

WYKORZYSTANIE ROŚLIN W KOSMETOLOGII, MEDYCYNIE I FARMACJI

TOM 3



Redakcja:
dr n. o zdr. Mariola Janiszewska

Lublin 2023

**Wykorzystanie roślin
w kosmetologii, medycynie
i farmacji. Tom 3**

**Wykorzystanie roślin
w kosmetologii, medycynie
i farmacji. Tom 3**

Redakcja:
Mariola Janiszewska

Lublin 2023

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdeczne podziękowania
zespółowi Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. inż. Marcin Kozak
- Prof. dr hab. Barbara Sawicka
- dr hab. Anna Jakubska-Busse
- dr hab. Radosław Podsiadły
- dr Renata Bancercz
- dr n. o zdr. Ewelina Firlej
- dr Karolina Furtak
- dr inż. Mirosława Grymel
- dr inż. Gabriela Iwona Haraf
- dr n. med. Anna Kamm
- dr Marta Malinowska
- dr Ewelina Pióro-Jabrucka
- dr Agnieszka Richert
- dr Anna Rysiak
- dr hab. Anna Serefko
- dr n. farm. Elżbieta Studzińska-Sroka
- dr Łukasz Wojtyła

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:

Monika Maciąg

Projekt okładki:

Marcin Szklarczyk

Korekta:

Małgorzata Gabryś

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

ISBN 978-83-67881-04-3

Wydawca:

Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin

www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Karolina Jaros, Małgorzata Wójcik <i>Miscanthus x giganteus</i> jako roślina użyteczna w zrównoważonym wykorzystaniu terenów zanieczyszczonych.....	7
Kinga Kaczmarek, Anna Tarasiewicz, Sylwia Błachowiak Wpływ stosowania diety bogatej w orzechy na funkcjonowanie układu krążenia – przegląd badań	16
Edyta Miszczuk, Magdalena Chłopecka, Andrzej Bajguz Tradycyjne i potencjalne zastosowanie wąkroty azjatyckiej <i>Centella asiatica</i> w medycynie i kosmetologii.....	24
Ewa Pierzchała, Klaudia Mazurek Ostropest plamisty – rzadki składnik kosmetyków.....	36
Krzysztof Wolski, Gabriela Pastuch-Gawolek Aktywność biologiczna amigdaliny	45
Klaudia Mazurek, Ewa Pierzchała Wybrane składniki pochodzenia roślinnego w terapii i pielęgnacji skóry z zaburzeniami pigmentacyjnymi	69
Magdalena Zdybel, Barbara Pilawa, Magdalena Chwałowska Wpływ składu surowca roślinnego na oddziaływania z wolnymi rodnikami naparów z czystka szarego, róży dzikiej, ketmii szczawiowej oraz pokrzywy zwyczajnej – badania metodą EPR.....	81
Monika Nawara, Aleksandra Nurzyńska Modyfikacja biomateriałów opatrunkowych związkami pochodzenia roślinnego w celu nadania im właściwości przeciwbakteryjnych	94
Anna Fajdek-Bieda, Agnieszka Wróblewska Cytral – związek pochodzenia naturalnego o wielu zastosowaniach w medycynie – przegląd literaturowy	108
Anna Piotrowska, Dariusz Boruszko Możliwości zastosowania Efektywnych Mikroorganizmów w rolnictwie	124
Emilia Adrian, Iwona Jędrzejczyk, Jadwiga Andrzejewska <i>Acmella oleracea</i> – mało znana roślina zielarska	132

Michał Kolisz, Julia Płyjgawko, Anna Goździalska , Karolina Jaferniki Wybrane ekstrakty roślinne wykorzystywane w preparatach do mezoterapii igłowej.....	145
Mateusz Kowalski, Katarzyna Szwaczko Postępy w syntezie i potencjalnie bioaktywne kumaryny.....	170
Katarzyna Szwaczko, Kamil Dziuba Sondy fluorescencyjne oparte na szkielecie kumaryn do wykrywania biologicznych tioli.....	183
Magdalena Jankowska, Bożena Łozowicka Charakterystyka ziół i występujących w nich pozostałości pestycydów	202
Dorota Gendaszewska, Katarzyna Miśkiewicz, Dorota Wieczorek Zastosowanie wybranych biostymulatorów w rolnictwie	214
Agnieszka Kumanowicz, Karolina Małczak, Julia Tyczyńska, Joanna Banasiewicz Kapsaicyna, jej wpływ na mikrobiotę i potencjał w terapii chorób przewodu pokarmowego.....	232
Indeks Autorów	239

***Miscanthus x giganteus* jako roślina użyteczna w zrównoważonym wykorzystaniu terenów zanieczyszczonych**

1. Wstęp

Ekspansywna działalność wydobywcza, przemysłowa i rolnicza, rozwój miast i szlaków komunikacyjnych doprowadziły do znacznego przekształcenia i zanieczyszczenia środowiska, głównie zanieczyszczeniami nieorganicznymi, takimi jak metale czy metaloidy, ale także związkami organicznymi, np. wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA), dioksynami, furanami, węglowodormi ropopochodnymi. Ma to niekorzystny wpływ na całe ekosystemy, prowadząc do zubożenia ich bioróżnorodności i dysfunkcji, ponieważ wiele organizmów wykazuje niską tolerancję na stres związany z obecnością zanieczyszczeń w środowisku. Niektóre z zanieczyszczeń nieorganicznych (np. Cd, Zn, Pb, Hg, As) mogą być przenoszone w łańcuchu pokarmowym od producentów pierwotnych do zwierząt i ludzi, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia. Na zdegradowanych terenach nie powinna odbywać się działalność rolnicza, a także nie powinny być one zamieszkałe. Obecnie stoimy więc przed problemem ich zagospodarowania w taki sposób, aby prowadzona działalność nie spowodowała zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt oraz rozprzestrzenienia się zanieczyszczeń. Jednym z rozwiązań jest uprawianie na takich terenach roślin wykorzystywanych na cele inne niż spożywcze, na przykład użytecznych w różnych gałęziach przemysłu, m.in. stosowanych do produkcji włókien, materiałów budowlanych, bioplastików oraz biopaliw. Takie gatunki roślin powinny charakteryzować się wysoką tolerancją na zanieczyszczenia, niskim transferem zanieczyszczeń do łańcuchów troficznych oraz produkować biomasę o określonej wartości ekonomicznej. Jednym z gatunków, który spełnia te kryteria i może z powodzeniem być uprawiany na terenach zdegradowanych w celach produkcji biomasy z jej przeznaczeniem do wykorzystania w przemyśle m.in. energetycznym, papierniczym czy budowlanym, jest *Miscanthus x giganteus* (miskant olbrzymi). Uprawa miskanta przynosi korzyści nie tylko ze względu na duży plon biomasy, ale także użyteczności tej rośliny w fitoremediacji, która może prowadzić do przywrócenia zanieczyszczonym terenom użyteczności rolniczej. Wykorzystując miskanta olbrzymiego do zagospodarowania terenów zdegradowanych, uzyskamy nie tylko plon zużywany w wielu dziedzinach przemysłu, ale także stopniowe oczyszczenie terenu. Celem pracy jest przedstawienie możliwości wykorzystania *Miscanthus x giganteus* do zagospodarowania terenów zanieczyszczonych i wskazanie potencjalnych zastosowań dla wyprodukowanej biomasy.

