 0,33 g/cm ³ – w etanolu 0,02 g/cm ³
Czynność optyczna	20,5° - 21,5°
Potencjał redoks, V	E ⁰ =0,39
Maksimum absorpcji substancji czystej rozpuszczonej w wodzie	265 nm

Źródło: opracowanie własne na podstawie [1, 4]

4. Zawartość witaminy C w produktach spożywczych

Witamina C jest szeroko rozpowszechniona w produktach roślinnych, zaś produkty pochodzenia zwierzęcego zawierają jej stosunkowo niewiele. W tabeli 2. przedstawiono przykładowe średnie zawartości witaminy C w popularnych produktach spożywczych. Ponadto, ilość witaminy C w poszczególnych owocach tego samego gatunku może się różnić w zależności od odmiany, stopnia dojrzałości, warunków agrometeorologicznych, a także strat spowodowanych przechowywaniem, transportem, przetwarzaniem i przygotowywaniem żywności. Witamina C należy do nietrwałych witamin i nawet niewielkie zmiany strukturalne zmieniają ją w postać nieczynną biologicznie [6, 13]. Na przyspieszony rozpad witaminy C wpływają szczególnie procesy technologiczne z udziałem wysokiej temperatury, np. suszenie konwekcyjne, odgrzewanie potraw, ale również zbyt szybkie rozmrażanie. Straty witaminy C towarzyszące obróbce kulinarnej mogą sięgać od 10% podczas długiego nieodpowiedniego przechowywania warzyw, przez 20% w trakcie przygotowywania surówek i aż do 50-80% w procesie gotowania warzyw [14]. Żeby zminimalizować straty witamin rozpuszczalnych w wodzie podczas gotowania, zaleca się gotowanie warzyw na parze. W celu zachowania jak największej zawartości witaminy C w żywności zaleca się jej utrwalanie przez kiszenie lub mrożenie. Istotną rolę w przyspieszaniu utleniania witaminy C odgrywają enzymy z grupy oksydaz, do których należą oksydaza polifenolowa i askorbinianowa oraz peroksydaza, występujące w niektórych surowcach roślinnych. Ulegają one aktywacji w uszkodzonych tkankach roślinnych, więc w przetwarzanych surowcach, takich jak pulpy i przeciery, straty następują dosyć szybko. Witaminę C niszczą również suszenie, naświetlanie promieniami ultrafioletowymi, środki konserwujące żywność (np. benzoosan sodu) oraz niektóre leki – pochodne barbiturowe, aspiryna, sulfonamidy [6, 15]. Na 50 mg spożytej witaminy C powinno przypadać 10 mg bioflawonoidów, które można znaleźć w owocach i warzywach. Witamina C stosowana jako przeciwutleniający dodatek do żywności jest oznaczana symbolem E300 [16].

Tabela 2. Zawartość witaminy C w wybranych produktach spożywczych

Rodzaj produktu	Zawartość witaminy C [mg/100 g świeżej masy]
Warzywa i owoce	
Porzeczki czarne	182
Porzeczki czerwone	45,7
Papryka	139
Truskawki	66
Grejpfruty	40
Pomarańcze	49
Szpinak	67,8
Brukselka	94
Kapusta biała	48
Kapusta czerwona	54
Pomidory	23
Marchewka	2
Rzodkiewka	25
Ziemniaki młode	20-30
Mięso i przetwory mięsne	
Mięso wołowe lub wieprzowe	2
Nerki, wątroba	30
Ryby	3
Nabiał	
Jogurt, kefir (2% tłuszczu)	1
Mleko krowie	1-2
Inne produkty	
Lucerna	200
Orzechy włoskie	3
Owoce jarzębiny	100
Pokrzywa	100

Źródło: opracowanie własne na podstawie [3, 6, 17]

5. Dienne zapotrzebowanie na witaminę C

Zapotrzebowanie na witaminę C nie jest jednakowe u wszystkich osób. Zależy ono od licznych czynników, do których zalicza się m. in. wiek, płeć oraz stan fizjologiczny. Zwiększone zapotrzebowanie na witaminę C dotyczy:

- Kobiet w ciąży i karmiących,
- Osób prowadzących bardzo intensywny oraz stresujący tryb życia,
- Palaczy tytoniu i osób uzależnionych od alkoholu,
- Osób poddanych nadmiernemu naświetlaniu promieniami UV,
- Osób w podeszłym wieku,
- Osób poddawanych zabiegom operacyjnym, a także z urazami tkanek, odleżynami, przebarwieniami skórnyymi,
- Diabetyków (cukrzyków),
- Chorych na choroby zakaźne,

- Osób mających chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy,
- Osób regularnie przyjmujących kwas acetylosalicylowy lub inne salicylany,
- Mieszkańców dużych aglomeracji miejskich, narażonych na zanieczyszczenie środowiska (metale ciężkie, tlenek węgla),
- Osób cierpiących na zaburzenia łaknienia, uporczywe wymioty i zaburzenia pracy jelit,
- Osób biorących tabletki antykoncepcyjne, stosujących tetracykliny, barbiturany i kortykosteroidy [6, 18, 19].

W tabeli 3. zestawiono zapotrzebowanie na witaminę C dla poszczególnych grup populacji.

Tabela 3. Normy zapotrzebowania na witaminę C z podziałem na grupy ludności

Grupa	Wiek [lata]	Dawka [mg/dzień]
Noworodki	<0,5	40
Niemowłeta	0,5-1	50
Dzieci	1-3	15
Dzieci	4-8	25
Dzieci	9-13	45
Nastolatki (chłopcy)	14-18	75
Nastolatki (dziewczeta)	14-15	65
Mężczyźni	>18	90
Kobiety	>18	75
Kobiety ciężarne	>18	85
Kobiety karmiące	>18	115

Źródło: opracowanie własne na podstawie [20]

6. Witamina C w organizmie

Witamina C jest dobrze wchłaniana w jelicie cienkim, dwunastnicy i proksymalnym odcinku jelita cienkiego dzięki transportowi aktywnemu. Z dawki dobowej kwasu askorbinowego u osób niepalących wchłaniania się 70-80%. Dzięki dobrej rozpuszczalności w wodzie proces wchłaniania przebiega stosunkowo łatwo. We krwi witamina C ulega wiązaniu w 25% z albuminą, zaś glutation oraz inne związki zawierające grupy tiolowe uniemożliwiają jej utlenienie. Wartości referencyjne stężenia witaminy C w osoczu człowieka wynoszą 23-85 $\mu\text{mol/l}$ lub 0,4-1,5 mg/dl [21]. Zając witaminy i mikroelementy]. Duże ilości witaminy C pobierają limfocyty oraz płytki krwi, aż ośmiokrotnie więcej niż znajduje się w erytrocytach i osoczu. Największe ilości witaminy C odnotowano w narządach cechujących się dużą aktywnością metaboliczną: w mózgu, nadnerczach, wątrobie, śledzionie, trzustce, grasicy, siatkówce oka, płucach i w żołądku, jednak wyjątek stanowią mięśnie [3]. Kwas askorbinowy jest metabolizowany w wątrobie oraz w mniejszym stopniu w nerkach. Główny szlak metabolizmu kwasu askorbinowego wiąże się z utratą dwóch elektronów. Pojawiający się wolny rodnik odwracalnie tworzy kwas dehydroaskorbinowy, co skutkuje nieodwracalnym powstawaniem nieaktywnego fizjologicznie kwasu 2,3-diketogulonowego, który może być przekształcany do kwasu szczawiowego i treonowego lub ulegać dekarboksylacji do CO_2 , ksylozy i ksylulozy, ostatecznie prowadząc do powstawania kwasu ksylonowego i lyksonowego. Zarówno wszystkie metabolity witaminy C, jak i ona sama, są wydzielane z moczem [22].

7. Aktywność biologiczna witaminy C

7.1. Funkcja antyoksydacyjna witaminy C

Wielokierunkowe działanie kwasu askorbinowego spowodowało, że witamina C stała się jednym z najpopularniejszych i najczęściej stosowanych leków [3]. Kwas askorbinowy jest głównym przeciwutleniaczem rozpuszczalnym w wodzie. Przyjmowanym w diecie, który stanowi skuteczny „wymiatacz” wolnych rodników [3, 23, 24]. Wolne rodniki są to cząsteczki lub atomy posiadające niesparowany elektron, co czyni je wysoce reaktywnymi i pozwala odbierać elektrony innym cząsteczkom. Dążąc do stabilizacji poprzez sparowanie elektronu, wolne rodniki odbierają elektrony takim cząsteczkom biologicznym, jak białka, lipidy czy kwasy nukleinowe. Do czynników karcynogennych, mogących bezpośrednio skutkować mutacją DNA, zalicza się wolne rodniki tlenowe. Reaktywne formy tlenu (RFT) są naturalnymi produktami tlenowego metabolizmu w komórkach i w fizjologicznych stężeniach pełnią istotne funkcje regulacyjne. Biorą udział w przekazywaniu sygnałów między- i wewnątrzkomórkowych oraz uczestniczą w unieszkodliwianiu drobnoustrojów w fagolizosomach. W stanach patologicznych wolne rodniki powstają w procesach zapalnych w wyniku autooksydacji związków biologicznie czynnych, niektórych leków (np. paracetamolu, nitrazepamu, bleomycyny i chloramfenikolu), promieniowania jonizującego, ultrafioletowego, stresu, palenia papierosów i in. Antyoksydant (przeciwutleniacz) to substancja, która w stosunkowo niskim stężeniu, w porównaniu z substratami narażonymi na utlenienie, będzie stanowiła skuteczną ochronę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Stan, w którym szybkość powstawania reaktywnych form tlenu przewyższa skuteczność obrony antyoksydacyjnej organizmu nazywamy stresem oksydacyjnym [3, 25]. RFT powstają ciągle podczas tlenowego metabolizmu, ale są także natychmiastowo unieszkodliwiane przez skomplikowany system obrony antyoksydacyjnej, w którego skład wchodzi rozmaite substancje endogenne (mechanizmy enzymatyczne oraz nieenzymatyczne) i substancje pochodzące z żywności, wzajemnie na siebie oddziałujące. Do mechanizmów enzymatycznych należy: katalaza, peroksydaza glutationowa oraz dysmutaza ponadtlenkowa, zaś do mechanizmów nieenzymatycznych zalicza się: glutation, kwas askorbinowy, kwas moczowy, β -tokoferol, α -karoten, albuminę i inne. Niektóre antyoksydanty, czego przykładem są witaminy, mogą być uzupełniane z pokarmem. Inne, takie jak koenzym Q oraz antyoksydanty tiolowe (glutation i kwas liponowy) są wytwarzane w tkankach, ale na ich zawartość w organizmie może również wpływać dieta. W warunkach fizjologicznych poziom RFT w organizmie człowieka pozostaje pod restrykcyjną kontrolą, w stanie równowagi pomiędzy procesami pro- i antyoksydacyjnymi [3, 25, 26].

7.2. Rola witaminy C w prewencji i leczeniu nowotworów

Liczne badania epidemiologiczne dowodzą, że duża zawartość w diecie warzyw i owoców bogatych w witaminę C oraz wysokie stężenie witaminy C we krwi są odwrotnie skorelowane z ryzykiem rozwoju nowotworu [3]. Istnieją także nieliczne doniesienia w literaturze przeczące występowaniu takiej korelacji [27]. Uważa się, że rozwinięciu się 30-40% rodzajów nowotworów (zwłaszcza raka piersi, prostaty, okrężnicy, odbytu i płuc) można zapobiegać poprzez odpowiednią dietę, aktywność

fizyczną i utrzymywanie odpowiedniej masy ciała. Działanie ochronne przypisywane jest takim czynnikom, jak: kwas foliowy, selen, witamina D, witamina B12, chlorofil i antyoksydanty [28]. Ponadto, kwas askorbinowy przyjęty doustnie wykazuje mniej korzystne działanie niż podany dożylnie [3, 29]. Stosowanie witaminy C w leczeniu nowotworów zostało spopularyzowane przez Linusa Paulinga i obecnie jest ona najpopularniejszym suplementem diety w USA. W badaniach wykazano, że witamina C w wysokich stężeniach jest toksyczna w stosunku do komórek nowotworowych, zwłaszcza podana dożylnie. Stężenie witaminy C we krwi jest ściśle kontrolowane, nawet po zażyciu doustnie najwyższych tolerowanych dawek. Podanie dożylnie omija tę dokładną kontrolę, co powoduje zwiększenie stężenia witaminy C aż 70-krotnie w porównaniu z dawką doustną. Dowiedziono bowiem, że doustne podanie 1,25 g witaminy C powoduje wzrost stężenia w surowicy krwi do 135 $\mu\text{mol/l}$, natomiast ta sama dawka podana dożylnie aż do 885 $\mu\text{mol/l}$ [29]. Reasumując, jedynie podanie dożylnie powoduje tak wysokie stężenie witaminy C, że może ona mieć działanie przeciwnowotworowe. Co więcej, kwas askorbinowy nawet w wysokich stężeniach we krwi wydaje się mieć mniejszą toksyczność niż chemioterapeutyki. Udowodnione zostało hamujące działanie witaminy C na tworzenie się zmian przedrakowych w błonie śluzowej żołądka oraz działanie protekcyjne w prewencji dysplazji szyjki macicy [30]. Regularne spożywanie pokarmów bogatych w witaminę C zmniejsza ryzyko powstania nowotworów, szczególnie raka przełyku, żołądka i jelita grubego [30]. Kwas askorbinowy chroni także przed tworzeniem się mutagennych N-nitrozozwiązków w wyniku blokowania przemiany azotanów do rakotwórczych nitrozoamin. W żołądku azotany przy udziale bakterii m.in. *Helicobacter pylori* przekształcają się w azotyny, a te z kolei w trakcie reakcji nitrozowania w nitrozoaminy. Kwas askorbinowy hamuje działanie zarówno bakterii w żołądku, jak i reakcję nitrozowania; redukuje niebezpieczne azotyny do tlenu azotu [1]. Nie ma natomiast dostatecznych dowodów na to, że suplementacja przeciwutleniaczami ma korzystny wpływ na pierwotne lub wtórne zapobieganie powstawania gruczolaków odbytu i okrężnicy [3, 31].

7.3. Udział witaminy C w biosyntezie kolagenu

Jedną z najważniejszych funkcji witaminy C jest udział w biosyntezie kolagenu – głównego białka tkanki łącznej. Jest ono obecne w skórze, tkance chrząstnej, ścięgnach, kościach, zębach oraz rogówce oka. Dostarczenie elektronów enzymom (hydroksylazom) biorącym udział w hydroksylacji reszt lizyny i proliny powoduje przekształcenie prekolagenu we właściwy kolagen. Rolą reszt hydroksyprolinowych jest usztywnienie potrójnej helisy kolagenu, natomiast grupy hydroksylowe reszt hydrokylizynowych uczestniczą w międzycząsteczkowym poprzecznym sieciowaniu masy kolagenowej poprzez tworzenie mostków disiarczkowych oraz mają udział w tworzeniu glikoprotein. Niedobór witaminy C zaburza te procesy oraz zmniejsza ilość powstających włókien kolagenowych i zmienia ich strukturę – kolagen może stać się mniej elastyczny [1, 6, 32].

7.4. Witamina C a choroba niedokrwienna serca

Szacuje się, że w Polsce ok. 1 mln ludzi ma chorobę wieńcową, przy czym u 80-100 tys. rocznie stwierdza się zawał serca, natomiast u blisko 700 tys. diagnozuje się miażdżycę tętnic obwodowych. Do czynników ryzyka miażdżycy należą m. in. nadciśnienie tętnicze i zaburzenia metaboliczne, głównie cukrzyca. Aktualnie na świecie przeprowadza się rocznie ok. 1 mln operacji kardiologicznych, a 70-80% z nich to operacje tętnic wieńcowych spowodowane chorobą niedokrwienną serca. Wiele danych wskazuje na udział procesów peroksydacyjnych lipidów błon komórkowych i lipoprotein surowicy krwi w mechanizmach powstawania zmian miażdżycowych. Powstawanie zmian miażdżycowych jest reakcją ścian naczyń krwionośnych na działanie różnorodnych czynników szkodliwych, dlatego należy zwiększyć starania, aby zminimalizować wpływ czynników uszkadzających śródbłonek naczyniowy, do których należą: wysokie stężenie cholesterolu we krwi, hiperglikemia, nadciśnienie tętnicze, wolne rodniki, dym tytoniowy oraz wzrost stężenia katecholamin. Czynniki te uszkadzają śródbłonek, ale również stymulują trombocyty i aktywują proces krzepnięcia, rozpoczynając w ten sposób odkładanie się blaszki miażdżycowej. Obecnie wiadomo, że cukrzyca jest najważniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia ponownego zawału serca lub zgonu sercowego. Liczne badania epidemiologiczne wskazują na ochronną rolę diety bogatej w owoce i warzywa. Zwiększona zawartość w pożywieniu witamin E i C, β -karotenu hamuje w organizmie procesy peroksydacyjne, spowalniając rozwój miażdżycy, a także zmniejsza nasilenie występowania choroby niedokrwiennej i zawałów serca [3, 33].

W wyniku suplementacji witaminą C obniża się poziom trójglicerydów we krwi, a hydroksylazy zależne od cytochromu P-450 w obecności witaminy C katalizują konwersję cholesterolu w kwasy żółciowe. Odpowiedni poziom witaminy C w organizmie zapewnia ciągłość śródbłonka naczyń krwionośnych i prawidłową jego strukturę. Efekt ten jest związany z różnymi funkcjami, jakie pełni witamina C w organizmie, a dokładnie: udziałem w syntezie mukopolisacharydów i kolagenu, zapobieganiem oksydacji lipoprotein o małej gęstości (LDL), obniżaniem podwyższonego ciśnienia tętniczego krwi [3, 34].

7.5. Udział witaminy C w odporności organizmu

Witamina C jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego, zarówno jego komponenty humoralnej, jak i komórkowej. Uczestniczy ona w procesach immunomodulacyjnych oraz stymuluje syntezę interferonu. Ponadto zwiększa odporność *in vivo* poprzez aktywność komórek NK (*natural killer*) oraz aktywność limfocytów B i T, które oprócz zwalczania patogenów eliminują także komórki nowotworowe. Kwas askorbinowy wpływa również na aktywność i migrację granulocytów, makrofagów i monocytów, powstawanie immunoglobulin klas IgG i IgM oraz interferonu. Co więcej, związek ten uczestniczy w procesie transformacji limfocytów [1, 6, 23]. Natomiast brak jest jednoznacznych dowodów na skrócenie czasu trwania przeziębienia lub złagodzenie jego przebiegu w wyniku suplementacji witaminą C [11].

7.6. Pozostałe działania biologiczne witaminy C

Witamina C jest wysoce aktywnym biologicznie związkami i uczestniczy w wielu innych procesach:

- Obniża poziom cukru we krwi w stanach hiperglikemii oraz na czczo u chorych na cukrzycę [35],
- Chroni przed rozwojem chorób neurodegeneracyjnych i psychicznych [36],
- Wspomaga leczenie zydowudyną zakażeń wirusem HIV [37],
- Pomaga w utrzymaniu zdrowych dziąseł [38],
- Wspomaga proces gojenia się ran i odbudowy tkanek [38],
- Bierze udział w oksydacyjnej degradacji tyrozyny [2],
- Regeneruje tokoferol z jego postaci wolnorodnikowej [39],
- Uczestniczy w syntezie karnityny [2],
- Bierze udział w biosyntezie hormonów (np. adrenaliny) i transmiterów jako dawca elektronów [2, 39],
- Wspomaga leczenie astmy [3],
- Zwiększa przyswajanie wapnia i żelaza niehemowego [2],
- Wspomaga tlenoterapię [40].

8. Niedobór i nadmiar witaminy C w organizmie

Obecnie niezwykle rzadko obserwuje się typowe objawy głębokiego niedoboru witaminy C w postaci szkorbutu. Hipowitaminoza manifestuje się osłabieniem organizmu, zwiększoną podatnością na infekcje, zwłaszcza zapalenie błon śluzowych, zmniejszeniem wydolności fizycznej i zmęczeniem, bólami mięśni i stawów, zaburzeniem procesu gojenia się ran, zmianami w dziąsłach oraz zakłóceniami w syntezie kolagenu. Powoduje też utratę apetytu, osłabienie stanu psychofizycznego i depresję, przyczynia się do wystąpienia osteoporozy i nadczynności tarczycy. Co więcej, długotrwałe niedobory kwasu askorbinowego mogą podwyższać ciśnienie tętnicze krwi, zwiększając ryzyko występowania zmian aterosklerotycznych, chorób nowotworowych i miażdżycy [1, 4, 39].