¹ karolinajaros430@gmail.com, Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie.

² malgorzata.wojcik@mail.umcs.pl, Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie.

2. Charakterystyka miskanta olbrzymiego (*Miscanthus x giganteus*)

Miscanthus x giganteus (miskant olbrzymi) to hybryda *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. (miskant cukrowy) i *Miscanthus sinensis* Andersson (miskant chiński), pochodząca z regionów tropikalnych i subtropikalnych, uprawiana w Europie od 1930 roku [1]. Uważa się, że wkład *M. sacchariflorus* w genom *M. x giganteus* zapewnia adaptację do cieplejszego klimatu, podczas gdy *M. sinensis* zapewnia zasoby genetyczne korzystne dla jego uprawy w chłodniejszych regionach. Podstawowy zestaw chromosomów w rodzaju *Miscanthus* liczy 19, natomiast *Miscanthus x giganteus* posiada 57 chromosomów somatycznych ($2n = 3x = 57$), jest zatem formą triploidalną, a przez to sterylną, niezdolną do tworzenia płodnych ziarniaków. Rozmnażany jest wegetatywnie przez podział kłaczy lub mikrorozmnażanie. Jest jedną z niewielu traw występujących w klimacie umiarkowanym, która charakteryzuje się szlakiem fotosyntezy C4 [2]. Częścią podziemną *Miscanthus x giganteus* są kłacza, z których wyrastają ulistnione, bujne pędy tworzące okazałe kępy. Sztynne źdźbła osiągają wysokość do 3,5 m. Liście miskanta są ciemnozielone, spłaszczone, lancetowate. Miskant olbrzymi zazwyczaj nie kwitnie, chyba że podczas długiej i ciepłej jesieni. Jego kwiatostany przypominają pióropusze [3]. Rośliny te posiadają silnie rozwinięty system korzeniowy sięgający głębokości do 3 m [4]. Ze względu na szeroką tolerancję na różne warunki siedliskowe miskant rośnie na murawach, brzegach rzek, zboczach górskich, na skrajach lasu, nieużytkach. Wzrost i rozmieszczenie mogą być ograniczone przez niską tolerancję na mróz oraz suszę. W pierwszym roku uprawy ujemne temperatury powietrza mogą doprowadzić do śmiertelności 50% roślin, ale osobniki, które przetrwają pierwszą zimę, dobrze rosną w następnym sezonie (niemal 100% przeżywalności). Uprawy miskanta mogą być prowadzone efektywnie przez okres od 15 do 20 lat [5]. Plon biomasy (sucha masa) waha się od 15 t ha⁻¹ do 30 t ha⁻¹ rocznie dla uprawy 2-3-letniej. Zbiór suchej masy części nadziemnych miskanta prowadzi się zazwyczaj od jesieni do wczesnej wiosny. W warunkach europejskich miskant olbrzymi wykazuje dużą odporność na czynniki chorobotwórcze, jego plantacje nie wymagają prowadzenia ochrony chemicznej. Uprawa miskanta olbrzymiego jest stosunkowo łatwa, charakteryzuje się niskimi wymaganiami co do jakości gleb, niskim zapotrzebowaniem na nawozy i pestycydy, co sprawia, że jest ekologiczna i ekonomiczna [5, 6].

3. Użyteczność *Miscanthus x giganteus* w rekultywacji zdegradowanych terenów

Degradacja gruntów jest niekorzystnym zjawiskiem, w którym fizyczna, chemiczna i biologiczna jakość gleb ulega stopniowemu pogorszeniu na skutek naturalnych procesów związanych z erozją, ale przede wszystkim z ekspansywną gospodarką człowieka i związanymi z nią zmianami klimatu. Obserwuje się masowe wylesianie i niewłaściwą eksploatację gruntów rolnych, postępującą suszę i zasolenie gleb, a także rosnące zanieczyszczenie środowiska metalami i metaloidami oraz związkami organicznymi. Uważa się, że ponad 75% gruntów na całym świecie może być dotkniętych problemem degradacji, co niekorzystnie wpływa na życie ponad 3,2 mld ludzi [7]. Szacuje się, że liczba obszarów zanieczyszczonych na świecie przekracza 10 mln, z czego 25% występuje w Europie [8]. Według Europejskiej Agencji Środowiska największy problem dotyczy zanieczyszczeń metalami i metaloidami (ponad 37% terenów), a także olejem mineralnym (ponad 33% terenów) i wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA, ponad 13% terenów) [9]. Takie zanieczyszczone tereny nie powinny być wykorzystywane na cele rolnicze i należałoby poddać je zabiegom rekultywacyjnym [10].

Rekultywacja terenu to proces, w trakcie którego gruntem skażonym toksycznymi związkami organicznymi i nieorganicznymi przywraca się ich pierwotne użyteczne cechy [6]. Fitoremediacja to metoda oczyszczania środowiska z wykorzystaniem roślin. Wśród najważniejszych technik fitoremediacji możemy wymienić: fitodegradację (degradacja pobranych związków organicznych poprzez aktywność enzymatyczną w tkankach roślinnych), fitostabilizację (która polega na zatrzymywaniu zanieczyszczeń w glebie, aby zapobiec ich dalszemu rozprzestrzenianiu się w środowisku), fitoewaporację (pobieranie zanieczyszczeń przez system korzeniowy rośliny, ich metabolizm i uwolnienie w postaci gazowej) oraz fitoekstrakcję (pobieranie zanieczyszczeń i ich akumulacja w nadziemnych częściach roślin, które następnie są ścinane i usuwane z zanieczyszczonego terenu) [11]. Fitoremediacja uznawana jest za prostą i przyjazną środowisku naturalnemu technikę oczyszczania wód gruntowych oraz gleby, która nie wymaga dużych nakładów finansowych. W przeciwieństwie do innych technik remediacji (np. zdejmowanie wierzchniej warstwy gleby i jej oczyszczanie metodami chemicznymi i fizycznymi) może być ona prowadzona na dużych obszarach *in situ*. Wadą tej techniki jest fakt, że całkowite oczyszczenie terenu przez rośliny może trwać dziesięciolecia, a ograniczona tolerancja roślin na zanieczyszczenia nie pozwala na ich wzrost na terenach silnie zdegradowanych [12].

Fitozarządzanie (ang. *phytomanagement*) to stosunkowo nowy kierunek, w którym uprawa roślin w celu rekultywacji terenu wiąże się z wykorzystaniem otrzymanej biomasy w różnych dziedzinach przemysłu, np. przemyśle energetycznym, włókienniczym, papierniczym czy chemicznym [13]. Takie podejście pozwala na uzyskanie zwrotu nakładów finansowych wydatkowanych podczas uprawy, a także na wykorzystanie terenów uważanych za nieużytki rolne, co przy zmniejszającym się areale upraw jest niewątpliwie zaletą. Rośliny zalecane do stosowania w wyżej wymienionym celu powinny charakteryzować się przede wszystkim dużym plonem biomasy oraz potencjalnie wysoką użytecznością w przemyśle, a także dobrą tolerancją na zanieczyszczenia organiczne i nieorganiczne.

Miscanthus x giganteus to gatunek, który może być stosowany do fitoremediacji, a jego biomasa może być wykorzystana w wielu gałęziach przemysłu [6, 12]. Miskant olbrzymi ma zdolność do fitostabilizacji, unieruchomienia zanieczyszczeń w podłożu, co zmniejsza ich rozprzestrzenianie się na skutek erozji wietrznej czy wodnej. Korzenie roślin zmniejszają ruchliwość i dostępność zanieczyszczeń, takich jak metale czy metaloidy, poprzez ich wytrącanie w ryzosferze w formie nieprzyswajalnej lub słabo przyswajalnej dla roślin, adsorpcję na powierzchni korzenia bądź pobieranie i zatrzymywanie w korzeniach. Miskant, podobnie jak inne trawy, należy do tzw. „ekskluderów” (ang. *excluders*), tzn. unika pobierania metali i ich gromadzenia w częściach nadziemnych, co zapobiega ich przenikaniu do łańcuchów troficznych. Uprawa miskanta na terenie zdegradowanym zwiększa ilość materii organicznej w glebie pochodzącej z rozkładu nadziemnych oraz podziemnych części roślin, wsięków korzeniowych, a także wspiera rozwój mikrobiomu ryzosfery i zapewnia częstsze wizyty zwierząt. Prowadzi do przywrócenia funkcjonalności przyrodniczej takiego terenu i wytworzenia zdrowszego ekosystemu [14, 15]. *M. x giganteus* może być uprawiany na terenach zanieczyszczonych związkami nieorganicznymi (np. Cd, Cu, Zn, Ni, As) i organicznymi (np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczny – WWA), występującymi osobno lub na tym samym obszarze [14, 16]. Stosowanie nawozów oraz innych substancji stymulujących

wzrost roślin, np. biostymulantów, łagodzi skutki stresu związanego z obecnością wyżej wymienionych związków i wpływa na uzyskanie wyższego plonu [17].

Badania zdolności *Miscanthus x giganteus* do fitoremediacji terenów zanieczyszczonych metalami i metaloidami wykazały wyższe stężenie tych pierwiastków w częściach podziemnych niż nadziemnych. Dystrybucja tych zanieczyszczeń w roślinie zależy od ich stężenia w glebie, rodzaju i właściwości chemicznych pierwiastków, ale na ogół występują w kolejności malejącej: korzenie > kłocza > pędy > liście. Arsen, ołów i cynk są w większym stopniu gromadzone w liściach niż łodygach, podczas gdy kadm występuje w wyższym stężeniu w łodygach. Współczynnik biokoncentracji (stosunek stężenia metali w częściach nadziemnych do stężenia metali w glebie) oraz współczynnik translokacji (stosunek stężenia metali w częściach nadziemnych do stężenia metali w częściach podziemnych) dla miskanta mają bardzo niskie wartości, co sugeruje niski transfer metali do części nadziemnych. Pora roku oraz wiek plantacji również mają wpływ na potencjał do fitoekstrakcji. Stężenie metali w częściach nadziemnych maleje wraz z wiekiem plantacji. Niższe stężenie metali w pędach i łodygach roślin w starszych uprawach może być spowodowane zwiększeniem objętości i powierzchni korzeni, co skutkuje zwiększoną sekwestracją zanieczyszczeń nieorganicznych w korzeniach i ograniczeniem ich transferu do części nadziemnych [6, 14, 16]. Oczyszczenie terenu przez rośliny techniką fitoekstrakcji jest bardzo długotrwałym procesem, a w przypadku miskanta olbrzymiego, który ma niski potencjał do akumulacji zanieczyszczeń w częściach nadziemnych, jest to proces nieefektywny. *Miscanthus x giganteus* wykazuje wyższy potencjał do fitostabilizacji i fitodegradacji. Wysięgi korzeni miskanta zawierają m.in. związki polifenolowe (np. kwas galusowy, chlorogenowy, kawowy) i flawonoidowe (np. kwercetyna, rutyna, katechina), które są głównymi czynnikami stymulującymi bakterie rozkładające WWA. Ze względu na wieloletni wzrost i zdolność do zatrzymania w glebie metali/metaloidów oraz degradacji niektórych zanieczyszczeń organicznych miskant może zmniejszyć rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń w środowisku poprzez ograniczenie: (i) wypłukiwania zanieczyszczeń ze strefy korzeniowej i zanieczyszczenia wód gruntowych, (ii) skażenia wód powierzchniowych, (iii) emisji pyłu do atmosfery w wyniku erozji wietrznej i sezonowej uprawy gleby [6].