Witamina C jest dobrze tolerowana przez organizm, jednakże długotrwałe przyjmowanie dużych dawek (zwłaszcza megadawek wynoszących powyżej 2000 mg/dobę) [3] może skutkować wystąpieniem pewnych działań niepożądanych, do których zalicza się zaburzenia ze strony układu pokarmowego (biegunka hiperosmotyczna), ostry kryzys komórek sierpowatych o osób z anemią sierpowatą, wytrącanie się szczawianów, moczanów i cystynianów w postaci kamieni nerkowych. Należy jednak zaznaczyć, że nie wykazano działania toksycznego witaminy C, a jej nadmiar zazwyczaj zostaje wydalony z moczem w wyniku zwiększonej filtracji nerkowej, z potem, a u kobiet karmiących także z mlekiem. W kale znajdują się znikome ilości witaminy C rzędu 5 mg/dobę. [1, 6, 41, 42].

9. Podsumowanie

Witaminy stanowią grupę związków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, zaś witamina C jest jedną z najbardziej popularnych i znanych witamin o wielokierunkowej aktywności biologicznej. Liczne publikacje naukowe wskazują na niezwykle ważną rolę witaminy C w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób, w tym nowotworowych. Warto mieć to na uwadze, włączając do diety jak najwięcej warzyw i owoców bogatych w ten związek, jak również w inne witaminy oraz flawonoidy.

Literatura

1. Janda K., Kasprzak M., Wolska J. *Witamina C – budowa, właściwości, funkcje i występowanie*, Pomeranian Journal of Life Sciences., 61 (4) (2015), s.419-425.
2. Moszczyński P., Pyć R. *Biochemia witamin. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy. Część II*, PWN, Warszawa (1999), s. 112-132.
3. Maćkowiak K., Torliński L. *Współczesne poglądy na rolę witaminy C w fizjologii i patologii człowieka*, Nowiny Lekarskie., 76 (4) (2007), s. 349-356.
4. Kleszczewska E. *Biologiczne znaczenie witaminy C ze szczególnym uwzględnieniem jej znaczenia w metabolizmie skóry.*, Polski Merkuriusz Lekarski., 138 (23) (2007), s. 462-465.
5. Reichstein T., Grüssner A. *Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin).*, Helvetica Chimica Acta 17 (1) (1934), s. 311-328.
6. Miktus M. *Witaminy. Część II. Ogólna charakterystyka witaminy C*, Nutrition&Health., 1 (12) (2000), s. 1-4.
7. Chatterjee I. B., Majumder A. K., Nandi B. K., Subramanian N. *Synthesis and some major functions of vitamin C in animals*. Annals of the New York Academy of Sciences, Second Conference on Vitamin C, September 258 (1975), s. 24–47.
8. Mazid M., Khan T. A., Khan Z. A., Quddusi S., Mohammad F. *Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants*, International Journal of Plant, Animals and Environmental Sciences 1 (2) (2011), s. 167-184.
9. Tripathi R., P., Singh B., Bisht S. S., Pandey J. *L-ascorbic acid in organic synthesis: an overview*, Current Organic Chemistry 13 (2009), s. 99-122.
10. Kleszczewska E. *L-ascorbic acid – clinical use, toxicity, properties, methods of determination and application in chemical analysis*, Die Pharmazie 55 (2000), s. 9-15.
11. Dobosz A. *Witamina C Fakty i mity*, Polski Przemysł 1 (2016), s. 76-79.
12. Smirnof A. *Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule*, Current Opinion in Plant Biology 3 (2000), s. 229-235.
13. Fang T., Zhen Q., Liao L., Owiti A., Zhao L., Korban S. S., Han Y. *Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples*, Food Chemistry 225 (2017), s. 132-137.
14. Charlton K. E., Patrick P., Dowling L., Khulani K., Jensen E. *Ascorbic acid losses in vegetables associated with cook-chill food preparation*, South African Journal of Clinical Nutrition 17 (2) (2004), s. 56-63.
15. Bosch V., Cilla A., Garcia-Llatas G., Gilabert V., Boix R., Alegria A. *Kinetics of ascorbic acid degradation in fruit-based infant foods during storage*, Journal of Food Engineering 116 (2013), s. 298-303.
16. Grimm H.U. *Chemia w pożywieniu. Jak działają dodatki do żywności i dlaczego nam szkodzą*, Vital, Białystok 2014, s. 169–170.

17. Padayatty S. J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee Y.-H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S. K., Levine M. *Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention*, Journal of the American College of Nutrition 22 (1) 2013, s. 18-35.
18. Iqbal K., Khan A., Khattak M. A. H. *Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health – A Review*, Pakistan Journal Of Nutrition 3 (1) (2004), s. 5-13.
19. Kaliś K. *Dwukierunkowe działanie witaminy Ca degradacja i suplementacja*, Postępy Higieny i Medycyna Doświadczalnej 69 (2015), s. 1239-1244.
20. <http://www.theresearchpedia.com/health/health-benefits-of-foods/health-benefits-of-vitamin-c>
21. Zając M. *Witaminy i mikroelementy*, Wydawnictwo Kontekst, Poznań 2000.
22. Hacisevki A. *An Overview Of Ascorbic Acid Biochemistry*, Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University 38 (3) (2009), s. 233-255.
23. Webb A. L., Villamor E. *Update: effects of antioxidant and non-antioxidant vitamin supplementation in immune function*, Nutrition. Reviews 65 (5) (2007) s.,181-217.
24. Duarte T. L., Lunec J. *Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C*, Free Radical Research 39 (7) (2005), s. 671-686.
25. Włodek L. *Reaktywne formy tlenu (RFT) w warunkach fizjologicznych i patologicznych, komórkowe systemy antyoksydacyjne*, Farmacja Polska, 60 (9) (2004), s. 404–419.
26. Zhang P. Y., Xu X., Li X. C. *Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 18 (20) (2014), s. 3091–3096.
27. Won Lee K., Joo Lee H., Surh Y., Jong Lee C. *Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal*, American Journal of Clinical Nutrition 78 (2003), s., 1074-1078.
28. Donaldson M. S. *Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet*, Nutrition Journal 3 (2004), s. 19-30.
29. Padayatty S.J., Sun H., Wang Y., Riordan H.D., Hewitt S. M., Katz M., Wesley R.A., Levine M. *Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use*, Annals of Internal Medicine 140 (2004), s. 533-537.
30. Ziemiański S. *Normy żywienia człowieka*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL (2001), s. 292-308.
31. Blejakovic G., Nagorni A., Nikolova D., Simonetti R.G., Blejakovic M., Glud C. *Meta-analysis: antioxidant supplements for primary and secondary prevention of colorectal adenoma*, Alimentary Pharmacology & Therapeutics 24 (2006), s. 281-291.
32. Sroka Z., Gamian A., Cisowski W. *Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 59 (2005), s. 34–41.
33. Kleszczewska E., Buraczyk M., Lisowski P., Kleszczewski T. *Porównanie poziomów kwasu askorbowego u palaczy chorych na cukrzycę typu II oczekujących na operację pomostowania tętnic wieńcowych (CABG) z poziomami kwasu askorbowego w okresie popostopowym i rekonwalescencji*, Przegląd Lekarski 63 (10) (2006), s. 974–978.
34. Korantzopoulos P., Kolettis T. M., Kountouris E., Dimitroula V., Karanikis P., Pappa E., Siogas K., Goudevenos J. A. *Oral vitamin C administration reduces early recurrence rates after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation and attenuates associated inflammation*. International Journal of Cardiology 102(2) (2005), s. 321-326.
35. Tabatabaei -Malazy O., Nikfar S., Laridžani B., Abdollahi M. *Influence of ascorbic acid supplementation on type 2 diabetes mellitus in observational and randomized controlled trials; a systematic review with meta -analysis*. Journal of Pharmacy & Pharmacological Science 17 (4) (2014), s. 554–582.
36. Dakhale G. N., Khanzode S. D., Khanzode S. S. Saoji A. *Supplementation of vitamin C with atypical antipsychotics reduces oxidative stress and improves the outcome of schizophrenia*, Psychopharmacology 182 (4) (2005), s. 494-498.

37. Papparella I., Ceolotto G., Berto L., Cavalli M., Bova S., Cargnelli G., Ruga E., Milanese O., Franco L., Mazzoni M., Petrelli L., Nussdorfer G. G., Semplicini A. *Vitamin C prevents zidovudine-induced NAD(P)H oxidase activation and hypertension in the rat*, Cardiovascular Research 73 (2) (2006), s. 432-438.
38. Jarosz M. *Normy żywienia dla populacji polskiej – nowelizacja*, Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2012, s. 106–107.
39. Gawęcki J. *Żywnie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*, PWN, Warszawa 2010, s. 271–276.
40. Bader N., Boser-Westphal A., Koch A, Mueller M. J. *Influence of vitamin C and E supplementation on oxidative stress induced by hyperbaric oxygen in healthy men*, Annals of Nutrition and Metabolism 50 (3) (2006), s. 173-176.
41. Skalozubova T., Reshetova V., Sorokina A., Markaryan A., Glazkova I. *Leaves of common nettle (Urtica dioica L.) as a source of ascorbic acid (Vitamin C)*, World Applied Sciences Journal 28 (2) (2013), s. 250–253.
42. Grimm H.U. *Chemia w pożywieniu. Jak działają dodatki do żywności i dlaczego nam szkodzą*, Vital, Białystok 2014, s. 169–170.

Witamina C – struktura, występowanie i rola w organizmie człowieka

Streszczenie

Witamina C (kwas askorbinowy) jest organicznym związkiem z grupy nienasyconych alkoholi polihydroksylowych, niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Ponieważ ludzki organizm nie jest w stanie jej zsintetyzować, musi być ona dostarczana wraz z pożywieniem. Bogatym źródłem tej witaminy są warzywa i owoce, które powinny stanowić podstawę codziennej diety. Kwas askorbinowy cieszy się dużym zainteresowaniem ze względu na szerokie spectrum aktywności biologicznej. Może on znaleźć zastosowanie w profilaktyce wielu chorób, m.in. układu krążenia i nowotworów. Mechanizm działania witaminy C opiera się głównie na właściwościach antyoksydacyjnych i neutralizacji wolnych rodników, dzięki czemu pozwala ona chronić kwasy nukleinowe, węglowodany, tłuszcze i białka przed ich wpływem. Wzmacnia także system odpornościowy organizmu, dzięki czemu szybciej zwalcza on bakterie i wirusy oraz przyspiesza proces gojenia się ran.

Słowa kluczowe: witamina C, kwas askorbinowy, właściwości antyoksydacyjne, działanie przeciwnowotworowe

Vitamin C – the structure, presence and function in human body

Abstract

Vitamin C (ascorbic acid) is an organic compound belonging to the group of unsaturated polyhydric alcohols, necessary for the proper functioning of living organisms. Because the human body is unable to synthesize it, it must be supplied in the diet. A rich source of this vitamin are vegetables and fruits, which should form the basis of the daily diet. Ascorbic acid is very popular because of the wide spectrum of biological activity. It may find application in the prevention of many diseases, including cardiovascular diseases and cancer. The mechanism of action of vitamin C is mainly based on the antioxidant properties and neutralization of free radicals, thereby allowing it to protect nucleic acids, carbohydrates, fats and proteins against their effects. It strengthens the body's immune system, making it faster fights bacteria and viruses, and accelerates the process of wound healing.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, antioxidant properties, antitumor activity

Witamina D niejedno ma imię – znaczenie witaminy D w kształtowaniu komponentu tłuszczowego składu ciała człowieka

1. Wstęp

W ostatnim czasie liczne źródła naukowe wskazują na pandemię niedoboru witaminy D w społeczeństwie [1]. Niedobór witaminy D jest głównie wiązany z nieprawidłowym metabolizmem tkanki kostnej skutkując krzywicą u dzieci i osteoporozą wśród dorosłych. Jednakże coraz więcej badań naukowych wskazuje na znaczący wpływ zawartości witaminy D na metabolizm tkanki tłuszczowej u dzieci, jak i u osób dorosłych.

2. Witamina D – tło historyczne

Jedne z wcześniejszych form fitoplanktonowych, które żyją w Oceanie Atlantyckim prawdopodobnie w niezmienionej formie od ponad 750 lat, produkują witaminę D tylko w obecności światła słonecznego [2-3]. Promieniowanie słoneczne jest także niezbędne do syntezy witaminy D w przypadku wielu kręgowców: płazów, gadów, ptaków i ssaków [2]. Po raz pierwszy związek pomiędzy dobroczynnymi promieniami słonecznymi, a redukcją zachorowalności na krzywicę opisał Polak Jędrzej Śniadecki w 1822 roku [4]. W latach 30-tych XX wieku jako powszechną profilaktykę przeciwko krzywicy zalecano kąpiele słoneczne [5-7].

Obecnie prowadzone są znacznie dokładniejsze badania oceniające związek witaminy D oraz jej różnych form nie tylko z zachorowalnością na krzywicę, ale i nowotwory jelita grubego, prostaty, piersi i wiele innych [8-14]. Wykazano także związek z niedoborem witaminy D, a rozwojem chorób autoimmunologicznych takich jak cukrzyca typu 1 [15], czy zespół Crohna [16]. Także rozwój niektórych chorób psychicznych takich jak depresja [17] oraz schizofrenia [18] są wiązane z niedoborem witaminy D.

3. Egzogenna i endogenna pula witaminy D

Na całą pulę witaminy D organizmu składa się witamina D pobrana egzogennie, a więc z pożywieniem lub suplementami diety oraz ta, która produkowana jest naturalnie przez organizm i aktywowana do formy biologicznie czynnej pod wpływem promieniowania UVB o długości fali 290-320 nm. Zaleca się ekspozycję nie krótszą i nie dłuższą niż 15-minutową, gdyż wykazano, że zbyt długa ekspozycja na promie-

¹ paulina.pruszkowska@biol.uni.lodz.pl, Katedra Antropologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

niowanie UV wiąże się z syntezą nieaktywnych biologicznie związków lumisterolu i tachysterolu [19].

Egzogennymi źródłami witaminy są głównie tusze ryb takich jak dorsz, czy śledź, wyjątkowo zasobny w witaminę D jest również tran. Ponadto szczególnie bogate w witaminę D są wszelkie produkty pochodzenia mlecznego [20].

Witamina D jest transportowana w organizmie w trzech formach: ok. 80-90% krąży jako kompleks witamina D - proteina wiążąca witaminę D (ang. *VDBP vitamin D binding protein*), 10-15% jest związana z albuminami osocza, natomiast mniej niż 1% to wolna witamina D [21].

3.1. Synteza witaminy D

Obecny w keranocytach warstwy podstawnej naskórka 7-dehydroksycholesterol jest przekształcany pod wpływem promieniowania UVB do pro-witaminy D₃, a następnie pod wpływem temperatury ciała przechodzi do formy aktywnej czyli witaminy D₃ (cholekalcyferolu). W takiej postaci przechodzi do wątroby w celu przejścia proces hydroksylacji dając w efekcie 25-hydroksyvitaminę D₃, będącą jeszcze nieaktywnym biologicznie prohormonem. Następnie w nerkach (kanaliki proksymalne) przechodzi jeszcze jedną hydroksylację dając ostateczną aktywną formę 1,25-dihydroksyvitaminę D₃ oraz występującą w małej ilości 24, 25-dihydroksyvitaminę D₃ oraz 25,26-dihydroksyvitaminę D₃ [22]. Ponadto stwierdzono, że konwersja 25-hydroksyvitaminy D₃ do 1, 25- dihydroksyvitaminy D₃ może zachodzić także w tkance kostnej, czy w łożysku [23].

4. Przyczyny niedoboru

Do głównych przyczyn niedoboru witaminy D zalicza się niewystarczającą egzogenną podaż witaminy z pożywieniem oraz niewystarczający czas ekspozycji na promieniowanie UVB. Innymi przyczynami niedoboru mogą być zaburzenia mniej swoiste m.in. zaburzenie hydroksylacji, nieprawidłowości metaboliczne (nadmierny katabolizm), zmniejszona wrażliwość tkanek docelowych związana z defektem receptora. Ponadto warto wspomnieć, że ograniczona absorpcja skórna promieni słonecznych jest związana z powszechnym stosowaniem kremów z filtrem UVB, które ograniczają docieranie promieni UV nawet w 90% [24-25].

5. Epidemia otyłości

W zakresie nadmiarów masy ciała wyróżnia się nadwagę oraz otyłość I, II i III stopnia. Nadwaga i otyłość są głównymi problemami klinicznymi współczesnych populacji ludzkich wynikającymi z zaburzeń żywienia. Rozróżnienia tych dwóch schorzeń dokonuje się na podstawie indywidualnej wartości wskaźnika BMI odniesionej do zakresu zmienności tej cechy odpowiedniego dla wieku i płci badanego [26-27]. Otyłość jest definiowana przez WHO [28] jako nieprawidłowe i rozległe gromadzenie tkanki tłuszczowej wpływające negatywnie na zdrowie człowieka.

Wyniki coraz większej ilości badań pozwalają włączyć się w ogólnoswiatową dyskusję naukową dotyczącą epidemii otyłości [29]. Najbardziej niepokojące są dane

dotyczące dzieci, wśród których zjawisko to jest coraz bardziej powszechne. Jak wynika z raportów WHO i prac naukowych otyłe dzieci to prawie w 80% przypadków otyli dorośli [30]. Do czynników składających się na kształtowanie nadmiarów tkanki tłuszczowej wymienia się czynniki genetyczne, m in. polimorfizmy takich genów jak FTO, czy MC4R [31], ale też całą gamę czynników środowiskowych jak tryb życia, rodzaj spożywanych pokarmów, czy status socjoekonomiczny [32-35].

5.1. Związek witaminy D z dystrybucją tkanki tłuszczowej

Pierwsze prace wiążące istotność stężenia witaminy D z ilością tkanki tłuszczowej pochodzą sprzed 40 lat [23]. Od tego czasu mechanizm ten jest już coraz dokładniej rozpracowywany, jednak do tej pory mechanizm nie jest całkowicie wyjaśniony. Aktualne prace wskazują na związek stężenia witaminy D z parametrami wskazującymi stopień otluszczenia organizmu. Parikh i in. [36] wykazali negatywną korelację pomiędzy stężeniem 25-hydroksywitaminy D, a wartością wskaźnika BMI i zawartością tkanki tłuszczowej. Nowe prace Jacksona i in. [37] i Holmlund-Suila i in. [38] wskazują na znacząco niższy poziom 25-hydroksywitaminy D u osób charakteryzujących się większymi obwodami talii i wyższymi wartościami wskaźnika BMI.

5.2. Rola niedoboru witaminy D w lipogenezie i adipogenezie

Lipogeneza to proces polegający na syntezie cząsteczek tłuszczu [39], natomiast adipogeneza polega na namnażaniu się komórek tłuszczowych. Poziom witaminy D organizmu jest ściśle związany z powyższymi procesami [40].

Pierwsze wzmianki na temat związku poziomu 1,25-dihydroksywitaminy D₃ w molekularnym mechanizmie odpowiadającym za dojrzewanie adipocytów, czyli przechodzenie od fibroblastycznych komórek pre-adipocytów do formy ostatecznej pojawiły się w pracy Sato i in. z 1988 roku [41].

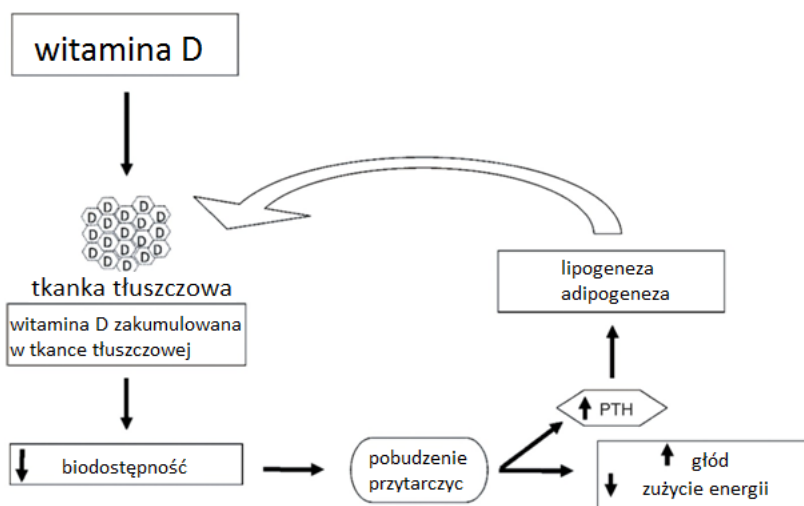
Jak dowodzą późniejsze badania istotne znaczenie w molekularnym mechanizmie adipogenezy ma białko (PPAR γ) (ang. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) należące do rodziny białek receptorów jądrowych. Wiążąc się z receptorem RXR (ang. retinoid X receptor) tworzy heterodimer będący czynnikiem transkrypcyjnym [42]. Receptor PPAR γ ma istotne znaczenie podczas konwersji pre-adipocytów do dojrzałych adipocytów [43].

Pod koniec lat 80-tych zespół z Japonii pod kierownictwem Ishida, wykazał istotny wpływ 1,25-dihydroksywitaminy D₃ na liczbę i metabolizm adipocytów. Badania polegały na dodaniu do hodowli tkankowej składającej się z pre-adipocytów nanomolowego roztworu 1,25-dihydroksywitaminy D₃ pod wpływem, którego adipogeneza była zatrzymywana, a ilość akumulowanych triglicerydów ulegała redukcji do 50%. Wykazano także, że inne formy witaminy D jak 24,25-dihydroksywitaminy D₃ również wykazują takie właściwości. Jednakże każda z form wykazuje te zdolności tylko w przypadku niedojrzałych adipocytów.

Kong i in. wykazali, że 1,25-dihydroksywitamina D₃ ma charakter inhibitora adipogenezy tylko przez pierwsze 48 godzin. Ponadto po usunięciu 1,25-dihydroksywitaminy D₃ z pożywki po 3 dobach proces adipogenezy jest wznowiany [44].

5.3. Witamina D a metabolizm tkanki tłuszczowej

Witamina D to cząsteczka rozpuszczająca się w tłuszczu, aspekt ten ma znaczenie w metabolizmie tkanki tłuszczowej i biodostępności witaminy D w organizmie. Rysunek 1 przedstawia prawdopodobne cykliczne wydarzenia metaboliczne mające miejsce w organizmie, a zostające pod kontrolą poziomu witaminy D. Przy zwiększającej się liczbie komórek tłuszczowych cząsteczki witaminy D w coraz większej ilości rozpuszczają się w tkance tłuszczowej. Wpływa to na zmniejszanie się biodostępności witaminy D we krwi, co w efekcie prowadzi do pobudzenia przytarczyc. Pobudzone przytarczycy wpływają na zwiększone uczucie głodu przy jednoczesnym mniejszym zużyciu energii, ponadto zwiększające się stężenie parathormonu (PTH) wpływa na wzmoczoną lipogenezę i adipogenezę, co w efekcie powoduje, że coraz mniejsza pula witaminy jest dostępna.



Rysunek 1. Cykliczny mechanizm kumulowania się komponentu tłuszczowego w zależności od poziomu witaminy D (Na podstawie [45])

5.4. Poziom witaminy D wśród dzieci

Najbardziej alarmujące są dane dotyczące grupy dziecięcej. Literatura wskazuje na jednoczesne wzmocnienie problemu otyłości jak i niedoborów witaminy D. Jak się okazuje, te dwa zdarzenia są ze sobą ściśle powiązane. Oszacowano, że nawet do 84,4% dzieci ma zbyt niskie stężenie witaminy D [45]. Liczne badania wskazują na ujemną korelację stężenia witaminy D z takimi parametrami jak BMI, procentowa zawartość tkanki tłuszczowej, czy wskaźnik WHR wśród dzieci [46-47]. Lourenço i in. wykazali, że niski poziom witaminy D wpływa na zmianę ekspresji w genie FTO, którego odpowiedni układ polimorfizmów predysponuje do otyłości [48].

5.5. Czy forma witaminy D ma znaczenie?

Pomimo tego, iż 25-hydroksywitamina D jest formą najczęściej badaną to należy mieć na uwadze, że to właśnie 1,25-dihydroksywitamina D₃ stanowi formę o najwyższej aktywności metabolicznej. Stężenie 25-hydroksywitamina D₃ jest 100 razy wyższe niż jej formy 1,25- dihydroksywitaminy D₃ ponadto witamina 25-hydroksywitamina D jest stabilna do dwóch-trzech tygodni, natomiast 1,25-dihydroksywitamina D₃ charakteryzuje się sześciogodzinnym okresem półtrwania [49].

6. Podsumowanie

Witamina D to nie tylko cząsteczka ważna ze względu na udział w metabolizmie tkanki kostnej, ale i istotna molekula związana ze szlakami metabolicznymi lipogenezy i adipogenezy. Jak wskazują wyniki badań, mechanizmy te nie są jednak do końca wyjaśnione i badania w tym zakresie są pożądane. Zważając na narastający problem otyłości, zagadnienie to jeszcze bardziej zyskuje na znaczeniu.

Literatura

1. Holick M. F., Chen T. C. *Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences*. The American journal of clinical nutrition, 87 (4) (2008) s. 1080-1086.
2. Holick M.F. *Phylogenetic and evolutionary aspects of vitamin D from phytoplankton to humans*. In: Pang PKT, Schreibman MP, eds. *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications*. Vol 3. Orlando, FL: Academic Press, Inc (Harcourt Brace Jovanovich), (1989), s. 7–43.
3. Holick M.F. *Vitamin D: A millennium perspective*, Journal of cellular Biochemistry, 88(2) (2003), s. 296-307.
4. Sniadecki J. Jędrzej Sniadecki (1768 –1838) on the cure of rickets. (1840) Cited by W Mozolowski. *Nature*, 143 (1939), s.121– 146.
5. Hess A.F., Unger L.J. *The cure of infantile rickets by sunlight*, JAMA 1921), s. 77:39.
6. Hess A.F. *Collected writings*, volume I. Springfield, IL: Charles C Thomas, (1936), s. 669 –719.
7. Holick M.F. *Resurrection of vitamin D deficiency and rickets*, The Journal of Clinical Investigation, 116 (2006), s. 2062–2072.
8. Apperly F.L. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America, *Cancer Research*, 1 (1941), s. 191–195.
9. Garland C.F., Comstock G.W., Garland F.C., Helsing K.J., Shaw E.K., Gorham E.D. *Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study*, *Lancet*, 2 (1989), s. 1176 – 8. 48.
10. Gorham E.D., Garland C.F., Garland F.C. *Vitamin D and prevention of colorectal cancer*, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 97 (2005), s. 179 –194.
11. Hanchette C.L., Schwartz G.G. *Geographic patterns of prostate cancer mortality*, *Cancer*, 70, (1992), s. 2861–2869.
12. Grant W.B. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation, *Cancer*, 94 (2002), s.1867– 1875.
13. Grant W.G., Garland C.F. The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates, *Anticancer Research*, 26 (2006), s. 2687–2700.

14. Giovannucci E., Liu Y., Rimm E.B., et al. *Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men*, The Journal of the National Cancer Institute, 98 (2006), s. 451–459.
15. Zipitis C.S., Akobeng A.K. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Archives of disease in childhood*, 93 (6) (2008), s. 512–517.
16. Koutkia P., Lu Z., Chen T. C., Holick M. F. *Treatment of vitamin D deficiency due to Crohn's disease with tanning bed ultraviolet B radiation*, *Gastroenterology*, 121 (6) (2001), s. 1485–1488.
17. Gloth F.M., Alam W., Hollis B. *Vitamin D vs. broad spectrum phototherapy in the treatment of seasonal effective disorder*, The Journal of Nutrition Health and Aging, 3 (1999), s. 5–7.
18. McGrath J., Selten J.P., Chant D. Long-term trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration— data from Australia and the Netherlands, *Schizophrenia Research*, 54 (2002), s. 199–212.
19. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009; 94: 26–34.
20. Czech-Kowalska, J., Wietrak E., Popiel M. *Znaczenie witaminy D w okresie ciąży i laktacji*, *Ginekologia i Położnictwo.*, 19 (2011), s. 48–61.
21. Yousefzadeh P., Shapses A.S., Wang X. Vitamin D binding protein impact on 25-hydroxyvitamin D levels under different physiologic and pathologic conditions, *International journal of endocrinology*, (2014), s. 1–6.
22. Tuchendler D., Bolanowski M. *Sezonowość zmian stężeń witaminy D w organizmie człowieka*, *Endocrinology, Obesity and Metabolic Disorders*, 6 (1) (2010), s. 36–41.
23. Walicka, M., Jasik A., Paczyńska M., Wąsowski M., Tałataj M., Marcinkowska-Suchowierska E. *Niedobór witaminy D—problem społeczny*, *Borgis—Postępy Nauk Medycznych*, 1 (2008), s. 14–22.
24. Płudowski P., Karczmarewicz E., Czech-Kowalska J. *Nowe spojrzenie na suplementację witaminą D*, *Standardy Medycyny*, 1 (6) (2009), s. 23–41.
25. Misra M., Pacaud D., Petryk A. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendation, *Pediatrics*, 122 (2008), s. 398–417.
26. Kuczmarowski R. J., Flegal K. M. *Criteria for definition of overweight in transition: background and recommendations for the United States*, *Special Article The American Journal of Clinical Nutrition*, 72 (2000), s. 1074–1081.
27. Rosset I., Roślak M., Grabowska J., Borowska-Strugińska B., Lorkiewicz W., Sitek A., Stolarczyk H., Śmiszkiewicz-Skwarowa A., Żądzińska E. 2009. *Stan rozwoju fizycznego dzieci i młodzieży miasta Łodzi* [w:] Żądzińska E. (red.) 2004. *Dziecko Łódzkie. Normy rozwoju biologicznego*. Wyd. UŁ, Łódź.
28. World Health Organization. 2000. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation*. World Health Organization, Geneva
29. Wright J., Harwood V. (red.) *Biopolitics and the 'obesity epidemic': governing bodies* (Vol. 3). Routledge. (2012).
30. Osiecka Chojnacka J. *Obesity epidemic*, *Infos zagadnienia społeczno-gospodarcze*, 3 (117) (2012), s. 1–4.
31. McMurray F., Church C. D., Larder R., Nicholson G., Wells S., Teboul, L., Yeo G. S. *Adult onset global loss of the fto gene alters body composition and metabolism in the mouse*, *PLoS Genetics*, 9 (1) (2013), s. 1003–1166.

32. Sitek, A., Rosset, I., Strapagiel, D., Majewska, M., Ostrowska-Nawarycz, L., & Żądzińska, E. *Association of FTO gene with obesity in Polish schoolchildren*, *Anthropological review*, 77(1) (2014), s. 33-44.
33. Żądzińska E., Rosset I., Kozieł S., Nawarycz T. Borowska-Struginska B., Lorkiewicz W., Ostrowska-Nawarycz L., Sitek A. *Frequency of under- and overweight among children and adolescents during the economic transition in Poland*, *HOMO*, 63 (2011), s. 216–232.
34. Janssen P., Katzmarzyk T., Boyce W. F., Vereecken C., Mulvihill C., Roberts C., Currie C., Pickett W. *The Health Behaviour in School-Aged Children Obesity Working Group. Comparison of overweight and obesity prevalence in school-aged youth from 34 countries and their relationships with physical activity and dietary patterns*, *Obesity Reviews*, 6 (2) (2005), s. 123–132
35. Sikorska-Wisniewska G. *Nadwaga i otyłość u dzieci i młodzieży*, *Żywność, Nauka. Technologia Jakość*, 6 (55) (2007), s. 71 – 80.
36. Parikh S.J., Edelman M., Uwaifo G. I., Freedman R. J., Semega-Janneh M., Reynolds, J., Yanovski J. A. *The relationship between obesity and serum 1, 25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults*, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, , 89 (3) (2004), s.1196-1199.
37. Jackson J. L., Judd S. E., Panwar B., Howard V. J., Wadley V. G., Jenny N. S., Gutiérrez O. *Associations of 25-hydroxyvitamin D with markers of inflammation, insulin resistance and obesity in black and white community-dwelling adults*, *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 5 (2016), s. 21-25.
38. Holmlund-Suila E., Pekkinen M., Ivaska K.K. *Obese young adults exhibit lower total and lower free serum 25-hydroxycholecalciferol in a randomized vitamin D intervention*, *Clinical endocrinology (Oxf)*, 5 (2016), s. 378-385.
39. Kersten S. *Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis*, *EMBO reports*, 2 (4) (2001), s. 282-286.
40. Wood R.J. *Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights*, *Nutrition Reviews*, 66 (1) (2008), s. 40-46.
41. Sato M., Hiragun A. *Demonstration of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor-like molecule in ST 13 and 3T3 L1 preadipocytes and its inhibitory effects on preadipocyte differentiation*, *The Journal of Cellular Physiology*, 35 (1988), s. 545–550.
42. Rangwala S. M., Lazar M. A. *Transcriptional control of adipogenesis*, *Annual review of nutrition*, 20(1) (2000), s. 535-559.
43. Rosen E.D., MacDougald O.A. *Adipocyte differentiation from the inside out*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7 (2006), s. 885–896.
44. Kong J., Yan C. L. *Molecular mechanism of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells*, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290 (5) (2006), s. 916-924.
45. . Cunha K.A., Magalhães E. I. S., Loureiro L.M., R., Sant'Ana L.F.R., Ribeiro A.Q., Novaes J.F. *Calcium intake, serum vitamin D and obesity in children: is there an association*, *Revista Paulista de Pediatria*, 33 (2) (2015), s. 222-229.
46. Lee H.A., Kim Y.J., Lee H., Gwak H.S., Park E.A., Cho S.J. *Association of vitamin D concentrations with adiposity indices among preadolescent children in Korea*, *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* , 26 (2013), s. 849-854.
47. Lee S.H., Kim S.M., Park H.S., Choi K.M., Cho G.J., Ko B.J. *Serum 25-hydroxyvitamin D levels, obesity and the metabolic syndrome among Korean children*, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23 (2013), s. 785-91.

48. Lourenço B.H., Willett L., Cardoso W.C. Action Study Team FTO genotype, vitamin D status, and weight gain during childhood, *Diabetes*, 63 (2014), s. 808-814.
49. Holick M.F., Binkley N.C., Bischoff-Ferrari H.A., Gordon C.M., Hanley D.A., Heaney R.P. *Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline*, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96 (2011), s. 1911-1930.

Witamina D niejedno ma imię – znaczenie witaminy D w kształtowaniu komponentu tłuszczowego składu ciała człowieka

Streszczenie

Naukowcy na całym świecie wskazują na alarmująco postępujący w populacji ludzkiej niedobór witaminy D. Coraz więcej badań wskazuje na kluczowe znaczenie witaminy D w wielu procesach metabolicznych, istotnych nie tylko w związku z prawidłowym funkcjonowaniem układu szkieletowego, ale także m.in. mających znaczenie w kontrolowaniu czynników ryzyka cukrzycy typu 1 czy otyłości

Witamina D jest związkiem chemicznym powstającym z cholesterolu. W organizmie występuje najczęściej w formie 25-hydroksywitaminy D₃ oraz 1,25-dihydroksywitaminy D₃, które razem stanowią o całkowitym stężeniu witaminy D₃. 25-hydroksywitamina D₃ jest syntezowana w wątrobie, a w kanalikach nerkowych bliższych jest metabolizowana do formy 1,25-dihydroksywitaminy D₃. Wolna witamina D₃ stanowi 1% jej całkowitej zawartości w organizmie, 85% jest związana z białkiem wiążącym witaminę D (VDBP *ang. vitamin D binding protein*) natomiast pozostała część połączona jest z albuminami osocza.

Zgodnie z literaturą przedmiotu, stężenie witaminy D₃ jest istotnie powiązane z nadmiarami masy ciała we wszystkich grupach wiekowych. Badania wskazują, że poziom witaminy D₃ reguluje odkładanie trójglicerydów w adipocytach. Wskazuje się na ujemną korelację stężenia witaminy D₃ z takimi parametrami jak BMI, procentowa zawartość tkanki tłuszczowej, czy wskaźnik WHR.

Słowa kluczowe: witamina D₃, otyłość, BMI, masa tłuszczowa, WHR

Vitamin D does not have one name – influence of Vitamin D on contribution of fat mass

Abstract

Scientists indicate alarmingly progressive in human populations deficient of vitamin D. More and more studies point out to the importance of vitamin D in many metabolic processes that are relevant not only in relation to the proper functioning of the skeleton but also include to the control of risk factors for Type 1 diabetes or obesity.

Vitamin D arising from molecule called cholesterol. In the body, most often occurs in the form of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃, which together constitute the total concentration of vitamin D₃. 25-hydroxyvitamin D₃ is synthesized in the liver. In the proximal renal tubules is metabolized to form 1,25-dihydroxyvitamin D₃. The free vitamin D₃ constitutes 1% of the total content in the body, 85% is associated with the vitamin D binding protein (VDBP called. Vitamin D binding protein) while the rest is combined with serum albumin.

According to the literature vitamin D₃ is significantly associated with the excesses of body weight in all age groups. Research indicates that the level of vitamin D₃ regulates the accumulation of triglycerides in the adipocytes. It shows the negative correlation between concentrations of vitamin D₃ and parameters such as BMI, percentage of body fat or WHR.

Keywords: vitamin D₃, obesity, BMI, fat mass, WHR

Toksyczność preparatów farmakologicznych – dostępnych bez recepty

1. Wstęp

Przyjmowanie znacznej części preparatów w składzie których znajdują się substancje psychoaktywne wiąże się zazwyczaj z realizowaniem recept lekarskich. Istnieje jednak na rynku grupa preparatów nie objęta tak rygorystycznymi uwarunkowaniami prawnymi – OTC (Over-The Counter). Leki te posiadają liczne grono nabywców ze względu na swoją ogólnodostępność, która wzbudza w pacjentach złudne przekonanie o bezpieczeństwie ich stosowania [1]. Zażywanie leków ogólnie dostępnych bez recepty jest bowiem jednym z najczęściej stosowanych sposobów wywoływania odurzenia, zaraz po alkoholu i marihuanie. Co więcej, zainteresowanie stosowaniem OTC w celu uzyskania efektu narkotycznego oszołomienia obserwuje się szczególnie wśród młodzieży [2].

Najbardziej popularne leki dostępne bez recepty stosowane w celach narkotycznych posiadają w swoim składzie substancje takie jak kodeina, pseudoefedryna, benzydamina, dimenhydrinat, difenhydramina czy dekstrometorfan. Preparaty te są zwykle pomocne przy łagodzenia kaszlu, objawów przeziębienia oraz choroby lokomocyjnej. Ich stosowanie zgodnie z zaleceniami podanymi przez producenta nie powinno prowadzić do wystąpienia niebezpiecznych dla zdrowia skutków ubocznych, jednakże przekroczenie zalecanych dawek terapeutycznych może skutkować pojawieniem się reakcji psychosomatycznych i psychoaktywnych [1].

Większość leków OTC, poza substancjami czynnymi warunkującymi ich efekt psychoaktywny, zawiera także szereg substancji pomocniczych, które mogą prowadzić do zatrucia organizmu. Dlatego też pozamedyczna aplikacja OTC do organizmu powinna zostać poprzedzona ich odpowiednim przygotowaniem. Informacje odnośnie przekształcenia pozornie niegroźnych leków dostępnych bez recepty w substancje odurzające podobnie jak same OTC są ogólnodostępne i można je znaleźć na wielu forach internetowych. Z roku na rok słyszy się jednak o zwiększającej się liczbie umyślnych zatruc lekami zwłaszcza wśród młodzieży. Niepokojący jest więc fakt

¹ ewelina.cholewinska@mailplus.pl, Katedra Biochemii i Toksykologii, Wydział, Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl

² kasiaognik@poczta.fm, Katedra Biochemii i Toksykologii, Wydział, Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl

³ Katedra Biochemii i Toksykologii, Wydział, Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl

⁴ danielste3@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Biologów i Hodowców Zwierząt, Sekcja Biochemiczna, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl

braku świadomości społeczeństwa odnośnie możliwych poważnych skutkach ubocznych stosowania OTC jako środków odurzających. Celem pracy było przedstawienie właściwości oraz oddziaływania na organizm wybranych substancji czynnych o charakterze psychoaktywnym zawartych w lekach OTC oraz ryzyka wynikającego z ich nadmiernego lub niezgodnego z przeznaczeniem spożycia.

2. Kodeina

Kodeina zaliczana jest do grupy alkaloidów opioidowych [3]. Związek ten jest pochodną morfiny i podobnie jak ona zawiera w swojej strukturze szkielet morfinianu, dlatego też często określany jest mianem metylomorfiny. Działanie tego alkaloidu jest 6-krotnie słabsze od morfiny. Kodeina wchodzi w skład opium – narkotyku pozyskiwanemu z zakrzepniętego soku młodych makówek maku lekarskiego (*Papaver somniferum*), przy czym jej stężenie w nim jest stosunkowo niskie i wynosi około 0,5% [4].