4. Potencjalne wykorzystanie biomasy *Miscanthus x giganteus*

4.1. Wykorzystanie *Miscanthus x giganteus* w przemyśle energetycznym

W ostatnich dekadach, wraz ze wzrostem zapotrzebowania na zrównoważoną produkcję energii ze źródeł odnawialnych, na popularności zyskała produkcja biopaliwa i innych bioproduktów z biomasy roślinnej. Konwencjonalne biopaliwa (tzw. biopaliwa pierwszej generacji) produkowane są z wykorzystaniem skrobi lub cukrów roślinnych, pochodzących np. z pszenicy, kukurydzy, trzciny lub buraków cukrowych [18]. Z roślin uzyskano paliwa stałe, ciekłe i gazowe, a techniki ich wytwarzania są ciągle modernizowane dla osiągnięcia najwyższej efektywności. W przypadku zrównoważonych upraw przeznaczonych do produkcji bioenergii należy połączyć następujące cechy: (i) wysoką produkcję biomasy na hektar, (ii) odpowiedni skład biomasy dla różnych procesów konwersji bioenergii oraz (iii) pozytywny ślad środowiskowy (niewielkie przekształcenie użytkowania gruntów, najniższe zapotrzebowanie na wodę, najniższe nawożenie N, P i K, niska emisja gazów cieplarnianych, niska inwazyjność itp.) [19]. Wydaje się, że uprawy *Miscanthus x giganteus* spełniają powyższe wymagania. Charakteryzują się one

wysokim plonem biomasy, niewielkim zapotrzebowaniem na nawożenie, również niskim śladem węglowym [20]. Zawartość celulozy, hemicelulozy i ligniny w miskancie odgrywa kluczową rolę w kwestii optymalizacji strategii produkcji biochemikaliów i biopaliw. Zbiór miskanta w lutym na ogół prowadzi do wyższej zawartości celulozy i hemiceluloz, a niższej zawartości ligniny oraz niższej zawartości popiołu (co jest korzystne dla wydajnego procesu uzyskania energii) niż zbiór przeprowadzony jesienią. Skład pierwiastkowy suchej masy miskanta olbrzymiego to: od 47,1% do 49,7% C, od 5,38% do 5,92% H i od 41,4% do 44,6% O, a także śladowe ilości K, Cl oraz N. Pierwiastki te odgrywają ważną rolę w jakości spalania biomasy roślinnej. Wysokie stężenie K i Cl może zmniejszyć temperaturę topnienia popiołu, a wysokie stężenie N może skutkować emisją tlenków azotu do atmosfery. Skład mineralny jest zależny od lokalizacji uprawy, nawożenia oraz czasu zbiorów. Rośliny zebrane wczesną wiosną cechują się niższym stężeniem K, Cl, N, co korzystnie wpływa na jakość spalania [21]. Biomasa miskanta olbrzymiego w wyniku procesów technologicznych, takich jak: piroliza, fermentacja, zagazowanie, synteza Fischera-Tropscha, przekształcana jest na biogaz, bioetanol, bioolej, pellet oraz brykiet [20, 22]. Ciepło spalania słomy miskanta olbrzymiego waha się od 17 MJ kg⁻¹ do 20 MJ kg⁻¹ s.m. i jest porównywalne z energią otrzymywaną przy spalaniu słomy pszennej, kukurydzy, konopi [21]. Spalany pellet z *Miscanthus x giganteus* wykazał wartość energetyczną osiągającą 29 kJ·g⁻¹. [6]. Miskant olbrzymi może być z powodzeniem wykorzystywany w przemyśle energetycznym, a stosowanie odpowiednich agrotechnik może poprawić wydajność procesu uzyskiwania energii z biomasy.

4.2. Wykorzystanie *Miscanthus x giganteus* do produkcji surowców w przemyśle chemicznym, papierniczym, farmaceutycznym i spożywczym

Podczas obróbki wstępnej oraz termicznej słomy miskanta w procesie uzyskiwania biopaliwa generowana jest duża ilość produktów ubocznych, które zgodnie z głównym celem optymalizacji tego procesu również wykorzystywane są w innych gałęziach przemysłu.

Lignina ekstrahowana metodą Organosolv posiada cenne właściwości, np. wysoką hydrofobowość, niską temperaturę zeszklenia i niską polidispersyjność. Ligniny te mogą zostać zastosowane w produkcji biodegradowalnych polimerów i klejów, gdzie zastępują fenole. Preparat składający się w 20% z ligniny oraz 80% z żywicy fenolowej miał konkurencyjne właściwości dla produktu przygotowanego w 100% z żywicy fenolowej [23]. Zastosowanie wyższego stężenia ligniny spowodowało pogorszenie właściwości żywicy, prawdopodobnie przez jej niską reaktywność. Ligniny są uważane za cenne źródło preciwutleniających związków fenolowych, dlatego rozważa się możliwość ich dodania do żywności funkcjonalnej i paszy dla zwierząt. Wykazano, że głównymi czynnikami decydującymi o aktywności antyoksydacyjnej tej substancji jest zawartość fenolowych grup hydroksylowych oraz czystość frakcji ligniny [6, 23].

Ksylan, składnik hemicelulozy, to kolejny produkt uboczny obróbki miskanta, który ma potencjalne zastosowanie w przemyśle spożywczym, paszowym i farmaceutycznym. Wodna hydroliza miskanta przeprowadzona w temperaturze od 160°C do 200°C uznana jest za skuteczny sposób otrzymywania ksylanu [24].

Ze względu na wysoką zawartość celulozy w pędach (do 50%) słoma z miskanta była badana jako potencjalny surowiec do produkcji papieru i opakowań tekturowych. Potwierdzono użyteczność miskanta w przemyśle papierniczym, jednak otrzymane z niego pro-

dukty charakteryzują się niską wytrzymałością na rozdarcie i rozciągnięcie, co ogranicza możliwości ich wykorzystania [25, 26].

Odzyskiwanie frakcji ekstrakcyjnej może być postrzegane jako obiecujące źródło składników o niskiej masie cząsteczkowej, jak sterole i związki aromatyczne. Analiza lipofilowych ekstraktów z miskanta po wstępnej obróbce tego surowca wykazała wysokie stężenie związków takich jak: wanilina, aldehyd syringowy oraz kwasy ferulowe, waniłowe i p-kumarowe, wykorzystywanych w przemyśle farmakologicznym [27].

4.3. *Miscanthus x giganteus* jako materiał budowlany i izolacyjny

Miskant od wieków wykorzystywany był jako strzecha na domach w Japonii. W latach 90. XX wieku rozpoczęto krycie dachów domów ekologicznych słomą z miskanta w Danii, Irlandii i Wielkiej Brytanii [6]. Obecnie z miskanta produkuje się płyty pilśniowe, płyty wiórowe, beton budowlany i materiał izolacyjny zwany lekkim betonem. Miskant może być wykorzystany do produkcji wyżej wymienionych materiałów dzięki wysokiej zawartości celulozy we włóknach (od 38% do 42% s.m.) [1]. Porównano odporność na rozciąganie lekkiego betonu wyprodukowanego z pędów oraz z kłączy miskanta. Materiał otrzymany z pędów miał od 3,5 raza do 4 razy wyższą odporność na rozciąganie niż ten wyprodukowany z kłączy. Określono zawartość celulozy zarówno w kłęczach (od 26,9% do 30,7%), jak i w pędach (47%), co potwierdza tezę, że wysoka zawartość celulozy ma wpływ na właściwości otrzymanych z miskanta materiałów [1, 28]. Obecnie najczęściej do produkcji płyt wiórowych wykorzystywany jest świerk. Wióry do produkcji płyt ze świerka zawierają 45% celulozy i 28% ligniny, podczas gdy te z miskanta zawierają 38% celulozy i 17% ligniny. Ilość hemiceluloz jest taka sama dla świerka i miskanta (21%). Określono, że właściwości mechaniczne płyt wiórowych z miskanta były niższe niż płyt wiórowych z świerka, jednak nadal spełniają one wymagania dla płyt wiórowych ogólnego zastosowania w warunkach suchych określonych w normie EN 312 „Płyty wiórowe – Wymagania techniczne – Wymagania ogólne dla wszystkich rodzajów płyt” [29]. Prowadzone są badania nad udoskonaleniem materiałów budowlanych i izolacyjnych z *Miscanthus x giganteus*, które opierają się np. na zmianie dodatków do kompozytów oraz stosowaniu różnej wielkości włókien.