Powszechnie dostępne bez recepty preparaty przeciwkaszlowe i przeciwbólowe zawierają w swoim składzie od 8 do 15 mg kodeiny. W wyjątkowych tylko przypadkach metylomorfinę podawana jest jednorazowo w dawce 15-60 mg w połączeniu z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) lub paracetamolem. Wyższe dawki stosowane są jedynie w celach pozamedycznych. Preparaty oparte na kodeinie nie powinny być podawane pacjentom częściej niż co 4-6 h. Dawka śmiertelna tego alkaloidu przy jednorazowym spożyciu wynosi ok. 0,5-1 g. Kodeina w produktach farmakologicznych występuje z reguły w postaci soli, które cechują się dobrą przyswajalnością przez organizm. Opioid ten może być podawany zarówno doustnie w postaci tabletek i syropów jak i podskórnie (domięśniowo) [1, 3-5].

Głównym zastosowaniem leków zawierających kodeinę jest hamowanie ośrodka kaszlu znajdującego się w rdzeniu przedłużonym oraz działanie przeciwbólowe. Metylomorfinę w organizmie przenika przez barierę krew-mózg wpływając na działanie neuronów [1, 3].

Przedawkowanie kodeiny zazwyczaj spowodowane jest niewłaściwym stosowaniem preparatów OTC. Wyższe dawki tego opioidu mogą działać depresyjnie na ośrodek oddechowy, a nawet wywołać drgawki lub śpiączkę. Podczas ostrego zatrucia metylomorfiną dochodzi do zagrażającego życiu obrzęku płuc, braku reakcji źrenic na światło, zmniejszenia ciśnienia tętniczego krwi, tachykardii, ostrej niewydolności krążeniowej, śpiączki, drgawek, a nawet bezdechu skutkującego śmiercią [1, 3, 6]. Duże stężenie kodeiny we krwi prowadzi do zaburzenia działania mózgu wywołując sen. Przysadka mózgowa w tym czasie jest pobudzana przez podwzgórze powodując pobudzenie OUN i doprowadza do zaburzenia zwanego półsnem [7].

Odruch kaszlu tłumiony jest przez narkotyczne leki przeciwkaszlowe, w skład których wchodzi kodeina. Kaszel tłumiony jest przede wszystkim na poziomie OUN przez hamowanie transmisji glutaminergicznej. Wykazano w badaniach, że sama kodeina nie znosi kaszlu, nawet w dużych dawkach [7].

Biotransformacja kodeiny zachodzi z udziałem polimorficznych form izoenzymu cytochromu CYP2D6 w wyniku czego mogą powstać 3 produkty: morfina, norkodeina

i glukuronian kodeiny [3, 6, 8]. Około 80% zażytej dawki kodeiny ulega biotransformacji do norkodeiny i do glukuronianu-6-kodeiny, natomiast tylko 10% do morfiny. Morfina jest dalej metabolizowana do glukuronianu-6-morfiny i glukuronianu-3-morfiny. Zarówno morfina jak i glukuronian-6-morfiny mają działanie opioidowe, przez co wpływają na działanie układu nerwowego. Glukuroniany są wydalane z organizmu przez nerki, jednak w przypadku ostrej niewydolności nerek są akumulowane w organizmie [9].

Preparaty zawierające kodeinę są zazwyczaj dostępne bez recepty. Wśród nich wymienia się m.in. Antidol 15, Ascodan, Solpadeine, Nurofen Plus, Thiocodin i Neoazarinę. Osoby zażywające kodeinę w celach pozamedycznych najczęściej wybierają przeciwkaszlowy preparat – Thiocodin. Preparat ten nie zawiera w swoim składzie dostatecznej ilości toksycznego sulfogwajakolu, który przy jednorazowym zażyciu spowodowałby negatywne skutki w organizmie. Thiocodin spożywany jest zwykle na pusty żołądek poprzez połknięcie tabletek lub rozkruszonych tabletek wymieszanych z płynem. Systematyczne spożywanie sulfogwajakolu w tak dużych ilościach może doprowadzić do wrzodów żołądka i zapalenia oskrzeli [10].

W przypadku preparatów zawierających paracetamol niezbędne jest ich odpowiednie przygotowanie, gdyż przyjęcie tak wysokiej dawki wspomnianego związku może doprowadzić do zatrucia. Na wielu forach internetowych można jednak znaleźć szczegółowe informacje jak w prosty sposób przy użyciu ogólnodostępnego sprzętu oczyścić kodeinę z toksycznych substancji towarzyszących. Otrzymany produkt gotowy do pozamedycznego spożycia występuje w postaci klarownego roztworu o gorzkim smaku. [2, 11].

Średnie działanie tak uzyskanego preparatu utrzymuje się około 4 h od spożycia. Efekty opisywane przez osoby zażywające są podobne do działania marihuany – łagodne uczucie szczęścia i uspokojenia. Nie mniej jednak mogą pojawić się również skutki uboczne w postaci zaburzenia widzenia, uczucia gorąca, przemęczenie lub nudności [2, 12]. Ponadto opioidy wykazują duży potencjał uzależniający wywołując go na dwóch poziomach – psychicznym oraz fizycznym. Na wykształcenie się uzależnienia psychicznego wpływają takie czynniki jak dawka, częstotliwość, sposób przyjmowania kodeiny, cechy indywidualne i osobowościowe. Ten rodzaj nałogu rozwija się od kilkunastu do nawet kilku dni. Natomiast rozwój uzależnienia fizycznego następuje po systematycznym przyjmowaniu większych dawek przez dłuższy okres czasu trwający od ok. 6 do 12 miesięcy [13].

3. Dekstrometorfan

Dekstrometorfan (DXM) jest syntetyczną pochodną morfiny, jednakże nie zalicza się go do grupy opioidów [14, 15, 16]. DXM w lekach występuje zazwyczaj w formie bromowodorku dekstrometorfanu (Dextromethorphan hydrobromidum). Szacunkowa dawka śmiertelna wynosi około 50-500 mg/kg m.c. [17, 18].

Dekstrometorfan dzięki łatwemu przekraczaniu bariery krew-mózg przejawia intensywne działanie przeciwkaszlowe. Stosowanie dawek terapeutycznych jest wysoce bezpieczne i nie prowadzi do występowania skutków ubocznych w postaci

ogólnego znieczulenia oraz błogostanu. Jednakże przy zażyciu dawek wyższych niż zalecane (ok. 10 mg/kg m.c.) mogą wystąpić objawy niepożądane takie jak mdłości, wymioty oraz zaburzenia neurologiczne. Niekiedy występuje także wzrost temperatury organizmu, zatrzymanie moczu, tachykardia, anafilaksje, hipoglikemia, przyspieszone akcje serca, wzrost ciśnienia tętniczego krwi, swędzenie i wysypka przypuszczalnie spowodowana degradacją komórek tucznych pod wpływem dekstrometorfanu i wydostania się z nich histaminy [19, 20].

Biotransformacja DXM zachodzi w obecności izoenzymu CYP2D6 cytochromu P450 w większości do dekstrorfanu oraz 3-metoksymorfinianu i 3-hydroksymorfinianu. Spowodowane jest to silniejszym powinowactwem dekstrorfanu do receptorów NMDA glutaminergicznych aniżeli dekstrometorfan. Obydwa związki przypuszczalnie wykazują działanie psychoaktywne [20, 21].

W wyniku skomplikowanego mechanizmu działania na ośrodkowy układ nerwowy DXM wpływa na wychwytywanie zwrotne serotoniny, zwiększając przez to ryzyko pojawienia się zespołu serotoninowego, blokowanie wychwyty dopaminy, blokowanie otwartych kanałów NMDA (co charakteryzuje halucynogenne związki dysocjacyjne jak: LSD, fencyklidyna, psylocybina i ketamina) oraz działa antagonistycznie na receptory nikotynowe $\alpha 3/\beta 4$ i receptor sigma-1 (σ). Typowymi objawami zespołu serotoninowego są zaburzenia czynności psychicznych w postaci niepokoju, splątania, a nawet manii. DXM w dawkach wyższych niż zalecane uintensyfikuje działanie neuronów dopaminowych zlokalizowanych w śródmózgowiu (ośrodek nagrody/przyjemności) [16, 20, 21, 22, 23, 24].

Poprzez reakcje w miejscu wiążącym σ , dekstrometorfan jako izomer morfinopodobnego leworfanolu objawia działanie przeciwkaszlowe, przeciwdrgawkowe oraz neuroprotektoryjne. Natomiast w odróżnieniu od kodeiny i reszty opioidów nie posiada właściwości łączenia się z receptorami opioidowymi znajdującymi się w mózgu. Działanie przeciwkaszlowe prawdopodobnie jest wywołane hamowaniem przekazywania synaptycznego glutaminergicznego sygnału dochodzącego do ośrodka kaszlu. Hamowanie kaszlu zachodzi również wskutek wstrzymującego wywierania wpływu na receptory N-metylo-D-asparginianowe (NMDA) [24].

Metabolity dekstrometorfanu są sprzęgane z kwasem glukuronowym lub siarkowym i w ten sposób wydalane z organizmu wraz z moczem (4, 21, 24, 25). Preparaty oparte na DXM są przeważnie dostępne bez recepty, a wśród nich wymienić należy m.in. Acodin, Actifed/ ACTI-trin, DexaCaps, DexaPini, Dexatussin, Gripex Max Grypostop, Mucotussin, Tussidex i Vicks MedDex [1, 26].

Dekstrometorfan przyjmowany jest w celach rekreacyjnych doustnie, dożylnie, podskórnie, domięśniowo lub dootrzewnowo. Podstawowy sposób przyjęcia DXM jest bezpośrednie spożycie leku. Metoda ta jest jednak dopuszczalna tylko wtedy gdy preparat nie zawiera dodatkowych toksycznych komponentów np. Tussidex czy Acodin [27].

Izolacja DXM z preparatów stanowiących jego mieszaninę z innymi substancjami czynnymi jest procesem złożonym i sprowadza się do przeprowadzenia ekstrakcji tzw. „Agent Cytrynka” (Agent Lemon). W efekcie szeregu reakcji powstaje roztwór

wodorocytrynianu dekstrometofanu nazywany potocznie Dexmon juice [27, 28]. W ostatnich latach obserwowany jest wzrost zainteresowania pozamedycznym stosowaniem DXM – zwłaszcza wśród młodzieży. Wynika to przede wszystkim z tego, iż preparaty oparte na DXM są stosunkowo tanie i łatwo dostępne, a ich przyjęciu towarzyszy poprawa samopoczucia [29].

Toksyczność DXM jest dość niska. Sporadycznie sygnalizuje się doniesienia o ostrych zatruciach tym związkem chemicznym, dlatego nie jest objęty międzynarodową kontrolą jako narkotyk. Jednak zgłaszanych jest wiele przypadków uzależnienia psychicznego. U osób nadużywających DXM zaobserwowano wiele skutków ubocznych takich jak: halucynacje, przywidzenia, flashback, objawy upojenia alkoholowego, dyskinezy, apatię, euforię, nadpobudliwość, zaburzenia artykulacji, koszmary senne, bezsenność. Ponadto mogą wystąpić ataki paniki, trudności w zapamiętywaniu, bóle i drżenie mięśni, żółtaczkę, spadek libido. Przy długotrwałym i systematycznym zażywaniu może wystąpić także toksyczna psychoza. Odstawienie DXM skutkuje wystąpieniem „głodu”, potliwości, nudności, częstoskurczu mięśnia sercowego, nadciśnienia, bezsenności, spadku samopoczucia oraz dystrofii [29, 30].

Stosowanie DXM w połączeniu z inhibitorami monoaminooksydazy (MAOIs) wywołuje blokowanie wychwytu zwrotnego serotoniny przez neurony zwielokrotniając działanie odurzające. Ponadto stosowanie dekstrometofanu z alkoholem może wywołać negatywne skutki uboczne, a nawet prowadzić do śmierci [14].

4. Benzydamina

Benzydamina wywodzi się od indazolu, a jej budowa zbliżona jest do budowy serotoniny. Dzięki swojemu działaniu przeciwzapalnemu, przeciwbólowemu, znieczulającemu i przeciwbakteryjnemu zaliczana jest do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) i stosowana w tabletkach do ssania, kremach, żelach oraz płynach do irygacji, płukania jamy ustnej i gardła – w dużej mierze dostępnych bez recepty [31]. Chlorowodorek benzydminy (Benzydaminum hydrochloridum) skutecznie wchłania się przez skórę oraz błony śluzowe, dlatego wykorzystywany jest przede wszystkim w preparatach działających zewnątrznie. Przy stosowaniu miejscowym benzydamina w niewielkim stopniu przedostaje się do krwi (maksymalnie 10%), jednak potęguje swoje działanie przy wchłonięciu drogą pokarmową. Rekomendowaną graniczną dawką jest 200 mg na dobę, natomiast przy dawkach ok. 500 mg lub wyższych wystąpić mogą działania niepożądane [28, 32].

Głównym celem rekreacyjnego zażywania benzydminy jest wywołanie halucynacji wzrokowo-słuchowych. Ponadto wystąpić może tzw. „Bruce Lee effect” czyli pojawiające się podczas poruszania gałkami ocznymi kolorowe promienie świetlne wywołujące wrażenie zwalniającego tempa i widzenia poklatkowego. Badani opisywali również wrażenie „przyciągania światła” i ukazywania się poświaty [32, 33].

Benzydamina przyjmowana drogą pokarmową poza wspomnianymi wcześniej działaniami może wywołać nudności, wymioty, ogólne osłabienie, halucynacje i bóle brzucha. Oprócz intensywnej stymulacji psychoruchowej, oderwania od rzeczywistości oraz halucynacji, spowodować może znaczące objawy wegetatywne zaburzeń

łękowych, ponadto konwulsje, przyspieszoną akcję serca i spadek siły skurczów mięśni szkieletowych [28, 33, 24]. Działanie przeciwzapalne chlorku benzydaminu jest związane ze zdolnością do selektywnego hamowania wytwarzania pozapalnych cytokin TNF- α (czynnik martwicy nowotworu) i IL-1 β (interleukiny) skutkując blokowaniem degradacji oraz agregacji fagocytów. Wpływa również blokująco na enzym fosfolipazę A2 (PLA2s), którego niedobór prowadzi do niewytwarzania prostaglandyny (PG – wpływającej m. in. na leukocyty) i leukotrienu (lipidy biorące udział w procesach zapalnych) [31].

Dokładny mechanizm wywoływania halucynacji przez benzydaminę nie jest jeszcze poznany. Omamy mogą być skutkiem intensyfikacji potencjałów, wzbudzanych przez bodźce świetlne w korze wzrokowej oraz równoczesnym wyciszaniu przesyłania impulsów wewnątrzkorowych. Według alternatywnej hipotezy powstawanie halucynacji wywołane jest upośledzeniem działania pnia mózgu w wyniku czego dochodzi do braku kontroli nad docierającymi bodźcami. Benzydamina podobnie jak jedna z najaktywniejszych psychodelicznych substancji psychoaktywnych jaką jest dietyloamid kwasu D-lizergowego (LSD) posiada grupę indolową. Prawdopodobnie z tego względu również może być agonistą receptorów serotoninowych 5-HT_{2A} przejściowo zaniżając poziom serotoniny, a następnie prowadząc do jej hiperprodukcji w wyniku sprzężenia zwrotnego [31, 33].

Istnieją sprzeczne dane odnoszące się do usuwania benzydaminu z organizmu. Niektóre źródła podają, że od 50 do nawet 65% preparatu jest usuwane z moczem w niezmięnionej postaci. Wysoka rozpuszczalność związku w lipidach wskazuje jednak, iż bardziej prawdopodobne jest, że jedynie 5% benzydaminu nie podlega żadnym procesom metabolicznym. Benzydamina jest przekształcana na drodze dealkilacji, hydroksylacji oraz N-oksydacji [35].

Od pewnego czasu rozwija się zainteresowanie benzydaminą jako środkiem odurzającym. Największą popularnością cieszy się niedrogi Tantum Rosa (preparat do irygacji pochwy) zawierający najwyższą dawkę benzydaminu spośród dostępnych leków bez recepty [1, 26]. Inne preparaty OTC zawierające benzydaminę to Hascosept, Septolux, Tantum Verde i Uniben.

Tantum Rosa używany w celu wywołania omamów i euforii może być przyjmowany na kilka różnych sposobów. Najprostszą metodą jest rozpuszczenie proszku w szklance ciepłej wody. Niemniej jednak wypicie roztworu nie jest łatwe z powodu nieprzyjemnego smaku oraz możliwości wywołania wymiotów, stąd też metoda ta jest rzadko wykorzystywana w praktyce [28, 34]. Wiele for internetowych oferuje jednak informacje pozwalające tanim kosztem i w domowym zaciszu wyizolować czystą benzydaminę [36].

Jednym z powodów, zażywania benzydaminu, oprócz wywoływania omamów, jest fakt, iż nie jest ona wykrywalna standardowymi badaniami krwi. Dlatego nie jest do końca znana skala stosowania „benzy” wśród społeczeństwa, ale statystyka zgłoszonych zatruć wskazuje na rosnące zainteresowanie tą substancją przy jednoczesnym braku dostatecznej ilości informacji na temat właściwości uzależniających. [34, 37].

Internauci zażywający benzydaminę w celach rekreacyjnych opisują doznania występujące bezpośrednio po spożyciu, jednak często pomijają negatywne skutki towarzyszące fazie zejścia. Ustępowaniu działania halucynogennego towarzyszy złe samopoczucie, drażliwość, ogólne wycieńczenie, drżenie rąk oraz bezsenność. Stan ten może się utrzymywać nawet ok. 48 h. Występować mogą również silne zawroty głowy, brak łaknienia i ból brzucha, wysypka, rumień, światłowstręt, skurcze oskrzeli oraz niewydolność nerek. Efekty uboczne mogą utrzymywać się przez dłuższy czas po zażyciu w postaci powidoków i przywidzeń (flashback) utrzymujących się miesiącami, najczęściej pojawiających się po zadziałaniu bodźców świetlnych w ciemnym otoczeniu [33, 34].

5. Pseudoefedryna

Pseudoefedryna jest analogiem efedryny wywodzącej się z grupy psychostymulujących związków amfetaminopodobnych [38, 39].

Pseudoefedryna stymuluje obkurczanie się błon śluzowych nosa oraz zatok przynosowych zapobiegając przekrwieniom. Ze względu na słabsze działanie aniżeli amfetamina i efedryna, wykorzystywana jest jako środek pobudzający. Często występuje też w połączeniu z substancjami o działaniu antyhistaminowym i przeciwbólowym [6].

Pseudoefedryna stosowana jest zazwyczaj w formie siarczanu (*Pseudoephedrini sulfas*) lub chlorowodoru (*Pseudoephedrini hydrochloridum*). W preparatach leczniczych przeważnie występuje zmieszana razem z paracetamolem, ibuprofenem, cetyryzyną, dekstrometorfanem lub kwasem acetylosalicylowym. Standardową zalecaną maksymalną dawką jest 240 mg/dobę. Działanie preparatu można zauważyć już po około 15-30 minutach, a efekt utrzymuje się przeważnie od 3 do 4 h. Doustna dawka śmiertelna (LD_{50}) pseudoefedryny dla szczura wynosi około 660 mg/kg, natomiast dla człowieka szacuje się ją na 6-7 g [1, 28].

Pseudoefedryna wykazuje zbliżone, jednakże słabsze działanie niż efedryna. Powoduje obkurczanie naczyń krwionośnych oraz przyspiesza akcje serca, wywołując wzrost ciśnienia tętniczego krwi. Stosuje się ją głównie do neutralizacji skutków stanów zapalnych górnych dróg oddechowych i oskrzeli. Związek ten osłabia obrzęk, kaszel, przekrwienia i produkcję wydzielin [38, 40, 41]. Przenikając przez barierę krew-mózg, pseudoefedryna oddziałuje również na obwodowy i ośrodkowy układ nerwowy wywołując efekt delikatnego pobudzenia, podwyższonego poziomu motywacji tudzież poprawy nastroju. Wykazuje także zdolność wywoływania długo utrzymujących się halucynacji [38, 40, 41].

Pseudoefedryna jako sympatykotonik wykazuje działanie zbieżne z adrenaliną wypierając noradrenalinę z komórki do synaps, po czym wywiera nieselektywny wpływ na występujące na błonach komórkowych receptory α -adrenergiczne (występujące w sercu i naczyniach krwionośnych – wzmagając skurcze) oraz β -adrenergiczne (w mięśniu sercowym, mięśniach gładkich i komórkach tkanki tłuszczowej) [38, 41].

Uwalniając aminy katecholowe pseudoefedryna wywiera również wpływ na autonomiczną część układu nerwowego mobilizując ustrój do działania (reakcja „walcz bądź uciekaj”). Przejawia się to przyspieszeniem akcji serca i oddechu, podniesieniem poziomu glukozy we krwi, wzmożoną potliwością, podniesieniem temperatury organizmu oraz poczuciem niepokoju [38, 41]. Wprowadzona do organizmu pseudoefedryna jest niemal natychmiastowo wchłaniana z przewodu pokarmowego. Po rozprzestrzenieniu się wraz z krwią po całym organizmie związek ten ulega niecałkowitemu rozkładowi w wątrobie w reakcji N-demetylacji do norpseudoefedryny za pomocą enzymów mikrosomalnych. Pozostała dawka (55-96%) zostaje wydalona wraz z moczem w niezmienionej formie w ciągu 24-48 h [42]. Szczególnie popularnymi lekami zawierającymi pseudoefedrynę, wykorzystywanymi w celach pozamedycznych są m.in. Acatar Acti Tabs, Acatar ZatokiCirus, Gripex, , Ibuprom Zatoki, Metafen Zatoki, Sudafed [1, 26, 37].

Pozyskanie jak i przygotowanie pseudoefedryny jest stosunkowo łatwe, a informacje na ten temat można znaleźć na wielu stronach internetowych. Najprostszą opisaną metodą wywołania odurzenia jest połknięcie tabletek Sudafedu. Wiąże się to jednak z możliwością wystąpienia skutków ubocznych. Co więcej tak zażyta pseudoefedryna działa stosunkowo słabo i rozłożone w czasie przez powolne wchłanianie specyfiku z jelit [37]. W celu uzyskania silniejszego efektu odurzającego, pseudoefedrynę można pozyskać z leków OTC przy pomocy prostych metod. W wyniku prawidłowego wykonania izolacji pseudoefedryny uzyskuje się jej formę krystaliczną, którą można przyjąć donosową lub po uprzednim rozpuszczeniu – poprzez iniekcję dożylną [6].

W celu uzyskania jeszcze mocniejszych efektów działania, pseudoefedrynę nierzadko stosuje się jako substrat w reakcji syntezy silniej działających związków chemicznych - metylokatononu) lub metaamfetaminy. Do uzyskania pierwszego związku nie jest potrzebna żadna wiedza i wystarczą ogólnodostępne w sklepach odczynniki. Produkcja metaamfetaminy jest natomiast o wiele bardziej złożona i wymaga większej wiedzy z zakresu chemii oraz posiadania fachowego sprzętu i odczynników [43].

Stosowanie pseudoefedryny w dawkach terapeutycznych może wywołać wiele niepożądanych efektów, takich jak m.in.: zaburzenia w działaniu układu pokarmowego, nudności i wymioty, bóle i zawroty głowy, zaniepokojenie, lęk, drżenie mięśni oraz rąk, dezorientacja i omamy, bezsenność, uczucie pragnienia, arytmia serca, tachykardia, nietrzymanie moczu. Ponadto prawdopodobnie przyczynia się do wystąpienia incydentów mózgowo-naczyniowych oraz zawału serca. Aplikowanie zalecanych w ulotce dawek pseudoefedryny może niekiedy prowadzić do tzw. halucynacji dotykowych w których pacjent odczuwa drążące pod skórą owady [6, 28].

W przypadku przedawkowania pseudoefedryny poza wymienionymi wcześniej objawami zaobserwować można również m.in. nadmierne pobudzenie, drgawki, drażliwość, psychozę, trudności, gorączkę zaburzenia krążenia, a nawet śpiączkę. Pseudoefedryna może wywołać też tzw. powidoki. Posiada też duży potencjał uzależniający wzbudzając głód psychiczny. Przy długofalowym stosowaniu często

dochodzi do adaptacji sensorycznej (desensytyzacja) i potrzeby zwiększania Przyjmowanych dawek. Odstawienie narkotyku wywołuje zwykle zespół abstynencyjny w postaci braku koncentracji, drażliwości, zmęczenia i senności, a niekiedy omamów wzrokowych [6, 28, 40].

6. Dimenhydrynat i Difenhydramina

Difenhydramina i dimenhydrynat są związkami chemicznymi pochodzącymi od aminoetanolu i są składnikiem leków przeciwdziałających chorobie lokomocyjnej oraz alergiom. Dimenhydrynat powstaje w wyniku reakcji difenhydraminy w proporcji 1:1 z 8-chloroteofiliną [15]. Difenhydramina stosowana jest w lekach przeważnie w formie chlorowodoru i przyjmowana doustnie. Doustna dawka śmiertelna (LD50) dla szczura wynosi 500 mg/kg m.c. U dzieci obserwowano zatrucie difenhydraminą przy dawkach większych niż 7,5 mg/kg m.c., natomiast u dorosłych ostre zatrucie powodowało spożycie minimum 1 g substancji czynnej [4, 44, 45].

Podstawową różnicą w działaniu dimenhydrynatu w porównaniu z difenhydraminą jest o prawie połowę mniejsza siła działania na organizm spowodowana obecnością anionu 8-chloroteofilinowego. Obydwa związki wykazują jednak podobne czasy działania. Maksymalna dawka dzienna dimenhydrynatu nie powinna przekraczać 400 mg, przy czym jednorazowe zażycie powyżej 300 mg może wywołać halucynacje [1, 45].

Pochodne aminoetanolu mają działanie przeciwwymiotne oraz hamują nudności i zawroty głowy wynikających z choroby lokomocyjnej. Ponadto difenhydramina stosowana jest przy miejscowych znieczuleniach jak i w leczeniu bezsenności, przeziębień, objawów alergicznych i pozapiramidowych. W celu hamowania działania nasennego difenhydraminy łączona jest z 8-chloroteofiliną o działaniu pokrewnym do kofeiny i teobrominy [46].

Obydwa związki stosowane w dawkach przekraczających zalecane wykazują mogą wykazywać działanie psychoaktywne. Kilku lub kilkunastokrotnie większe dawki leku (Aviomarin) mogą wywołać omamy wzrokowe, słuchowe oraz węchowe, nielogiczne zachowanie i majaczenie utrzymujące się od 8 do 12 h [2, 12].

Difenhydramina jest konkurencyjnym antagonistą receptorów H1 i jako lek przeciwhistaminowy pierwszej generacji zmniejsza nasilenie objawów kinezot i alergii. Ponadto difenhydramina może oddziaływać na receptory muskarynowe, serotoninowe, dopaminowe, norepinefrynowe oraz system opioidowy [45]. Przenikając barierę krew-mózg działa na ośrodkowy układ nerwowy wpływając na receptory serotoninowe 5-HT. Blokując wychwytywanie serotoniny działa antydepresyjnie powodując uspokojenie i senność. Jako lek antyhistaminowy wpływa również na receptory muskarynowe wywołując zaburzenia umysłowe, halucynacje i amnezje [45].

Difenhydramina przyjęta doustnie jest w dużej mierze metabolizowana w wątrobie przez cytochrom P450 oraz CY2D6 ulegając przemianie w reakcji N-demetylacji do N-demetylodifenhydraminy, a następnie do N,N-didemetylodifenhydraminy. N,N-didemetylodifenhydramina jest z kolei przekształcana do kwasu difenylometoksy-octowego lub w mniejszym stopniu do N-acetylo-N-demetylodifenhydraminy, które to

mogą ulegać reakcjom sprzęgania. Reszta niezmetabolizowanej difenhydraminy oraz jej metabolity zostają wydalone razem z moczem [47].

Obecnie na rynku jest niewiele środków dostępnych bez recepty zawierających w swoim składzie difenhydraminę lub dimenhydrynat. Najpowszechniejszym preparatem, wcześniej sprzedawanym również na stacjach benzynowych, jest Aviomarin. Inne preparaty to Apap Noc, Betadrin WZF i Comarol [26].

Przeglądając strony internetowe natknąć można się na bardzo dokładne wytyczne dotyczące sposobu zażywania Aviomarinu. Odurzenie występujące po pozamedycznym zażyciu preparatu przypomina marzenie senne i trwa zazwyczaj od 8 do 12 h, po czym następuje długi 24 godzinny sen. Działanie leku może zostać wzmocnione przy pomocy alkoholu [2, 37].

Po zażyciu zalecanej dawki mogą wystąpić liczne skutki uboczne takie jak zawroty głowy, brak koncentracji oraz senność, dlatego w trakcie działania leku nie powinno się prowadzić pojazdów. Ponadto mogą wystąpić zaburzenia widzenia, narastający niepokój, osłabienie, zmęczenie, nudności, biegunka lub zaparcia, bóle brzucha i wymioty (u osób uczulonych na difenhydraminę lub dimenhydraminę). Wystąpić może również światłowstręt, nieregularne oddychanie i krótkotrwała utrata pamięci [37, 48].

Przy stosowaniu pozamedycznym występujące halucynacje mogą wywołać nieprzyjemne doznania takie jak lęki i psychozy oraz pojawić się mogą silne zawroty i bóle głowy, nudności, wymioty, majaczenie, dzwonienie w uszach. U osób zażywających Aviomarin regularnie zaobserwowano syndrom amotywacyjny i stany depresyjne pomimo niskiego potencjału uzależniającego dimenhydrynatu. Ostre zatrucie może prowadzić do śmierci w ciągu 2-18 h w wyniku zapaści sercowo-naczyniowej [37, 44].

Podsumowując, preparaty OTC ze względu na swoją ogólnodostępność i niski koszt cieszą się dużym zainteresowaniem. Co więcej możliwość ich zakupu bez recepty, jak również łatwy dostęp do informacji dotyczących przygotowania medykamentów do pozamedycznego zastosowania, wzmaga w potencjalnych użytkownikach mylne przekonanie, że w przeciwieństwie do powszechnie znanych narkotyków są one bezpieczne. Jak jednak wynika z wyżej przedstawionych faktów, leki OTC mogą negatywnie oddziaływać na organizm już w dawkach terapeutycznych, a w wyższych mogą być nawet śmiertelne w skutkach.

Literatura

1. Czekaj T., Ciszewski M., Redliński A.: *Narastające zagrożenie wynikające ze stosowania wybranych preparatów OTC w celach odurzających*, FARMACJA POLSKA 71 (2015) s. 179-184.
2. Potocka-Banaś B., Majdanik S., Korwin-Piotrowska K., Dembińska T., Janus T., Borowiak K.: *Nadużywanie popularnych leków dostępnych bez recepty nowym trendem wśród młodzieży*, Annales academiae medicae stetinensis roczniki pomorskiej akademii medycznej w szczecinie, 59 (2013) s. 114–119.
3. Seńczuk W.: *Toksykologia współczesna* Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa, (2005) s. 315-316.

4. Janiec W., Krupińska J.: *Farmakodynamika* Podręcznik dla studentów farmacji wydanie 5. Wydawnictwo lekarskie PZWL (2005) s. 224-230, s. 551-553.
5. Tobin C., Dobbin M., McAvoy B.: *Regulatory responses to over-the-counter codeine analgesic misuse in Australia, New Zealand and the United Kingdom* *Australian and New Zealand journal of public health* 37 (2013) s. 483-488.
6. Królik E., Palacz J., Wiela-Hojeńska A., Piwowar A.: *Toksyczność wybranych leków dostępnych bez recepty* *Farmacja współczesna*, 7 (2014) s. 197-203.
7. Takahama K., Shirasaki T.: *Central and peripheral mechanisms of narcotic antitussives: codeine-sensitive and -resistant coughs* *Cough*, 3 (2007) s. 1-8.
8. Chen Z., Somogyi A., Reynolds G., Bochner F.: *Disposition and metabolism of codeine after single and chronic doses in one poor and seven extensive metabolisers*, *Adonis* 31 (1991) s. 381-390.
9. Gasche Y., Daali Y., Fathi M., Chiappe A., Cottini S., Dayer P., Desmeules J.: *Codeine Intoxication Associated with Ultrarapid CYP2D6 Metabolism*, *The New England Journal of Medicine*, 351 (2004) s. 2827-2831.
10. <http://nietrzezwa.blog.onet.pl/2010/04/24/koda-przygotowanie-i-zazywanie/> (15.02.2016).
11. <http://pokazywarka.pl/antek/> (15.02.2016).
12. Pisarska A.: *Doświadczenia i opinie młodzieży o lekach dostępnych bez recepty*, *Serwis informacyjny Narkomania*, 4 (2008) s. 35-40.
13. Pasek M.: *Narkotyki przy tablicy* Warszawa: Toret, (2000) s. 74
14. Bem J., Peck R.: *Dextromethorphan - An Overview of Safety Issues*, *Drug Safety*, 7 (1992) s. 190-199.
15. O'Neil, M.J. (ed.): *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry (2013).
16. Mutschler, J., Koopmann A., Grosshans, M., Hermann, D., Mann, K., Kiefer F.: *Dextromethorphan withdrawal and dependence syndrome*, *Deutsches Arzteblatt*, 107 (2010) s. 537-540.
17. Romanelli F., Smith K.M.: *Dextromethorphan abuse: clinical effects and management*, *Pharmacy Today*, 15 (2009) s. 48-55.
18. Logan B.K., Goldfogel G., Hamilton R., Kuhlman J.: *Five deaths resulting from abuse of dextromethorphan sold over the internet* *Journal Toxicol.*, 33 (2009) s. 99-103.
19. Manaboriboon B., Chomchai C.: *Dextromethorphan abuse in Thai adolescents: A report of two cases and review of literature*, *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88 (2005) s. 242-245.
20. Reissig C., Carter L., Johnson M., Mintzer M., Klinedinst M., Griffiths R.: *High doses of dextromethorphan, an NMDA antagonist, produce effects similar to classic hallucinogens*, *Psychopharmacology*, 223 (2012) s. 1-15.
21. Banken J.A., Foster H.: *Dextromethorphan*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139 (2008) s. 402-411.
22. Logan B.K., Yeakel J.K., Goldfogel G., Frost M.P., Sandstrom G., Wickham D.J.: *Dextromethorphan abuse leading to assault, suicide, or homicide* *Journal of Forensic Sciences*, 57 (2012) s. 1388-1394.
23. Miller S.C.: *Dextromethorphan psychosis, dependence and physical withdrawal*, *Addiction Biology*, 10 (2005) s. 325-327.
24. Chlebeda E., Szumny D., Magdalan J., Szeląg A.: *Dekstrometorfan – charakterystyka leku*, *Farmacja Polska*, 65 (2009) s. 100-108.

25. Nguyen L., Thomas K.L., Lucke-Wold B.P., Cavendish J.Z., Crowe M.S., Matsumoto, R.R.: *Dextromethorphan: An update on its utility for neurological and neuropsychiatric disorders*, Pharmacology and Therapeutics, (2016).
26. <https://www.doz.pl/leki> (15.02.2016).
27. Hendrickson R.G., Cloutier R.L.: *Crystal dex: free-base dextromethorphan*, Journal of Emergency Medicine, 32 (2007) s. 393–396.
28. Piątek A., Koziarska-Rościszewska M., Zawilska J. B.: *Rekreacyjne używanie leków dostępnych w odręcznej sprzedaży: odurzenie i doping mózgu*, Alcoholism and Drug Addiction, 28 (2015) s. 65-77.
29. Łukasik-Głębocka M., Sommerfeld K.: *Ostre zatrucia dekstrometorfanem w materiale Oddziału Toksykologii i Chorób Wewnętrznych w Poznaniu*, Przegląd Lekarski, 66 (2009) s. 853–856.
30. Cranston J.W., Yoast R.: *Abuse of dextromethorphan*, Archives of Family Medicine, 8 (1999) s. 99–100.
31. Sein Anand J., Głębocka-Łukasik M., Korolkiewicz R.P.: *Recreational abuse with benzydamine hydrochloriden (Tantum Rosa)*, Clinical Toxicology 45 (2007) s. 198–199.
32. Owsianik D., Mach-Lichota E., Wojtaszek M.: *Problemy związane z nadużyciem substancji odurzających wśród młodzieży : opis przypadku zatrucia benzydaminą*, Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, 12 (2014) s. 381–387.
33. Mota D.M., da Costa A.A., dos Santos Teixeira C., Bastos A.A., Dias M.F.: *Usi abusivo de benzidamina no Brasil: uma abordagem em farmacovigilância*, Cien cia & Saúde Colectiv, 15 (2010) s. 717–724.
34. Barwina M., Habrat B., Sein Anrad J.: *Nadużywanie benzydminy*, Alkohol i narkotyki, 27 (2014) s. 77-87.
35. Quane P. A., Graham G. G., Ziegler J. B.: *Pharmacology of benzydamine*, InflammoPharmacology, 6 (1998) s. 95-107.
36. http://psychotrooperskm.blogspot.com/2006/04/tantum-rosa-proces-ekstrak_114494849940027140.html (15.02.2016).
37. Motyka M., Marcinkowski J. T.: *Nowe metody odurzania się. Cz. I. Leki dostępne bez recepty wykorzystywane w celach narkotycznych*, Probl Hig Epidemiol, 95 (2014) s. 504-511.
38. Zuba D.: *Medicines containing Ephedrine and Pseudoephedrine as a source of Methcathinone*, Problems Forensic Sciences, 71 (2007) s. 323-333.
39. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7028#section=Entrez-Crosslinks> (15.02.2016).
40. Webb J., Dubose J.: *Symptoms of major depression after pseudoephedrine withdrawal: A case report*, Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences, 25 (2013) s. E54–E55.
41. Rusyniak D.E.: *Neurologic manifestations of chronic methamphetamine abuse*, Neurologic Clinics, 29 (2011) s. 641–655.
42. McEvoy, G.K. (ed.): *American Hospital Formulary Service*. AHFS Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, (2007), MD 1356.
43. Safjański M., Gołębiowski J.: *Przestępczość narkotykowa – przestępczość narkotykowa – produkcja narkotyków z leków zawierających pseudoefedrynę*, Kwartalnik Prawno-Kryminalny, 3 (2011) s. 53-56.
44. Brunton L., Chabner B., Knollman B.: *Goodman and Gillman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*, McGraw Hill Medical, (2011) s. 920.

45. Halpert A.G., Olmstead M.C., Beninger R.J.: *Mechanisms and abuse liability of the anti-histamine dimenhydrinate*, Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 26 (2002) s. 61-67.
46. Zejc A., Gorczyca M.: *Chemia leków*. Podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów, Wydanie III uaktualnione i rozszerzone. Wydawnictwo lekarskie PZWL, 324 (2008) s. 511.
47. Akutsu T., Kobayashi K., Sakurada K., Ikegaya H., Furihata T., Chiba K.: *Identification of human cytochrome p450 isozymes involved in diphenhydramine N-demethylation*, Drug Metab Dispos. 35 (2007) s. 72-78.
48. <http://www.drugs.com/sfx/diphenhydramine-side-effects.html> (15.02.2016).

Toksyczność preparatów farmakologicznych – dostępnych bez recepty

Streszczenie

Na rynku istnieje grupa leków dostępnych bez recepty zawierających w swym składzie substancje psychoaktywne. Ich odpowiednie zażycie może więc wywoływać stany odurzenia, podobne jak po zażyciu narkotyków. Najbardziej popularne leki dostępne bez recepty stosowane w celach narkotycznych posiadają w swoim składzie substancje takie jak kodeina, pseudoefedryna, benzydamina, dimenhydrinat, difenhydramina czy dekstrometorfan.

Preparaty OTC ze względu na swoją ogólnodostępność i niski koszt cieszą się dużym zainteresowaniem. Co więcej możliwość ich zakupu bez recepty, jak również łatwy dostęp do informacji dotyczących przygotowania medykamentów do pozamedycznego zastosowania, wzmacnia w potencjalnych użytkownikach mylne przekonanie, że w przeciwieństwie do powszechnie znanych narkotyków są one bezpieczne. Stąd też celem pracy było przedstawienie właściwości wybranych substancji czynnych leków OTC, ich oddziaływania na organizm oraz niebezpieczeństwa wynikającego z ich niewłaściwego stosowania.

Słowa kluczowe: OTC, kodeina, dekstrometorfan, pseudoefedryna, benzydamina

Toxicity of over-the-counter medicines

There are over-the-counter medicines in the market, which contain the psychoactive substances. Their proper usage may cause a state of intoxication, similar like after taking the drugs. The most popular OTC medicines used as a narcotic, include an active substances such as codeine, pseudoephedrine, benzydamine, dimenhydrinate, diphenhydramine and dextromethorphan.

Due to their public availability and low cost, OTC medicines are very popular. What is more, the ability to buy OTC medicines in every shop without a prescription and easy access to information about their preparation for non-medical use cause that potential users are convince that OTC drugs are safer than drugs. Therefore, the aim of the study was to present the properties of selected active substances of OTC medicines, their effects on the organism and the dangers which may cause incorrect usage of them.

Keywords: OTC, codeine, dextromethorphan, pseudoephedrine, benzydamine.