4.4. Wykorzystanie miskanta olbrzymiego w rolnictwie i ogrodnictwie

Słoma z *M. x giganteus* jest cennym surowcem wykorzystywanym w rolnictwie i ogrodnictwie m.in. jako ściółka w celu zatrzymania wilgoci w glebie, zahamowania wzrostu chwastów oraz zapobieganiu erozji powierzchniowej oraz jako ściółka wyścielająca dla zwierząt gospodarskich. Biowęgiel otrzymany w procesie pirolizy miskanta może być stosowany jako dodatek poprawiający żyzność gleby oraz zwiększający plonowanie niektórych upraw, np. kukurydzy. Z suszonych pędów wytwarzane są podpórki dla roślin doniczkowych [6].

Miskant jest cenioną rośliną ozdobną wykorzystywaną do wysadzeń w ogrodach i w parkach. Popularne jest tworzenie żywopłotów z *Miscanthus* przy ogrodzeniach, gdzie stanowią barierę dla pyłu i kurzu z drogi. Przekwitłe wiechy miskanta pozostają na pędach przez całą zimę urozmaicając zimowy krajobraz [30]. Ze względu na mocny, rozbudowany system korzeniowy miskant olbrzymi znalazł również zastosowanie do utrwalania i zabezpieczania przed erozją terenów pochyłych, zboczy dróg oraz wąwozów [31].

5. Podsumowanie

Tereny zanieczyszczone na skutek dynamicznego rozwoju gospodarki, a także nieprawidłowego zarządzania odpadami stanowią dużą powierzchnię terenów zdegradowanych. Ich zrównoważone wykorzystanie staje się, w dobie zmniejszającego się areалу upraw na świecie przy jednoczesnym rosnącym zapotrzebowaniu na żywność, energię i produkty pochodzenia roślinnego, tematem myśli i badań naukowców. *Miscanthus x giganteus* to jeden z gatunków roślin, który dzięki niskim wymaganiom glebowym i wysokiej tolerancji na zanieczyszczenia może być uprawiany na terenach zanieczyszczonych, zapewniając szerokie spektrum korzyści zarówno dla środowiska, jak i człowieka (tzw. usługi ekosystemów, ang. *ecosystem services*). Zasiedlanie miskantem terenów zanieczyszczonych przyczynia się do ograniczenia erozji gleb i rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń (fitostabilizacja), zapewnia odbudowę struktury i funkcjonalności gleby, a także zachodzenie naturalnych cykli hydrologicznych i biochemicznych związanych z obiegiem wody i pierwiastków w przyrodzie. Pełni funkcję estetyczną – wprowadzenie łąnów dekoracyjnej trawy na zanieczyszczone nieużytki polepsza komfort życia zamieszkałej w pobliżu ludności. Uprawa *M. x giganteus* na terenach zdegradowanych pozwala na stopniowe oczyszczanie terenu z zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych przy jednoczesnym czerpaniu zysków z wyprodukowanej biomasy przeznaczonej do wykorzystania w wielu dziedzinach przemysłu. Biomasa miskanta znalazła zastosowanie w przemyśle energetycznym, chemicznym, budowlanym, papierniczym, w rolnictwie i ogrodnictwie.

Uwagi ogólne

Badania finansowane z projektu badawczego pt. „Bridging the gap between phytoremediation solutions on growing energy crops on contaminated lands and clean biofuel production (GOLD)” w ramach programu Horyzont 2020 (umowa nr 101006873).

Literatura

1. Dias P.P., Waldmann D., *Optimisation of the mechanical properties of Miscanthus lightweight concrete*, Construction and Building Materials, 258, 2020, 119643.
2. Lewandowski I., Clifton-Brown J.C., Scurlock J.M.O., Huisman W., *Miscanthus: European experience with a novel energy crop*, Biomass and Bioenergy, 19, 2000, s. 209-227.
3. Kowalska A., *Charakterystyka roślin energetycznych jako potencjalnego surowca do produkcji biogazu*, Eliskir, 1(5), 2017, s. 11-15.
4. Podleśny J., *Trawa Miscanthus x giganteus – jej charakterystyka oraz możliwości wykorzystania*, Postępy Nauk Rolniczych, 2, 2005, s. 41-52.
5. Kotecki A. (red.), *Uprawa miskanta olbrzymiego. Energetyczne i pozaenergetyczne możliwości wykorzystania słomy*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2010, s. 138-146.
6. Nsanganwimana F., Pourrut B., Mench M., Douay F., *Suitability of Miscanthus species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review*, Journal of Environmental Management, 143, 2014, s. 123-134.
7. Santini N.S., Miquelajaugue Y., *The Restoration of degraded lands by local communities and indigenous peoples*, Frontiers in Conservation Science, 3, 2022, 873659.
8. Mench M.J., Dellise M., Bes C.M., Marchand L., Kolbas A., Le Coustumer P., Oustrière N., *Phytomanagement and remediation of Cu-contaminated soils by high yielding crops at a former wood preservation site: Sunflower biomass and ionome*, Frontiers in Ecology and Evolution, 6, 2018, s. 123.