Wielokierunkowe działanie surwiwiny w komórkach ludzkich

1. Wprowadzenie

Surwiwina to białko III klasy rodziny inhibitorów apoptozy – IAPs (ang. *inhibitors of apoptosis proteins*). Rodzina inhibitorów apoptozy IAP to 8 białek posiadających zdolność regulowania oraz hamowania apoptozy, między innymi poprzez zdolność do wiązania kaspaz. Na podstawie budowy IAPs podzielono na 3 klasy. Do klasy pierwszej należą: cIAP1, cIAP2, XIAP, liwina oraz ILP2, do klasy drugiej zalicza się NAIP, natomiast klasa trzecia to surwiwina oraz Apollon [1].

2. Struktura surwiwiny

Surwiwina kodowana jest przez gen *BIRC5* (ang. *Baculoviral IAP Repeat Containing 5*), znajdujący się na ramieniu długim chromosomu 17 (17q25.3). Jej długość wynosi 142 aminokwasy, a masa cząsteczkowa 16,5 kDa. Obecnie wyróżnia się 5 izoform transkryptu genu surwiwiny, kodujących białka o zróżnicowanej aktywności i lokalizacji, którymi są: surwiwina, surwiwina 2A, surwiwina 2B, surwiwina ΔEx3 i surwiwina 3B [2, 3]. Obecność każdej z izoform została potwierdzona u człowieka i myszy, a za występującą w największej ilości uznano surwiwinę [4, 5].

Surwiwina zawiera jedną domenę BIR (ang. *baculovirus IAP repeat*) na N-końcu, której obecność warunkuje właściwości antyapoptotyczne białek IAP [2, 6]. Należy zauważyć, że na C-końcu surwiwiny występuje motyw α -helikalny prawdopodobnie zaangażowany w regulację podziału komórkowego oraz mający zdolność oddziaływania z mikrotubulami. Usunięcie motywu α -helikalnego uniemożliwia umiejscowienie surwiwiny w obszarze mikrotubul [7, 8, 9].

Unikalną cechą surwiwiny, jako białka z rodziny IAP, jest zdolność tworzenia homodimerów w roztworze [10]. Surwiwina posiada kilka potencjalnych miejsc fosforylacji. Białko to może być fosforylowane między innymi przez CDK1 na Thr³⁴ (ważne miejsce fosforylacji z uwagi na możliwość zmiany aktywności domeny BIR surwiwiny), kinazę Aurora B na Thr¹¹⁷, kinazę kazeinową II na Thr⁴⁸ i Thr⁹⁷, kinazę PLK1 na Ser²⁰, kinazę białkową C oraz kinazę białkową A na Ser⁸⁰ [11, 12].

¹ ankat93@poczta.fm, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Katedry Genetyki Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

² magdalena.p193@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Katedry Genetyki Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

³ pgil.poczt@vp.pl, Zakład Genetyki Klinicznej Katedry Genetyki Medycznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

3. Lokalizacja i ekspresja

W dojrzałych i zdrowych tkankach ekspresję surwiwiny wykazują jedynie komórki o wysokim potencjale proliferacyjnym, między innymi komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego, tymocyty, komórki śródbłonka naczyń, limfocyty T, komórki wątroby czy endometrium. Dojrzałe nieproliferujące komórki praktycznie nie wykazują ekspresji surwiwiny lub ekspresja ta obserwowana jest na bardzo niskim poziomie. Wysoka ekspresja surwiwiny obserwowana jest w zarodkowych i płodowych komórkach macierzystych oraz hematopoetycznych komórkach macierzystych [13, 14]. Lokalizacja w komórce jest różna dla każdej z izoform. W jądrze występuje surwiwina Δ Ex3, natomiast w cytoplazmie surwiwina 2B [2]. Taka lokalizacja izoformy 2B jest charakterystyczna dla tkanek płodowych i po urodzeniu zanika, z wyjątkiem keratynocytów oraz komórek endometrium będących w fazie wydzielniczej [15, 16]. Na lokalizację surwiwiny w komórce ma wpływ także faza cyklu komórkowego. Między podziałami komórkowymi surwiwina lokalizuje się w cytoplazmie, natomiast podczas podziałów mitotycznych, surwiwina przechodzi do jądra komórkowego. Następnie wiąże się z organellami aparatu mitotycznego. Zmiana lokalizacji z cytoplazmy do jądra komórkowego, jest obserwowana również w początkowej fazie apoptozy [4, 15].

Podwyższona ekspresja surwiwiny jest charakterystyczna dla komórek nowotworowych. Komórki neuroblastomy, raka nerki i żołądka cechuje podwyższona ekspresja surwiwiny 2B [17]. W ostrej białaczce limfoblastycznej oraz mięsakach tkanek miękkich komórki wykazują nadekspresję surwiwiny Δ Ex3 [18]. Poziom ekspresji surwiwiny w nowotworach wiąże się ze stopniem zaawansowania choroby i rokowaniem [19]. Wykazano także, że ekspresja surwiwiny może być indukowana stanem zapalnym, niedotlenieniem czy też paleniem tytoniu [20].

4. Rola surwiwiny w regulacji mitozy i cyklu komórkowego

Ilość surwiwiny w komórce jest zależna od fazy cyklu komórkowego. Surwiwina przyspiesza przejście komórki do fazy S, zapobiegając zatrzymaniu w fazie G1, dlatego w punkcie G1/S obserwowana jest jej zwiększona ekspresja. Podobnie, wzrost ekspresji surwiwiny w punkcie G2/M towarzyszy przejściu do fazy M [14, 15].

Podczas mitozy zmienia się lokalizacja surwiwiny w aparacie mitotycznym. W czasie profazy surwiwina przyłącza się do centromeru, a w metafazie jako element kinetochoru odpowiada za przyłączanie chromosomów do wrzeciona kariokinetycznego. Następnie w anafazie przemieszcza się do środkowej płaszczyzny wrzeciona kariokinetycznego. Podczas cytokinezy surwiwina jest zlokalizowana w ciałku pośrednim. Po telofazie dochodzi do degradacji surwiwiny [8].

Według niektórych badaczy zmienna lokalizacja surwiwiny w czasie mitozy sugeruje, że surwiwina należy do grupy chromosomowych białek pasażerskich (ang. *chromosomal passenger proteins*), do których należą również: INCENP (ang. *innercentromere protein*), kinaza Aurora B i TD-60 [21]. Chromosomowe białka pasażerskie biorą udział w prawidłowym przebiegu kario- i cytokinezy [1]. Ich czynności są ze sobą powiązane: INCENP wiąże surwiwinę i kieruje ją do odpowiednich

struktur aparatu mitotycznego. Z kolei surwiwina wiążąc kinazę B, nasila fosforylację niektórych białek, w tym histonu H3. Aurora B wpływa na podziały komórek regulując segregację chromosomów i cytokinezę, jako enzymatyczny rdzeń kompleksu CPC (ang. *chromosomal passenger complex*) Aurora B kontroluje proces wiązania mikrotubul do kinetochorów [8]. Surwiwina jest niezbędnym elementem zarówno w formowaniu kompleksu CPC jaki i odpowiednim kierowaniu go do miejsca działania [14, 22, 23].

Badania nad embrionami myszy wykazały, że niedobór surwiwiny powoduje zaburzenia w tworzeniu mikrotubul i wrzeciona kariokinetycznego oraz zaburzenia w segregacji chromosomów. Przez niepełną, zaburzoną cytokinezę powstają komórki wielojądrzaste. Konsekwencją tych nieprawidłowości jest śmierć zarodków [4].

5. Rola surwiwiny w regulacji apoptozy

Surwiwina ma zdolność hamowania apoptozy w fazach G1/S i G2/M cyklu komórkowego [4]. W komórkach odpornych na apoptozę wykazano wzrost ekspresji surwiwiny, natomiast obniżonej ekspresji lub braku surwiwiny towarzyszy zwiększona podatność komórek na apoptozę oraz zaburzenia w jej przebiegu [2]. Działanie antyapoptotyczne surwiwiny jest związane z hamowaniem aktywności kaspaz na drodze bezpośredniej lub pośredniej. Zdolność hamowania apoptozy przez surwiwinę jest warunkowana obecnością domeny BIR [2, 6]. Struktura domeny BIR obecna w surwiwinie przypomina strukturę domeny BIR3 białka XIAP, która bezpośrednio wiąże kaspazę 9, pozbawiając ją w ten sposób możliwości utworzenia aktywnego homodimeru [21, 24]. Innym mechanizmem antyapoptotycznym surwiwiny jest hamowanie mitochondrialnego szlaku apoptozy. Surwiwina, która uległa fosforylacji w metafazie, w czasie mitozy może wiązać kaspazę 9 i uniemożliwić inicjację wewnętrznego szlaku apoptozy [8]. Poznany został również mechanizm pośredniego zahamowania mitochondrialnego szlaku apoptozy, w którym prokaspaza 9 zostaje związana przez kompleks surwiwina-XBXIP. XBXP (ang. *hepatitis B X-interaction protein*) występuje w tym połączeniu jako kofaktor [2, 25]. Inny mechanizm zakłada wiązanie przez surwiwinę białek, które wtórnie aktywują kaspazy – SMAC (ang. *secondary mitochondria-derived activator of caspase*, DIABLO) [2, 26].

Zdolność surwiwiny do bezpośredniego wiązania efektorowej kaspazy 3 jest spekulowana z powodu braku odpowiedniej struktury wiążącej. Strukturę taką stanowi region łącznikowy występujący między domenami BIR1 i BIR2, region taki występuje w białku XIAP [8].

6. Rola surwiwiny w uszkodzeniach tkanek

Szczególną rolę surwiwina odgrywa w uszkodzeniach naczyń krwionośnych – w ich stanach zapalnych czy miażdżycy [20, 27]. Wykazano między innymi zwiększoną ekspresję genu *BIRC5* w limfocytach krwi pacjentów z miażdżycą [28], a także u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi [20]. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF – ang. *fibroblast growth factor*) oraz czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF – ang. *vascular endothelial growth factor*) indukują

wzrost ekspresji mRNA i surwiwiny. Angiopoetyna-1 stabilizuje nowe sieci kapilar i zwiększa ekspresję mRNA i surwiwiny. Dlatego zwiększona ekspresja surwiwiny występuje w cytoplazmie komórek nowo powstających naczyń w ziarninującej skórze.

Wykazano również, że wzrost stężenia surwiwiny indukowany angiopoetyną-1 jest niezbędny do ochrony komórek śródbłonna przed apoptozą wywołaną przez cykloheksymid i czynnik martwicy guza TNF- α (ang. *tumor necrosis factor*), a zatem do utrzymania ich przy życiu [8].

7. Surwiwina a kancerogeneza

W komórkach człowieka o niskim potencjale proliferacyjnym ekspresja surwiwiny utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie. Ekspresja tego białka na wyższym poziomie występuje w komórkach wątroby, błony śluzowej przewodu pokarmowego, śródbłonna naczyniowym, limfocytach T, komórkach erytroidalnych i progenitorowych układu krwiotwórczego [12]. Fizjologicznie, podwyższona ekspresja surwiwiny pojawia się w życiu płodowym, gdzie bierze udział w proliferacji i apoptozie komórek. Na późniejszych etapach życia pojawia się w procesach nowotworowych [26].

Wysoką ekspresję surwiwiny odnotowano niemalże we wszystkich nowotworach. Są liczne doniesienia prezentujące nadekspresję surwiwiny między innymi w: raku przełyku, żołądka, trzustki, wątroby, jelita grubego, płuc, nerki, piersi, jajnika, macicy, pęcherza moczowego, prostaty, nieczerniakowego raka skóry, nowotworach głowy i szyi, nowotworach ośrodkowego układu nerwowego, sarkomie i innych [7, 29]. Ekspresja surwiwiny w nowotworach wiąże się z bardziej agresywnym fenotypem, co prowadzi do skrócenia czasu przeżycia i obniżonej odpowiedzi na chemioterapię [7, 30].

Przyczyną podwyższonej ekspresji surwiwiny w komórkach nowotworowych mogą być: demetylacja DNA eksonów, amplifikacja *locus* genu 17q25, podwyższona aktywność promotora genu, dodatnia regulacja ścieżek sygnałowych kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K – ang. *phosphatidylinositide 3-kinases*) oraz aktywowanych mitogenami kinaz białkowych (MAPK – ang. *mitogen-activated protein kinases*) [31].

Surwiwina poprzez działania takie jak: inaktywacja kaspaz, stymulacja angiogenezy, montaż wrzeciona kariokinetycznego, naprawa DNA, prowadzi do szybkiej proliferacji komórek nowotworowych, ich odporności na apoptozę, a także tworzenia przerzutów nowotworowych. [12, 32]. Wysoka ekspresja surwiwiny w komórkach nowotworowych powoduje odporność na obumieranie, promuje przeżycie tych komórek, usprawnia procesy proliferacji i migracji komórkowej.

Ekspresja surwiwiny regulowana jest również przez sygnałowe cząsteczki nowotworowe. Zwiększają ją białka takie jak: c-myc, STAT-3, a obniżają geny supresorowe (*PTEN*, *APC*, *p53*) [7, 12, 32]. Aktywność transkrypcyjna surwiwiny hamowana jest przez białko p53, które reguluje punkt kontrolny cyklu komórkowego oraz ma działanie proapoptotyczne. W momencie uszkodzenia DNA dochodzi do aktywacji wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego TP53-surwiwina, co skutkuje zmniejszeniem ekspresji surwiwiny, zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz uruchomieniem procesu apoptozy. Sugeruje się, że często występująca w komórkach

nowotworowych utrata funkcji genu *TP53* zaburza regulację transkrypcji genu surwiwiny i wywołuje odporność komórek na apoptozę [4].

7.1. Stymulacja angiogenezy

Surwiwina poprzez promocję angiogenezy w komórkach nowotworowych pośredniczy w progresji nowotworu. Surwiwina zwiększa ekspresję czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) oraz promuje proliferację komórek śródbłonka (ECs – ang. *endothelial cells*) poprzez mechanizmy, których do tej pory dokładnie nie udało się poznać. Zwiększona ekspresja surwiwiny chroni komórki śródbłonka przed apoptozą w dwóch fazach: w fazie proliferacyjnej angiogenezy oraz w procesie przebudowy dojrzałych naczyń, który kontrolowany jest przez angiopoetynę 1 (czynnik proangiogeny) [33].

7.2. Naprawa DNA

Surwiwina odgrywa także istotną rolę w apoptozie niezależnej od kaspaz. Dla tego procesu charakterystyczne jest przemieszczenie czynnika indukującego apoptozę, z cytoplazmy komórek nowotworowych do ich jądra, co zwiększa zawartość białka Ku70, które wykrywa uszkodzenia nici DNA, specyficznie dla mechanizmu NHEJ – ang. *non-homologous end joining* (naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców), przez co wzmacnia naprawę dwuniciowych pęknięć DNA. Im wyższe stężenie surwiwiny tym mniejsze szanse na przemieszczenie i naprawę nici DNA [12].

8. Terapia przeciwnowotworowa

Przyczyną odporności na leczenie chemioterapeutykami może być wysoka ekspresja surwiwiny w komórkach nowotworowych. Zatem zablokowanie jej działania może pozytywnie wpłynąć na skuteczność konwencjonalnej chemioterapii. Białko to również zmniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie radiacyjne [32].

W związku z powyższym surwiwina może być celem leczenia przeciwnowotworowego. Obniżenie jej ekspresji może hamować proces nowotworowy, poprzez promowanie apoptozy komórek guza, a także przez blokowanie angiogenezy. W procesie tworzenia naczyń ograniczenie ekspresji białka surwiwiny znosi ochronne działanie VEGF, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórek śródbłonka. Obniżenie stężenia surwiwiny powoduje zanik nowo powstałych sieci naczyń krwionośnych, co z kolei pośrednio hamuje rozrost nowotworu [33]. Tak więc surwiwina przez wielu uważana jest znakomity cel terapii przeciwnowotworowej. Obecnie testuje się kilka różnych strategii terapeutycznych między innymi takich jak wyciszanie genu surwiwiny, immunoterapia czy stosowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów surwiwiny [7].

8.1. Strategia antysensowa

Ekspresję genu surwiwiny można zablokować przy użyciu antysensowych oligonukleotydów. Są to krótkie (13-20 zasad nukleotydowych) sekwencje jednoniciowego RNA lub DNA, które na zasadzie komplementarności do badanej sekwencji kwasu nukleotydowego, stosowane są w procesie hybrydyzacji antysensowej. Strategia antysensowa opiera się na tym, że sekwencje nukleotydowe występują w ludzkim genomie tylko raz, zatem teoretycznie eliminuje to możliwość błędu. Powstały w ten sposób dupleks RNA/DNA bardzo utrudnia proces transkrypcji, a następnie translacji, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia ekspresji genu oraz ograniczenia ilości powstającego białka [12].

8.2. Strategia tripleksu

Strategia ta opiera się na tworzeniu trójniciowych połączeń pomiędzy dwuniciową helisą DNA, a syntetycznymi oligonukleotydami. Prowadzi to do blokowania transkrypcji surwiwiny, co powoduje hamowanie jej ekspresji, a w konsekwencji prowadzi do obniżenia jej stężenia w komórkach [4].

8.3. Małe interferujące RNA

RNAi (interferencja RNA) jest techniką najbardziej skuteczną, ze względu na dostępność w komórce enzymów do obróbki RNA. siRNA w komórce, na końcu 3' obu nici, posiada charakterystyczny, wystający dwunukleotydowy odcinek, który służy do wyciszania genu po transkrypcji. Tworzy on rybonukleinoproteinowy kompleks RISC (ang. *RNA – induced silencing complex*), w którym najpierw dochodzi do rozwinięcia siRNA – nić sensowna się odłącza i pozostaje jedynie nić antysensowna. Później kompleks skanuje mRNA znajdujące się w komórce, aby znaleźć sekwencję komplementarną do nici antysensownej. Po jej odnalezieniu łączy się z nią, co prowadzi do przecięcia cząsteczki mRNA w połowie fragmentu komplementarnego do siRNA. Taki niekompletny mRNA, po rozpoznaniu jest degradowany, co wycisza ekspresję genu [12, 32].

8.4. Drobnocząsteczkowe inhibitory surwiwiny

YM155 to drobnocząsteczkowy inhibitor surwiwiny, który blokuje region promotora surwiwiny, który jest bogaty w miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1. Przez blokadę tego regionu inhibitor hamuje transkrypcję genu surwiwiny. YM155 szczególnie aktywny jest w leczeniu nowotworów piersi, bez względu na aktywność receptorów: HER2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*), estrogenowego i kaspazy-3. Trwają również badania nad tym, aby obniżyć stężenie surwiwiny, poprzez blokowanie możliwości tworzenia kompleksów surwiwina- białko opiekuńcze HSP90 (ang. *heat shock protein 90*). Interakcja surwiwiny z HSP90 zwiększa jej stabilność i funkcjonalność, stąd też zablokowanie możliwości tworzenia kompleksu wpłynie na obniżenie stabilności surwiwiny i uruchomienie apoptozy [12].

8.5. Immunoterapia

W immunologicznym leczeniu nowotworów często wykorzystuje się limfocyty oraz przeciwciała jako skuteczną broń do walki z chorobą. Również w tym przypadku można wykorzystać układ odpornościowy do obniżenia stężenia surwiwiny w komórce. Dowiedziono, że limfocyty CD8+T cytotoksyczne wykazują odpowiedź cytolityczną co do konkretnych epitopów surwiwiny [14, 20]. Także wykrywane przeciwciała przeciwko surwiwinie u pacjentów z rakiem płuc czy okrężnicy mogą w przyszłości okazać się skutecznym lekiem na te choroby [12, 30, 34].

9. Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne surwiwiny

Z uwagi na wysoką ekspresję surwiwiny w komórkach nowotworowych, w onkologii medycznej surwiwina często opisywana jest jako potencjalny marker diagnostyczny i prognostyczny. W wielu typach nowotworów wykazano zależność pomiędzy stężeniem surwiwiny, a czasem przeżycia pacjenta lub nawrotu choroby [35]. Im wyższa ekspresja surwiwiny, tym gorsze rokowanie i agresywniejszy przebieg choroby. Dodatkowo, w licznych przypadkach surwiwina zwiększa odporność na chemioterapię, a także promuje występowanie przerzutów [7,13]. Mimo licznych dowodów na to, że surwiwina jest dobrym wskaźnikiem zarówno diagnostycznym jaki i prognostycznym, opinie co do jej zastosowania jako markera są różne. Rozbieżności wynikające ze stosowania różnego rodzaju metod badawczych, liczebności grupy oraz stanu pacjentów, utrudniają badaczom dojście do konsensusu [34, 36].

10. Podsumowanie

Surwiwina poza zaangażowaniem w proces hamowania i regulacji apoptozy, wykazuje także wiele innych działań między innymi udział w mitozie i cyklu komórkowym, angiogenezie czy naprawie DNA. Ostatnie doniesienia wskazują także na możliwy udział surwiwiny w przeżyciu i różnicowaniu prawidłowych komórek macierzystych. Z uwagi na obserwowaną nadekspresję surwiwiny w wielu typach nowotworów, oraz na niekorzystną korelację z odpowiedzią na leczenie i czasem przeżycia pacjentów, jest też brana pod uwagę jako potencjalny cel terapii przeciwnowotworowej. Prowadzone są liczne badania ukierunkowane na zahamowanie aktywności genu surwiwiny, bądź obniżenia stężenia surwiwiny w komórkach nowotworowych. A wyniki tych badań są obiecujące. Jednak z uwagi na liczne fizjologiczne funkcje surwiwiny i jej aktywność nie tylko w komórkach nowotworowych, ale także w komórkach fizjologicznych o wysokim potencjale proliferacyjnym czy też komórkach macierzystych, należy brać pod uwagę skutki uboczne ewentualnych terapii skierowanych na zablokowanie surwiwiny. Wykazano między innymi, że zahamowanie ekspresji surwiwiny wiąże się z powstawaniem niestabilnych genetycznie komórek poliploidalnych i aneuploidalnych, które mogą stać się źródłem nowego klonu nowotworowego.

Podziękowania

Praca powstała w ramach projektu „Ocena ekspresji genu surwiwiny w hematopoetycznych komórkach macierzystych” Własnego Funduszu Stypendialnego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Literatura

1. Silke J., Vucic D., *IAP Family of Cell Death and Signaling Regulators*, Methods in Enzymology, 545 (2014), s. 35–65.
2. Garg H., Suri P., Gupta J.C., Talwar G.P., Dubey S., *Survivin: a unique target for tumor therapy*, Cancer Cell Int. 16 (2016), s. 49.
3. Mahotka C., Liebmann J., Wenzel M., Suschek C., Schmitt M., Gabbert H., *Differential subcellular localization of functionally*, Cell Death Differ, 9 (2002), s. 1334–1342.
4. Sokołowska J. Urbańska K., *Biologiczna rola surwiwiny i jej znaczenie kliniczne*, Życie Weterynaryjne, 86 (2011), s. 964-966.
5. Altieri D.C., *Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer*, Oncogene, 22 (2003), s. 8585-8589.
6. Schimmer A.D., *Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice*, Cancer Res, 64, 20 (2004), s. 7183–7190.
7. Khan Z., Khan A.A., Yadav H., Prasad GBKS, Bisen PS. *Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma*. Cell Mol Biol Lett. (2017) 5;22:8. doi: 10.1186/s11658-017-0038-0.
8. Rupniewska Z., Koczkodaj D., Wąsik-Szczepanek W., *Biologia surwiwiny*, Acta Haematologica Polonica, 36, 4 (2005), s. 371-379.
9. Li F., Ackermann E.J., Bennett C.F. i wsp., *Pleiotropic cell division defects and apoptosis induced by interference with tfe survivin function*, Nat Cell Biol, 1, 8(1999), s. 461-466.
10. Muchmore S.W., Chen J., Jacob C. i wsp., *Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin*, Moll Cell, 6 (2000), s. 176-182.
11. Węsierska-Gądek J., Bednarek J., Kiliańska Z.M., *Nowe oblicze białek antyapoptotycznych II. Surwiwina*, Postępy Biochemii, 53, 3 (2007), s. 239-253.
12. Denel-Bobrowska M., Marczak A., *The role of survivin in the diagnosis and therapy of gynaecological cancers*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 70 (2016), s. 1182-1189.
13. Mobahat M., Narendran A., Riabowol K., *Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy*, International Journal of Molecular Sciences, 15, 2 (2014), s. 2494-2516.
14. Peery R.C., Liu J.Y., Zhang J.T. *Targeting survivin for therapeutic discovery: past, present, and future promises*. rug Discov Today (2017). pii: S1359-6446(17)30130-7. doi: 10.1016/j.drudis.2017.05.009
15. Karczmarek-Borowska B., Zmorzyński Sz., Filip A., *Biologiczna rola surwiwiny*, Współczesna onkologia, 12, 10 (2008), s. 437-440.
16. Vischioni B., van der Valk P., Span S.W., Krutz F.A., Rodriguez J.A., Giaccone G., *Nuclear localization of survivin is positive prognostic factor for survival advanced non-small-cell lung cancer*, Ann Oncol, 15 (2004), s. 1654-1660.
17. Meng H., Lu C.D., Sun Y.L., Dai D.J., Lee S.W., Tanigawa N., *Expression level of wild-type survivin in gastric cancer is an independent predictor of survival*, World J Gastroenterol, 10 (2004), s. 3245-3250.
18. Mahotka C., Krieg T., Krieg A., Wenzel M., Suschenk C.V., Heydthausen M., Gabbert H.E., Gerharz C.D., *Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas*, Int J Cancer, 100 (2002), s. 30-36.

19. Necochea-Campion R., Chen C.S., Mirshahidi S., Howard F.D., Wall N.R., *Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer*, *Cancer Lett*, 339, 2 (2013), s. 167–174.
20. Gravina G., Wasén C., Garcia-Bonete M.J., Turkkila M., Erlandsson M.C., Töyrä Silfverswärd S., Brisslert M., Pullerits R., Andersson K.M., Katona G., Bokarewa M.I. *Survivin in autoimmune diseases*. *Autoimmun Rev*. 16, 8, (2017) s. 845-855. doi: 10.1016/j.autrev.2017.05.016.
21. Sun C., Cai M., Meadows R.P. i wsp., *NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP*, *J Biol Chem*, 275 (2000), s. 33777-33781.
22. Wolanin K., Piwocka K., *Rola i znaczenie surwiwiny w przebiegu mitozy*. *Postępy biochemii* 53, 1 (2007), s. 10-18.
23. Wheatley S.P. *The Functional Repertoire of Survivin's Tails*. *Cell Cycle* 14, 2, (2015), s. 261-268.
24. Shi Y., *Survivin structure: crystal unclear*, *Nat Struct Biol*, 7 (2000), s. 620-623.
25. Marusawa H., Matsuzawa S., Welsh K. i wsp., *HBXIP functions as a cofactor of Survivin in apoptosis suppression*, *EMBO J*, 22 (2003), s. 2729–2769.
26. Johnson M.E., Howerth E.W., *Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein*, *Vet Pathol*, 41, 6 (2004), s. 599–607.
27. Conte 2006 Conte MS, Altieri DC. *Survivin Regulation of Vascular Injury*. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2006; 4: 114-117
28. Gil-Kulik P., Niedojadło A., Feldo M., Karwat J., Kotuła L., Chomik P., Dudek I., Filas M., Wojcieszek A., Zubilewicz T., Bogucka-Kocka A., Kocki J., *The gene expression of class III inhibitors of apoptosis in arteriosclerotic disease*, *Polish Journal of Public Health*, 1 (2014), s. 38–41.
29. Shamsabadi F.T., Eidgahi M.R., Mehrbod P., Daneshvar N., Allaudin Z.N., Yamchi A., Shahbazi M. *Survivin, a Promising Gene for Targeted Cancer Treatment*. *Asian Pac J Cancer Prev*. 17, 8, (2016), s. 3711-3719.
30. Dąbrowski A., Filip A., Zgodziński W., Dąbrowska M., Polańska D., Wójcik M., Zinkiewicz K., Wallner G., *Assessment of prognostic significance of cytoplasmic survivin expression in advanced oesophageal cancer*, *Folia Histochemica et Cytobiologica* (2004), s. 169-72.
31. Cao X.Q., Lu H.S., Zhang L., Chen L.L., Gan M.F., *MEKK3 and Survivin Expression in Cervical Cancer: Association with Clinicopathological Factors and Prognosis*, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 13 (2014), s. 5271-5276.
32. Ryan B.M., O'Donovan N., Duffy M.J., *Survivin: a new target for anti-cancer therapy*, *Cancer Treatment Reviews*, 35 (2009), s. 553-562.
33. Chen P., Zhu J., Liu D, Li H., Xu N., Hou M., *Over-expression of survivin and VEGF in small-cell lung cancer may predict the poorer prognosis*, *Medical Oncology*, 31 (2014), s. 775.
34. Urbaniak J., *Expression of Survivin in Human Cancer*, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 13 (2004), s. 1037–1046.
35. Nicolazzo C., Busetto G.M., Del Giudice F., Sperduti I., Giannarelli D., Gradilone A., Gazzaniga P., de Berardinis E., Raimondi C. *The long-term prognostic value of survivin expressing circulating tumor cells in patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC)*. *J Cancer Res Clin Oncol*. (2017) doi: 10.1007/s00432-017-2449-8.
36. Jaiswal P.K., Goel A., Mittal RD. *Survivin: A molecular biomarker in cancer*. *Indian J Med Res*. 141, 4, (2015), s. 389-397.

Wielokierunkowe działanie surwiwiny w komórkach ludzkich

Streszczenie

Surwiwina, kodowana przez gen *BIRC5*, jest najmniejszym białkiem należącym do rodziny inhibitorów apoptozy (IAP). Zbudowana jest ze 142 aminokwasów. Zawiera jedną domenę BIR oraz domenę alfa-helikalną. Poznano 5 izoform tego białka, które różnią się między sobą lokalizacją w komórce i pełnionymi funkcjami. Umieszczenie surwiwiny w komórce zależne jest od fazy cyklu komórkowego: podczas mitozy znajduje się w jądrze komórkowym, a w pozostałych fazach lokalizuje się w cytoplazmie.

Surwiwina jest inhibitorem apoptozy. W odpowiedzi na czynniki proapoptotyczne, przechodzi do cytoplazmy, gdzie zapobiega aktywacji kaspaz i hamuje śmierć komórki. Uczestniczy również w regulacji cyklu komórkowego, powodując przyspieszenie przejścia do fazy S na skutek indukowania odporności na zatrzymanie w fazie G1. Surwiwina wykazuje wielokierunkowe działanie poza udziałem w śmierci komórki oraz cyklu komórkowym prawdopodobnie posiada dodatkowe funkcje.

W zróżnicowanych dojrzałych komórkach ekspresja surwiwiny jest niska. Zwiększona ekspresja jest charakterystyczna jest między innymi dla komórek nowotworowych, co wskazuje na rolę tego białka w etiologii nowotworów. Leczenie – chemioterapia hamuje jej ekspresję, co z kolei indukuje proces apoptozy w różnych komórkach nowotworowych. Najnowsze doniesienia wskazują na obecność dużych ilości surwiwiny także w prawidłowych komórkach macierzystych.

Celem niniejszej pracy był przegląd aktualnej wiedzy na temat wielokierunkowego działania surwiwiny oraz jej zaangażowania w procesy patologiczne i fizjologiczne.

Słowa kluczowe: Surwiwina, *BIRC5*, inhibitory apoptozy, IAP

Multidirectional effects of survivin on human cells

Abstract

Survivin, which is encoded by the *BIRC5* gene, is the smallest protein belonging to the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). Survivin consist of 142 amino acids. It contains one BIR domain and the domain of the alpha-helical. It is recognized five isoforms of proteins, that differ in location in the cell and the functional. The location of survivin in the cell is dependent on the cell cycle phases: is located in the nucleus during mitosis and is located in the cytoplasm in the other phases.

Survivin is an inhibitor of apoptosis. In response to the pro-apoptotic factors, it passes into the cytoplasm, which prevents caspase activation and inhibits cell death. Also participates in cell cycle regulation, a more rapid transition to the S phase by inducing resistance to arrest in the G1 phase. Survivin showed multidirectional, outside participation in cell death and cell cycle, probably has an additional functions.

The differentiated mature cells show low survivin expression. Increased expression is characteristic of tumor cells, suggesting a role for this protein in the etiology of cancer. Treatment like chemotherapy inhibits its expression, which in turn induces apoptosis in various cancer cells. Most recent reports indicate that in normal stem cells it is observed a large amounts of survivin.

We discuss the multidirectional effects of survivin on human cells that have been investigated in relation to pathological and physiological processes.

Keywords: survivin, *BIRC5*, inhibitors of apoptosis, IAP

Wpływ sposobu przygotowania herbaty na zawartość substancji aktywnych

1. Wstęp

Jedną z definicji herbaty odnosi się do naparu przyrządzanego z liści i pąków roślin należących do rodzaju botanicznego *Camellia*. Ze względu na wymagania klimatyczne uprawy tych roślin najczęściej spotykane są w strefie zwrotnikowej [1-3]. Napar herbaty przygotowujemy przez zalanie wodą liści lub pąków, które wcześniej poddano suszeniu i/lub fermentacji [4, 5]. W celu wydobycia pełnego aromatu i smaku zaleca się stosowanie wody o temperaturze dobranej do gatunku herbaty. Wśród naparów herbat wyróżniamy czarną, czerwoną, niebieską (Oolong), zieloną i białą, które różnią się sposobem obróbki technologicznej liści i pąków krzewu herbaty [6].

W procesie produkcji herbaty czarnej liście poddaje się pełnej fermentacji, podczas której dochodzi do utleniania polifenoli [7, 8]. Podczas procesu technologicznego otrzymywania herbaty zielonej pomijany jest etap fermentacji i liście poddawane są tylko suszeniu. Dzięki temu napary tego gatunku mają w porównaniu z naparami herbaty czarnej i czerwonej, znacznie jaśniejszą barwę. Wynika to także z faktu, że liście są poddawane podgrzaniu parą wodną, która inaktywuje enzymy odpowiedzialne za oksydację katechin [8, 9]. Do produkcji herbaty białej wykorzystywane są nierozwinięte pąki kwiatów. Herbata biała, podobnie jak zielona, jest herbatą niefermentowaną. Podczas otrzymywania herbaty czerwonej, liście są częściowo fermentowane, a proces ten jest przerywany suszeniem, przez co ich intensywny lekko korzenny aromat i zapach jest znacznie bardziej zbliżony do herbaty czarnej. Herbata czerwona charakteryzuje się lekko czerwonym odcieniem na brzegach i koniuszkach suchych liści [10]. Rodzajem tego gatunku herbaty jest Pu-Erh, której proces technologiczny jest wydłużony o przechowywanie liści przez nawet kilkanaście lat

¹ Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Koło Naukowe CIBUS, cibus.utp@gmail.com

² Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Koło Naukowe CIBUS, cibus.utp@gmail.com

³ Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Koło Naukowe CIBUS, cibus.utp@gmail.com

⁴ Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zakład Technologii i Inżynierii Przemysłu Spożywczego, joanna.szulc@utp.edu.pl

⁵ Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zakład Technologii i Inżynierii Przemysłu Spożywczego, grazyna.gozdecka@utp.edu.pl

w zaciemnionych pomieszczeniach przy zachowaniu odpowiednich parametrów temperatury i wilgotności powietrza [11].

Naukowcy w swoich badaniach potwierdzają, iż picie herbaty ma dobroczynny wpływ na zdrowie człowieka, lecz nadmierne jej spożywanie może wywołać niekorzystne efekty w organizmie [2]. Odmiana Pu-Erh ze względu na długotrwały okres przechowywania liści i zachodzące w nich procesy jest bogata w statynę, która obniża poziom cholesterolu, zwłaszcza jego szkodliwej frakcji LDL [12, 13]. Prozdrowotny wpływ na organizm człowieka mają również występujące w herbacie polifenole, których przeciwutleniające działanie zapobiega powstawaniu wolnych rodników, przyczyniających się m.in. do tworzenia nowotworów [12, 14, 15]. Szczególnie silne działanie przeciwutleniające mają katechiny, które neutralizują wolne rodniki [14, 16, 17]. W naparze herbaty występuje także witamina C, która wykazuje działanie przeciwutleniające i chroni organizm przed czynnikami zewnętrznymi, jednak ze względu na wysoką temperaturę wody wykorzystywaną do jej przygotowania większość kwasu askorbinowego znajdującego się w suszu ulega degradacji [18, 19]. Badania potwierdzają, iż regularne picie herbaty przyczynia się do obniżenia poziomu cukru we krwi [20]. W herbacie spotkać można pewne ilości antocyjanów, które nie tylko nadają herbacie wyjątkową barwę, ale również obniżają ciśnienie krwi oraz zapobiegają powstawaniu raka jelita grubego [21 -23].

Niestety nadmierne spożywanie napojów sporządzonych z liści herbaty może mieć negatywny wpływ na zdrowie człowieka. Większa filiżanka, czyli 250 ml naparu czarnej herbaty zawiera około 70 mg kofeiny [24]. Substancja ta zaburza m.in. gospodarkę magnezu oraz wapnia i generuje problemy ze snem. W badaniach przeprowadzonych na grupie starszych kobiet w okresie menopauzalnym wykazano, że większa zawartość kofeiny w diecie powoduje wyższy wskaźnik ubytków kości kręgosłupa. Jest to jedna z przyczyn wzrostu ryzyka zachorowalności na choroby cywilizacyjne, takie jak osteoporoza [25].

W czerwonej herbacie obecne są taniny (odpowiedzialne m.in. za cierpki smak), których ilość wynosi od około 9 do 17 g/100 g s.m. Dla porównania zielona herbata odznacza się dwukrotnie niższą zawartością tychże związków [26]. Garbniki mają zdolność do wiązania cząsteczek żelaza niehemowego, a co za tym idzie, tworzenia nierozpuszczalnych związków z jonami żelaza [27-28]. Dodatkowo diuretyczne działanie teiny skutkuje wydalaniem zbyt dużej ilości wapnia, które jest niezbędne do prawidłowej budowy kości.

W niniejszej pracy zbadano zawartość następujących substancji aktywnych w naparze herbaty:

- polifenole,
- kwas askorbinowy,
- antocyjany,

Polifenole są dużą grupą związków organicznych o budowie pierścieniowej. Posiadają w cząsteczce jeden bądź kilka pierścieni aromatycznych, do których są przyłączone grupy wodorotlenowe o kwaśnym charakterze. Występują w roślinach i są

ich wtórnymi metabolitami. Związki polifenolowe charakteryzują się dużą aktywnością biologiczną, która jest ściśle związana z ich budową. Biorą udział w usuwaniu metali ciężkich z organizmu z uwagi na zdolność do chelatowania. Antyrodnikowe działanie sprowadza się nie tylko do usuwania RFT, a także reaktywnych form azotu. Polifenole opóźniają procesy starzenia i zapobiegają chorobom związanym z układem krążenia [29].

Wśród polifenoli można wyróżnić antocyjany, których właściwości są zbliżone do wyżej wspomnianych związków. Mają pozytywny wpływ na gospodarkę lipidową, zmniejszają frakcję LDL cholesterolu i trójglicerydów. Naukowcy pracują nad zastosowaniem antocyjanów w leczeniu chorób nowotworowych. Wszystkie właściwości antocyjanów są bezpośrednio związane z ich aktywnością przeciwutleniającą [30].

Witamina C, inaczej kwas L-askorbinowy jest laktonem 2,3-endiol-L-gulonowego kwasu, który ma znaczne właściwości redukcyjne. Jednakże witamina C jest substancją stosunkowo nietrwałą. W obecności metali ciężkich, takich jak miedź czy żelazo, wykazuje słabą aktywność i ulega degradacji. Temperatura wrzenia, obecność tlenu jak i alkaliczne środowisko również sprawiają, że witamina C jest niestabilna i jej struktura ulega niszczeniu. Kwas askorbinowy, wnikając do organizmu, ulega utlenieniu. Jego działanie antyoksydacyjne sprowadza się do neutralizacji szkód powodowanych przez wolne rodniki i reaktywne formy tlenu [31-32].

Powstawanie wolnych rodników jest naturalnym procesem, który zachodzi w organizmie człowieka. Tworzą się one z tlenu i przekształcają w reaktywne formy tlenowe (RFT). W ilości fizjologicznej pełnią funkcję swoistych sterowników i kontrolują wiele procesów zachodzących w komórkach [33, 34].

Zaburzenie homeostazy jest powodem zwiększenia liczby wolnych rodników w ustroju. Obecne w powietrzu zanieczyszczenia, dym tytoniowy, jak i tłuszcze poddawane obróbce termicznej w wysokich temperaturach są też źródłem wolnych rodników. Wraz z wiekiem równowaga organizmu zostaje zachwiana i w organizmie pojawia się coraz więcej reaktywnych form tlenowych. RFT mają degradujący wpływ na układ nerwowy. Mechanizm działania wolnych rodników polega na uszkodzaniu błony komórkowej, peroksydacji struktur lipidowych oraz powodują zmiany w DNA. W efekcie ryzyko zachorowania na choroby układu krążenia, immunologicznego, nerwowego jest zwiększone [35]. Obecnie trwają badania nad związkiem wolnych rodników z procesami starzenia się oraz stresu oksydacyjnego [36].