9. <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3> [data dostępu: 26.03.2023].
10. Csikós N., Tóth G., *Concepts of agricultural marginal lands and their utilisation: A review*, Agricultural Systems, 204, 2023, 103560
11. Grzegórska A., Czaplicka N., Antonkiewicz J., Rybarczyk P., Baran A., Dobrzyński K., Zabrocki D., Rogala A., *Remediation of soils on municipal rendering plant territories using Miscanthus x giganteus*, Environmental Science and Pollution Research, 30, 2023, s. 22305-22318.
12. Perlein A., Bert V., Fernandes de Souza M., Papin A., Meers E., *Field evaluation of industrial non-food crops for phytomanaging a metal-contaminated dredged sediment*, Environmental Science and Pollution Research, 128, 2023.
13. Garbisu C., Alkorta I., Kidd P., Epelde L., Mench M., *Keep and promote biodiversity at polluted sites under phytomanagement*, Environmental Science and Pollution Research, 27, 2020, s. 44820-44834.
14. Técher D., Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., Martinez-Chois C., D’Innocenzo M., Falla J., *Prospects of Miscanthus x giganteus for PAH phytoremediation: A microcosm study*, Industrial Crops and Products, 36, 2012, s. 276-281.
15. Nebeská D., Trögl J., Podlisniuk W., Popelka J., Dáňová P.V., Usťak S., Honzík R., *Effect of growing Miscanthus x giganteus on soil microbial communities in post-military soil*, Sustainability, 10, 2018, s. 4021.
16. Muratova A., Lyubun Y., Sungurtseva I., Turkovskaya O., Nurzhanova A., *Physiological and biochemical characteristic of Miscanthus x giganteus grown in heavy metal – oil sludge co-contaminated soil*, Journal of Environmental Sciences, 115, 2022, s. 114-125.
17. Andrejić G., Šinžar-Sekulić J., Prica M., Dželetović Ž., Rakić T., *Phytoremediation potential and physiological response of Miscanthus x giganteus cultivated on fertilized and non-fertilized flotation tailings*, Environmental Science and Pollution Research, 26, 2019, s. 34658-34669.
18. Mohr A., Raman S., *Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels*, Energy Policy, 63, 2013, s. 114-122.
19. Abreu M., Silva L., Ribeiro B., Ferreira A., Alves L., Paixão S.M., Gouveia L., Moura P., Carvalheiro F., Duarte L.C., Fernando A.L., Reis A., Gírio F., *Low indirect land use change (ILUC) energy crops to bioenergy and biofuels – a review*, Energies, 15, 2022, s. 4348.
20. Arnoult S., Brancourt-Hulmel M., *A review on Miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding*, BioEnergy Research, 8, 2015, s. 502-526.
21. Brosse N., Dufour A., Meng X., Qining S., Ragauskas A., *Miscanthus: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production*, Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 5, 2012, s. 580-598.
22. Kiesel A., Lewandowski I., *Miscanthus as biogas substrate – cutting tolerance and potential for anaerobic digestion*, GCB Bioenergy, 9, 2017, s. 153-167.
23. El Hage R., Brosse N., Navarrete P., Pizzi A., *Extraction, characterization and utilization of organosolv Miscanthus lignin for the conception of environmentally friendly mixed tannin/lignin wood resins*, Journal of Adhesion Science and Technology, 25, 2011, s. 1549-1560.
24. Ligeró P., van der Kolk J.C., de Vega A., van Dam J.E.G., *Production of xylo-oligosaccharides from Miscanthus x giganteus by autohydrolysis*, BioResources, 6, 2011, s. 4417-4429.
25. Danielewicz D., Surma-Ślusarska B., Żurek G., Martyniak D., Kmiołek M., Dybka K., *Selected grass plants as biomass fuels and raw materials for papermaking, Part II. Pulp and paper properties*, BioResources, 10(4), 2015, s. 8552-8564.

26. Janiszewska D., Żurek G., Martyniak D., Bałęczny W., *Lignocellulosic biomass of C3 and C4 perennial grasses as a valuable feedstock for particleboard manufacture*, *Materials*, 15, 2022, s. 6384.
27. Villaverde J.J., Domingues R.M.A., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Pascoal Neto C., Ligerio P., Vega A., *Miscanthus x giganteus extractives: a source of valuable phenolic compounds and sterols*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2009, s. 3626-3631.
28. Chupin L., Arnoult S., Brancourt-Hulmel M., Lapiere C., Gineau E., Navard P., *Polyethylene composites made from below-ground miscanthus biomass*, *Industrial Crops and Products*, 109, 2015, s. 523-528.
29. Klímek P., Wimmer R., Meinschmidt P., Kúdela J., *Utilizing Miscanthus stalks as raw material for particleboards*, *Industrial Crops and Products*, 111, 2018, s. 270-276.
30. Dudkiewicz M., Bolibok Ł., *Wybrane rośliny energetyczne jako element kształtowania krajobrazu*, *Acta Scientiarum Polonorum. Formatio Circumiecetus*, 10, 2011, s. 13-20.
31. Kopeć P., Płażek A., *An attempt to restore the fertility of Miscanthus x giganteus*, *Agronomy*, 13(2), 2023, s. 323.

***Miscanthus x giganteus* jako roślina użyteczna w zrównoważonym wykorzystaniu terenów zanieczyszczonych**

Streszczenie

Miscanthus x giganteus to wieloletnia trawa uzyskana przez skrzyżowanie *Miscanthus sacchariflorus* i *Miscanthus sinensis*. Charakteryzuje się wysokim plonem biomasy (od 15 t ha⁻¹ do 30 t ha⁻¹ rocznie), niskimi wymaganiami glebowymi, znaczną odpornością na szkodniki oraz wysoką tolerancją na zanieczyszczenia organiczne i nieorganiczne. Może być wykorzystywany do rekultywacji zdegradowanych terenów dzięki zdolności do fitoremediacji. Miskant olbrzymi wykorzystywany jest w przemyśle energetycznym, chemicznym, budowlanym, papierniczym, ogrodnictwie i rolnictwie. Słoma miskanta posiada pożądany dla roślin energetycznych skład chemiczny (niska zawartość K, Cl, N), a jej ciepło spalania jest porównywalne do ciepła spalania innych uznanych roślin energetycznych (pszenica, kukurydza, konopie). Produkty uboczne powstałe podczas procesu uzyskania energii z miskanta mogą być wykorzystane w produkcji biopolimerów, klejów, pasz dla zwierząt i w przemyśle farmaceutycznym. Słoma *M. x giganteus* jest wykorzystywana od wieków w budownictwie jako materiał na strzechy, a obecnie do produkcji m.in. lekkiego betonu, płyt wiórowych. W rolnictwie i ogrodnictwie znalazła zastosowanie jako ściółka. Jego uprawa na terenach zanieczyszczonych przynosi podwójną korzyść: (i) stopniowe oczyszczenie środowiska w procesie fitoremediacji oraz (ii) uzyskanie korzyści finansowych dzięki przeznaczeniu otrzymanej biomasy do celów przemysłowych, w tym energetycznych.