Ludzki organizm wytworzył specjalne procesy obronne chroniące go przed destrukcyjnym działaniem wolnych rodników. W tych działaniach biorą także udział antyoksydanty, które są dostarczane do organizmu z zewnątrz, np. z pokarmem. Polifenole, witamina C oraz antocyjany to przeciwutleniacze biorące udział we wspomnianych mechanizmach obronnych [37].

2. Cel badań

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu sposobu przygotowania herbaty na zawartość polifenoli, kwasu askorbinowego oraz antocyjanów w naparach herbaty czerwonej.

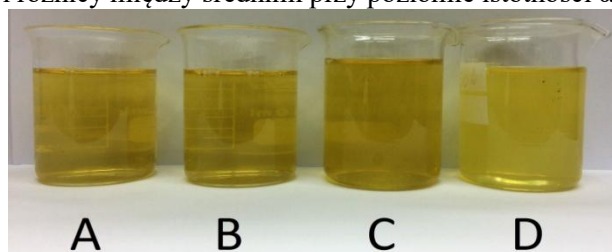
3. Materiał i metody

3.1. Przygotowanie naparów

Materiał do badań stanowiła japońska odmiana czerwonej herbaty Pu-Erh Superior. Zastosowano cztery warianty przygotowania herbaty. W każdym z wariantów 1 g suszu był poddany ekstrakcji z użyciem 180 cm³ wody destylowanej. Pierwsze dwa warianty (A i B) obejmowały poddanie suszu ekstrakcji wodą o temperaturze 95°C. Czas parzenia naparu A wynosił 3 minuty, a naparu B – 7 minut. Przez czas parzenia herbat w obu wariantach utrzymywano stałą temperaturę 95°C. Kolejny ekstrakt (C) był otrzymany poprzez infuzję wodą o temperaturze 4°C. Infuzję prowadzono w naczyniu o podwójnych ściankach z izolacją powietrzną przez 12 godzin. Wariant D polegał na przygotowaniu herbaty przez poddanie suszu infuzji lodem, aż do jego całkowitego rozpuszczenia, czyli ok. 3,5 godziny. Otrzymane warianty A-D przedstawiono na rys. 1.

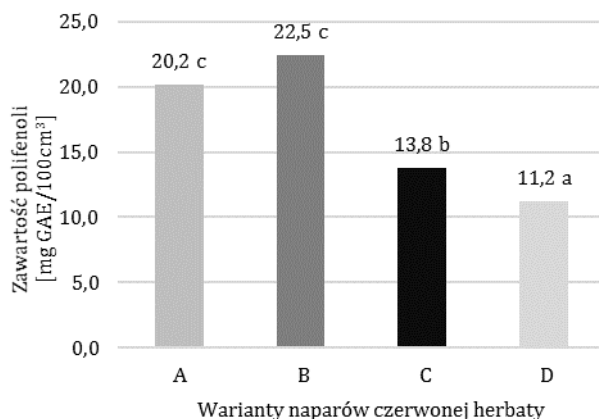
3.2. Oznaczanie składników aktywnych

Do oznaczania zawartości polifenoli wykorzystano zmodyfikowaną metodę Folina-Ciocalteu'a [36] polegającą na uzyskaniu żółto-niebieskiego kompleksu polifenoli z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a (mieszaniną wolframianu sodowego, molibdenianu sodowego i siarczanu litu w środowisku kwasu fosforowego i solnego). Zawartość polifenoli w ekstraktach czerwonej herbaty wyrażono jak milirównoważnik kwasu galusowego. Obecne w ekstraktach antocyjany oznaczano metodą różnicowego pH (bufor pH 1,0 i pH 4,5) [40]. Wyniki wyrażono jako ekwiwalent cyjanidyno-3-glukozydu. Zawartość kwasu askorbinowego oznaczano spektrofotometrycznie wg normy PN-A-04019:1998. Analizy wykonywano bezpośrednio po sporządzeniu naparów i osiągnięciu przez nie temperatury pokojowej (~23°C). Wszystkie oznaczenia wykonywano w trzykrotnym powtórzeniu, a wyniki przedstawiono jako średnią. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu Tukeya istotności różnicy między średnimi przy poziomie istotności $\alpha=0,05$.



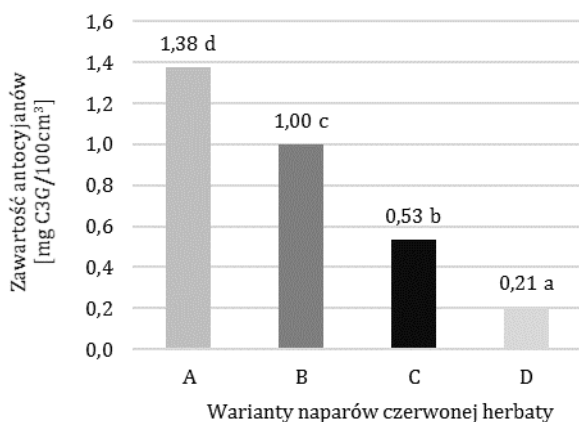
Rysunek 1. Badane warianty ekstraktów czerwonej herbaty [opracowanie własne]

4. Wyniki i ich omówienie



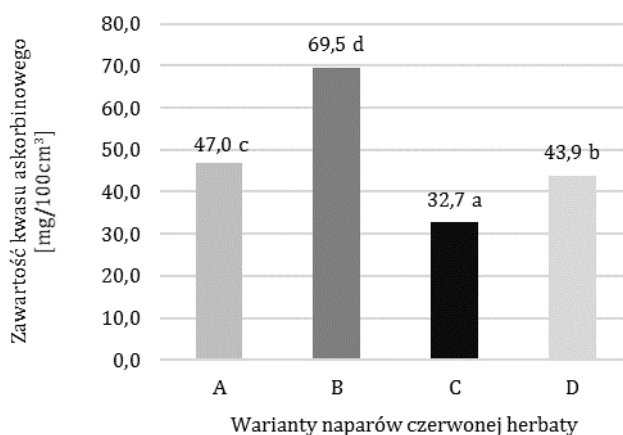
Rysunek 2. Zawartość polifenoli w ekstraktach czerwonej herbaty (A – woda 95°C/3 min; B – woda 95°C/7 min; C – woda 4°C/12h; D – lód); a, b, c – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$ [opracowanie własne]

Na wykresie (rys. 2) przedstawiono zawartość polifenoli w badanych ekstraktach herbaty. Wyniki wyrażono jako ekwiwalent kwasu galusowego w przeliczeniu na 100 cm³ roztworu. Najwięcej polifenoli oznaczono w ekstraktach suszu, do przygotowania których użyto wody o temperaturze 95°C (warianty A i B). Ekstrakcja gorącą wodą w czasie do 7 minut nie wpłynęła statystycznie istotnie na zawartość polifenoli. Herbaty przygotowane poprzez infuzję zimną wodą oraz lodem odznaczyły się dwukrotnie mniejszą zawartością badanych związków w porównaniu do wariantów A i B. Podobne wyniki były uzyskane również w innych badaniach [39].



Rysunek 3. Zawartość antocyjanów w ekstraktach czerwonej herbaty (A – woda 95°C/3 min; B – woda 95°C/7 min; C – woda 4°C/12h; D – lód) [opracowanie własne]

Zawartość antocyjanów w zależności od sposobu przygotowania naparów czerwonej herbaty przedstawiono na rys. 4. Ekstrakty charakteryzowały się obecnością antocyjanów od 0,21 do 1,38 mg C-3-G/ 100cm³ naparu. Zawartość antocyjanów w herbacie czerwonej jest niska [23]. Zarówno czas działania, jak i temperatura wody wpłynęły istotnie na ilość antocyjanów w ekstraktach. Najwięcej antocyjanów obecnych było w wariancie A, w którym napar otrzymano przez ekstrakcję suszu gorącą wodą przez 3 minuty. Wydłużenie czasu działania wody o wysokiej temperaturze spowodowało obniżenie zawartości antocyjanów o ok. 25%. Najmniej antocyjanów oznaczono w ekstrakcie poddanym infuzji lodem. Należałoby przeprowadzić dokładniejsze badania w celu określenia wpływu niskiej temperatury na aktywność tych substancji.



Rysunek 4. Zawartość witaminy C w ekstraktach czerwonej herbaty (A – woda 95°C/3 min; B – woda 95°C/7 min; C – woda 4°C/12h; D – lód) [opracowanie własne]

Największą zawartością kwasu askorbinowego, istotnie statystycznie różniącą się od pozostałych ekstraktów, charakteryzował się wariant B (rys. 4). Może to być spowodowane faktem, że wraz z wydłużeniem czasu parzenia herbaty, pH roztworu spada, co pozwala na stabilizację kwasu askorbinowego w ekstrakcie [41]. Najmniejszą ilość witaminy C oznaczono w ekstrakcie przygotowanym z użyciem zimnej wody (C). Przyczyną tak małej zawartości tego związku może być długi czas ekstrakcji w niskiej temperaturze (12h), ponieważ wodne roztwory kwasu askorbinowego są bardzo nietrwałe [37]. Podobne zależności otrzymano w poprzednich badaniach własnych, przeprowadzonych na naparach herbaty zielonej [42].

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wysunąć następujące wnioski:

- Herbata parzona wodą o temperaturze 95°C w czasie nie dłuższym niż 7 minut nie różni się istotnie statystycznie zawartością polifenoli,

- Ekstrakty suszu herbaty czerwonej otrzymane w niskiej temperaturze zawierają istotnie mniej polifenoli w porównaniu do naparów uzyskanych w wyższej temperaturze,
- Temperatura i czas ekstrakcji wpływają istotnie na ilość antocyjanów w badanych czerwonych herbatach,
- Wydłużenie czasu parzenia (woda o temperaturze 95°C) czerwonej herbaty do 7 minut wpływa na zwiększenie zawartości witaminy C w naparach, natomiast kilkugodzinne przygotowanie ekstraktów czerwonej herbaty powoduje istotne zmniejszenie w nich zawartości witaminy C.

Literatura

1. Graham H. N. *Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry*. Preventive Medicine, 21(3) (1992), s. 334-350.
2. Zuo Y., Chen H., Deng Y. *Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector*. Talanta, 57 (2002), s. 307-316.
3. Perva-Uzunalić A., Škerget M., Knez Ž., Weinreich B., Otto F., Grüner S. *Extraction of active ingredients from green tea (Camellia sinensis): Extraction efficiency of major catechins and caffeine*. Food Chemistry, 96 (2006), s. 597-605.
4. Weisburger J. H. *Tea and health: a historical perspective*. Cancer Letters, 114 (1997), s. 315-317.
5. Komes D., Horžić D., Belščak A., Ganić K. K., Vulic I. *Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds*. Food Research International, 43 (2010), s. 167-176.
6. Liang Y., Lu J., Zhang L., Wu S., Wu Y. *Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions*. Food Chemistry, 80(2003), s. 283-290.
7. Perucka I. *Skład chemiczny liści herbaty*. Biuletyn Magnezologiczny, 6(3) (2001), s. 443-451.
8. Kłódka D., Bońkowski M., Telesiński A. *Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat rozdrobnionych (dust i fannings) w zależności od czasu parzenia*. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 1(56) (2008), s. 103-113.
9. Bonnely S., Davis A. L., Lewis J. R., Astill C. *A model oxidation system to study oxidized phenoli compounds present in black tea*. Food Chemistry, 83 (2003), s. 485-492.
10. Świderski F., Waszkiewicz-Robak B. (red.). *Towaroznawstwo żywności przetworzonej z elementami technologii*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa (2010), s. 528-530.
11. Flaczyk E., Górecka D., Korczak J. (red.). *Towaroznawstwo produktów spożywczych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań (2003), s. 427-431.
12. Jeng K-C., Chen C-S., Fang Y-P., Hou R. C-W., Chen Y-S. *Effect of Microbial Fermentation on Content of Statin, GABA, and Polyphenols in Pu-Erh Tea*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (2007), s. 8787-8792.
13. Kuo K-L., Weng M-S., Chiang C-T., Tsai Y-J, Lin-Shiau S-Y., Lin J-K. *Comparative Studies on the Hypolipidemic and Growth Suppressive Effects of Oolong, Black, Pu-erh, and Green Tea Leaves in Rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005), s. 480-489.
14. Zhang H-M., Wang C-F, Shen S-M., Wang G-L., Liu P., Liu Z. M., Wang Y-Y., Du S-S., Liu Z-L., Deng Z-W. *Antioxidant Phenolic Compounds from Pu-erh Tea*. Molecules, 17 (2012), s. 14037-14045.

15. Rusaczonek A., Świdorski F., Waszkiewicz-Robak B. *Antioxidant properties of tea and herbal infusion – a short report*. Polish Journal of Food and Nutrition Science, 60(1) (2010), s. 33–35.
16. Guo Q., Zhao B. L., Hou J. W. *ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers*. Biochimica et Biophysica Acta, 1427(1) (1999), s. 13–23.
17. Yokozawa T., Cho E.J., Hara Y., Kitani K. *Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (2000), s. 5068–5073.
18. Cross M. *Zdrowie na talerzu. Postaw na świadome odżywianie każdego dnia*. Wydawnictwo Vivante, Warszawa (2015).
19. Takehiko Yamamoto, Lekh Raj Juneja, Djong-Chi Chu, Mujo Kim. *Chemistry and Applications of Green Tea*. Wydawnictwo CRC Press Boca Raton, New York. (1997).
20. Anderson R. A., Polansky M. M. *Tea enhances insulin activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (2002), s. 7182–7186.
21. Bao Y-X., Xia L-F., Li Y-Y., Liang M-Z. (2008). *A New Tea Tree Cultivar 'Zijuan'*. Acta Horticulturae Sinica, 35(6) (2008).
22. Hsu C-P., Shih Y-T., Lin B-R., Chiu C-F., Lin C-C. *Inhibitory Effect and Mechanisms of an Anthocyanins- and Anthocyanidins-Rich Extract from Purple-Shoot Tea on Colorectal Carcinoma Cell Proliferation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (2012), s. 3686–3692.
23. Lv H-P., Dai W-D., Tan J-F, Guo L., Zhu Y., Lin Z. *Identification of the anthocyanins from the purple leaf coloured tea cultivar Zijuan (Camellia sinensis var. assamica) and characterization of their antioxidant activities*. Journal of Functional Foods, 17 (2015), s. 449–458.
24. Jain A., Magnhani C., Kohli S., Nigam D., Rani V. *Tea and human health : The dark shadow*, Toxicology letters 220, (2013), s. 82-87.
25. Rapuri, Prema & C Gallagher, J & Kinyamu, H Karimi & L Ryschon, K. *Caffeine intake the rate of bone loss in elderly women and interact with vitamin D receptor genotypes*, Am J Clin Nutr. 75 (5), 2001, s. 694-700.
26. Rusinek-Prysttupa E. *Zawartość związków biologicznie czynnych w naparach różnych gatunków herbat w zależności od czasu parzenia*, Bromat. Chem. Toksykol. XLVI, 1, (2013), s. 48–52
27. Disler P.B., Lynch S.R., Charlton R.W., Torrance J.D., Bothwell T.H., Walker R.B., Mayet F. *The effect of tea on iron absorption*, Gut, 16, (1975), s. 193-200
28. Pasha, Chand, Reddy, Gopal *Nutritional and medicinal improvement of black tea by yeast fermentation*, Food Chemistry, 89 (2005) 449-453
29. Połać I., Bobrowski M., Bijak M., Borowiecka M., Stenkiewicz T. *Związki polifenolowe i ich suplementacja u kobiet po menopauzie 2* (2011), s.157-162
30. Szymanowska U. *Antocyjany – polifenole o szczególnych właściwościach* Dostęp : 18.03.2017
31. *Żywnie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*, pod red. Gawęcki J. i Hryniewiecki L. PWN, Warszawa 2000
32. Sikorska-Zimny K., Badełek E. *Zmiany zawartości witaminy C w czasie przechowywania dwóch odmian kapusty brukselskiej Ajax fl i Louis fl*, Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa 22, (2002), s. 121-127
33. Dröge W. *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiological Reviews, 82 (2002), s. 47-95.
34. Zabłocka A., Janusz M. *Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych* 62 (2008), s.118-124

35. Wojtanowska-Rzytki M. *Rola naturalnych antyoksydantów w profilaktyce chorób cywilizacyjnych 1* (2009) , s.23-27.
36. Singleton L., Orthofer R., Lamuela-Raventions R. M. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology*, 299 (1999), s. 152-178.
37. Wrolstad R. R., Acree T. E., Decker E. A., Penner M. H., Reid D. S., Schwartz S. J., Shoemaker C. F, Smith D., Sporns P., *Handbook of Food Analytical Chemistry*, Wiley – Interscience, New Jersey (2005), s. 35-37.
38. PN-A-04019:1998 *Produkty spożywcze. Oznaczanie zawartości witaminy C*
39. Szymanowski, A., Kosiorek, P. *Wpływ czasu parzenia herbaty na zawartość polifenoli i aktywność przeciwutleniającą* (2012) Dostęp: 16.03.2017
<http://kntz.sggw.pl/projekty/2012/herbata.pdf>
40. Podśadek A., Sosnowska D. *Witamina C w: Przeciwnutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne* Wydawnictwo Nauk Technicznych, Warszawa (2007), s. 163-170.
41. Kłódka D., Bońkowski M., Telesiński A. *Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat rozdrobnionych (dust i fannings) w zależności od czasu parzenia* Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 1 (56), (2008), s. 103-113.
42. Błaszak B., Hodyl J., Majewska K., Szulc J. *Wpływ sposobu przygotowywania zielonej herbaty na zawartość składników aktywnych* Inżynieria Przemysłu Spożywczego ¼ (21) s. 9-12.

Wpływ sposobu przygotowania herbaty na zawartość substancji aktywnych

Streszczenie

Herbata jest jednym z najbardziej rozslawionych napojów na świecie. Badania potwierdzają, że picie herbaty ma pozytywny wpływ na organizm człowieka. Obecność w czerwonej herbacie Pu-erh składników bioaktywnych takich jak polifenole, antocyjany, witamina C oraz makro- i mikroelementów wspomaga leczenie chorób cywilizacyjnych. Jednym z najczęściej używanych sposobów przygotowywania tej herbaty jest infuzja wodą o temperaturze ~100°C przez kilka do kilkunastu minut. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu wybranego sposobu przygotowywania czerwonej herbaty Pu-erh na zawartość antocyjanów, polifenoli oraz kwasu askorbinowego. Do jej przygotowania użyto destylowaną wodę o temperaturze 95°C, 4°C oraz lód. Wraz ze wzrostem temperatury oraz czasu infuzji suszu wzrastała zawartość polifenoli. Wysoka temperatura oraz krótki czas ekstrakcji korzystnie wpływają na zawartość antocyjanów w naparze.

The effect of the treatment of tea preparation on the contents of active substances

Abstract

Tea is one of the most famous beverages in the world. Researches show that drinking tea has a positive effect on human health. Pu-erh red tea contains many bioactive ingredients such as polyphenols, anthocyanins, vitamin C and macro- and microelements. One of the most popular methods of tea brewing is infusion with hot water of a temperature ~100°C for a few to several minutes. The aim of this study was determine the effect of the method of tea brewing on polyphenols, anthocyanins and ascorbic acid in Pu-erh red tea. This tea brewing method uses water of temperatures: 95°C and 4°C, and ice. The longer the extraction time and the higher the temperature are, the amount of polyphenols increases. High temperature and short infusion have a positive impact on a full amount of anthocyanins.

Indeks Autorów

Bartz M.	105	Malm A.	170
Błaszak B.	256	Mastalerczyk A.	87
Boguszewska-Czubara A.	87	Michalczuk W.	87
Cechła P.	162	Michalicha A.	183
Cholewińska E.	233	Muzyczka A.	127
Chudzik-Rząd B.	170	Nowak A.	202
Ciwińska M.	87	Ognik K.	233
Dębowska N.	87	Paziewska M.	246
Gieroba B.	213	Podstawka K.	61
Gil-Kulik P.	246	Pruszkowska-Przybylska P.	225
Golletz A.	7	Sagan P.	233
Gozdecka G.	256	Skonieczna D.	194
Hodyl J.	256	Sławianowska P.	194
Hołyńska-Iwan I.	79, 162, 194	Słomski R.	202
Jach M. E.	61	Smalczewska A.	194
Janeczko M.	127, 142	Sobczyński J.	170
Klepka A.	183	Stępniewski D.	233
Kmiecik K.	79	Szulc J.	256
Kopacz-Bednarska A.	38	Śledziński P.	202
Król T.	38	Trybus E.	38
Król-Kogus B.	31	Trybus W.	38
Kurzepa J.	87	Tylutki A.	246
Majewska K.	256	Zeyland J.	202