Słowa kluczowe: fitoremediacja, fitozarządzanie, *Miscanthus x giganteus*

***Miscanthus x giganteus* as a plant useful in the sustainable use of polluted land**

Abstract

Miscanthus x giganteus is a perennial grass obtained by crossing *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis*. It is characterized by a high yield of biomass (from 15 t ha⁻¹ to 30 t ha⁻¹ per year), low soil requirements, significant resistance to pests, and high tolerance to organic and inorganic pollution. It can be used for the reclamation of degraded areas due to its phytoremediation ability. *Miscanthus* giant can be used in the energy, chemical, construction, paper industries, as well as in gardening and agriculture. *Miscanthus* straw has a chemical composition desirable for energy plants (low content of K, Cl, N) and its heat of combustion is comparable to the heat of combustion of other recognized energy plants (wheat, corn, hemp). By-products generated during the process of obtaining energy from *Miscanthus* can be used in the production of biopolymers, adhesives, animal feed and in the pharmaceutical industry. *M. x giganteus* straw has been used for centuries in construction, as a material for thatching and currently for the production of e.g. light-weight concrete or chipboard. It is used as a mulch in agriculture and gardening. Its cultivation in polluted areas brings a double benefit: (i) gradual cleaning up of the environment in the phytoremediation process and (ii) obtaining financial benefits due to the use of the obtained biomass for industrial purposes, including energy production.

Keywords: phytoremediation, phytomanagement, *Miscanthus x giganteus*

Wpływ stosowania diety bogatej w orzechy na funkcjonowanie układu krążenia – przegląd badań

1. Wstęp

Choroby sercowo-naczyniowe (CVD, ang. *cardiovascular disease*) są istotnym problemem zdrowotnym zarówno w Polsce, jak i na świecie. Obejmują między innymi chorobę niedokrwienną serca (IHD, ang. *ischemic heart disease*), niedokrwienny udar mózgu i chorobę tętnic obwodowych. Wspólnym podłożem powyższych jednostek chorobowych jest proces miażdżycowy toczący się w różnych obszarach układu krążenia [1].

Choroby sercowo-naczyniowe, obok nowotworów, cukrzycy oraz przewlekłych chorób układu oddechowego, należą do grupy chorób niezakaźnych, które stanowią główną przyczynę zgonów na świecie [2]. Dane pochodzące z European Heart Network [1] wykazują, że choroby układu sercowo-naczyniowego są przyczyną prawie połowy zgonów w krajach Unii Europejskiej (42%) [1]. W 2013 roku z przyczyn kardiologicznych zmarło w Polsce ponad 177 tys. osób, co stanowiło 45,8% wszystkich zgonów. Choroby układu krążenia częściej dotyczą kobiet, także umieralność wskutek tych schorzeń jest w tej grupie zdecydowanie wyższa niż wśród mężczyzn. W 2013 roku w wyniku przyczyn z zakresu chorób układu krążenia zmarło 95 tys. kobiet, co stanowiło 51% wszystkich ich zgonów. Wśród mężczyzn odsetek był o ok. 10 punktów procentowych mniejszy i wynosił: w 2013 roku ok. 41% (82,5 tys. zgonów) [3].

Choroby układu krążenia są ściśle związane ze stylem życia i poddającymi się modyfikacji czynnikami ryzyka. Do takich czynników zalicza się: nadciśnienie tętnicze, otyłość, zaburzenia gospodarki lipidowej, cukrzyca, palenie papierosów oraz brak aktywności fizycznej. Inne czynniki, które również przyczyniają się do ryzyka chorób sercowo-naczyniowych to stres, nadmierne spożycie alkoholu i nieprawidłowa dieta. Zmiana stylu życia, z naciskiem na zaprzestanie palenia i modyfikację diety, jest skutecznym podejściem do profilaktyki i leczenia czynników ryzyka CVD oraz cukrzycy [1, 4, 5].

Obecne wytyczne zalecają stosowanie diety zbilansowanej z wysokiej jakości produktów spożywczych. Podstawą odżywiania w zbilansowanej diecie są pokarmy pochodzenia roślinnego, takie jak nieprzetworzone warzywa, owoce, produkty pełnoziarniste, rośliny strączkowe i orzechy, w ograniczonym stopniu spożycie żywności pochodzenia zwierzęcego [6]. W niniejszej pracy przedstawiono korzystny wpływ diety bogatej w orzechy na funkcjonowanie układu krążenia.

2. Wartość odżywcza orzechów

Orzechy są jednym z naturalnych pokarmów roślinnych bogatych w tłuszcze, po olejach roślinnych, o całkowitej zawartości tłuszczu od 46% w orzechach nerkowca i pistacjach do 76% w orzechach makadamia. Skład orzechów pod względem kwasów tłuszczowych jest korzystny. Orzechy zawierają stosunkowo małą ilość, tj. od 4% do

¹ kinga.bleja@gmail.com, Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika.

16%, nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA, ang. *saturated fatty acids*), a prawie połowa całkowitej zawartości tłuszczu to tłuszcze nienasycone. Spośród tłuszczy nienasyconych orzechy zawierają głównie jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA, ang. *monounsaturated fatty acids*) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acids*), przede wszystkim kwas linolowy (LA, ang. *linoleic acid*), który występuje głównie w orzechach brazylijskich, orzeszkach pinii i orzechach włoskich [7-9]. Orzechy włoskie są również bogatym źródłem kwasu α -linolenowego (ALA, ang. *alpha-linolenic acid*), kwasu tłuszczowego n-3. Korzystny profil kwasów tłuszczowych orzechów jest jednym z czynników decydujących o ich prozdrowotnych właściwościach [8, 9].

Orzechy są również bogatym źródłem innych bioaktywnych makroskładników odżywczych o potencjalnych korzyściach zdrowotnych [10]. Orzechy są dobrym źródłem białka (średnio ok. 16%) i mają wysoką zawartość aminokwasu L-argininy [8, 9]. L-arginina jest prekursorem tlenu azotu, silnego czynnika rozszerzającego naczynia krwionośne, odpowiedzialnego za regulację napięcia naczyń i ciśnienia krwi [6, 11].

Orzechy są dobrym źródłem błonnika pokarmowego, którego zawartość wynosi od 4 g do 11 g na 100 g [12]. Błonnik oprócz poprawy mikroflory jelitowej wpływa także na redukcję czynników będących prekursorami chorób układu krążenia, takich jak: nadciśnienie tętnicze, wysokie stężenie cholesterolu we krwi, a także obecność biomarkerów odpowiedzialnych za stany zapalne w organizmie [13].

Orzechy są bogatym źródłem polifenoli i witamin. Zawierają tiaminę (witaminę B₁) oraz kwas foliowy (witaminę B₉) i witaminę B₆. Orzechy są doskonałym źródłem witaminy E (α - tokoferolu), która chroni organizm przed działaniem wolnych rodników [14]. Większość przeciwutleniaczy w orzechach znajduje się w skórce lub zewnętrznej miękkiej skorupie, co oznacza, że znaczne ilości wartości odżywczych są tracone podczas obierania lub prażenia orzechów [15, 16].

Orzechy nie zawierają cholesterolu, a ich frakcja tłuszczowa posiada spore ilości fitosteroli (PS, ang. *plant sterols*), które prawdopodobnie przyczyniają się do obniżenia poziomu cholesterolu [17-19].

Pod względem zawartości składników mineralnych, takich jak wapń (Ca), magnez (Mg) i potas (K), orzechy posiadają optymalną wartość odżywczą. Podobnie jak w przypadku większości warzyw, zawartość sodu (Na) w orzechach jest bardzo niska. Wysokie spożycie Ca, Mg i K, wraz z niskim spożyciem Na, wiąże się z ochroną przed nadciśnieniem, insulinoopornością i ogólnym niższym ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [8].

3. Przegląd wyników badań na temat wpływu stosowania diety bogatej w orzechy na funkcjonowanie układu krążenia

W 2010 roku Ma Y. i wsp. [22] przeprowadzili badania randomizowane z próbą ślepą dotyczące wpływu codziennego spożycia orzechów włoskich na funkcję śródbłonna, biomarkery sercowo-naczyniowe i pomiary antropometryczne u osób z cukrzycą typu II. W badaniu wzięło udział 14 kobiet i 10 mężczyzn, których średnia wieku wynosiła 58 lat. Pacjenci codziennie przez 8 tygodni przyjmowali porcję 56 g orzechów włoskich. Uczestnicy zostali przebadani pod kątem czynności śródbłonna (mierzone jako rozszerzenie zależne od przepływu FMD, ang. *flow-mediated dilatation*), oceniono lipidy w osoczu, poziom hemoglobiny glikowanej, glukozy i insuliny na czczo oraz wykonano pomiary antropometryczne [22].

Tabela 1. Wartość odżywcza orzechów – makro- i mikroelementy oraz wybrane składniki (w 100 g)

ORZECHY	Jedn.	Migdały	Orzechy brazylijskie	Orzechy nerkowca	Orzechy laskowe	Orzechy makadama	Orzechy ziemne	Orzechy pekan	Orzechy piniowe	Pistacje	Orzechy włoskie	Zalecane spożycie u os. dorosłych
Wartość energ.	(kJ)	2418	2743	2314	2629	3004	2220	2889	2816	2332	2738	9420 wg GDA
Białka	(g)	21,3	14,3	18,2	15	7,9	25,8	9,2	13,7	20,6	15,2	50-60 wg GDA
Błonnik	(g)	8,8	8,5	5,9	10,4	6	8,5	8,4	3,7	9	6,4	25 wg GDA
Tłuszcze	(g)	50,6	66,4	46,4	60,8	75,8	49,2	72	68,4	44,4	65,2	>70 wg GDA
SFA	(g)	3,9	15,1	9,2	4,5	12,1	6,8	6,2	4,9	5,4	6,1	jak najniższe wg GDA
MUFA	(g)	32,2	24,5	27,3	45,7	58,9	24,4	40,8	18,8	23,3	8,9	BD
PUFA	(g)	12,2	20,6	7,8	7,9	1,5	15,6	20,6	33,2	13,2	47,2	BD
LA	(g)	12,2	20,5	7,7	7,8	1,3	15,6	20,6	33,2	13,2	38,1	4 % energii diety wg AI
ALA	(g)	0	0,05	0,15	0,09	0,21	0	1	0,16	0,25	9,08	0,5 % energii diety wg AI
Na	(mg)	1	3	12	0	5	18	0	2	1	2	1500 wg AI
K	(mg)	728	659	660	680	368	705	410	597	1025	441	3500 wg AI
Ca	(mg)	248	160	37	114	85	92	70	16	107	98	1000-1300 wg RDA
Polifenole	(mg)	287	244	233	687	126	396	1816	58	1420	1558	100-1000 wg RDA
PS	(mg)	120	-	158	96	116	220	102	141	214	72	BD

SFA – nasycone kwasy tłuszczowe, MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe, LA – kwas linolowy, ALA – kwas α -linolenowy, Na – sód, K – potas, Ca – wapń, PS – fitosterole, BD – brak danych, RDA – zalecane dzienne spożycie, AI – wystarczające spożycie, GDA – referencyjne wartości wskazanego dziennego spożycia dla osób dorosłych

Źródło: opracowanie własne na podstawie [8, 20, 21].

Badanie to wykazało, że orzechy włoskie poprawiają funkcję śródbłonna w grupie osób z cukrzycą typu II. Badania opublikowane przez Katz i wsp. (2012) [23] wykazały zauważalną poprawę funkcji śródbłonna w grupie osób z nadwagą i otyłością trzewną [23]. Wyniki te były zgodne z wcześniejszymi danymi wykazującymi, że spożywanie orzechów włoskich poprawia funkcję śródbłonna u dorosłych z hipercholesterolemią [24]. Orzechy włoskie odróżniają się od innych rodzajów orzechów wyższą zawartością kwasu α -linolenowego, który posiada właściwości przeciwmiażdżycowe i przeciwartmicyjne [22].

Badacze stawiają hipotezę, że orzechy włoskie poprawiają funkcję śródbłonna poprzez zwiększenie płynności błony komórek. Zwiększona płynność błony komórek śródbłonna ułatwia uwalnianie tlenu azotu, co może być jednym z mechanizmów działania orzechów. Innym mechanizmem, który może odgrywać rolę, jest poziom cząsteczki adhezyjnej komórek naczyń, który może być zmniejszony przez dietę bogatą w orzechy włoskie. Zmniejszenie poziomu tej cząsteczki adhezyjnej prowadzić może do osłabienia aktywności śródbłonna [22].

Zaobserwowano również nieznaczne obniżenie cholesterolu całkowitego i LDL w porównaniu z wartościami wyjściowymi. Wykazano, że dieta wzbogacona o orzechy włoskie nie wpływa na masę ciała ani BMI pacjentów. Zanotowano wzrost poziomu glukozy w osoczu na czczo u pacjentów spożywających orzechy włoskie, natomiast poziom insuliny i hemoglobiny glikowanej nie uległ istotnej zmianie. Zaobserwowano również spadek ciśnienia krwi u pacjentów stosujących dietę bogatą w orzechy [22].

Barbour i wsp. [25] w 2014 roku opublikowali przegląd badań oceniających funkcję śródbłonna, poziom markerów stanu zapalnego, pomiar ciśnienia krwi, stężenie glukozy i zdolności poznawcze w połączeniu ze spożyciem orzechów. Do przeglądu włączono 71 badań. Łącznie w 44 badaniach oceniano ciśnienie krwi, w 32 oceniono regulację poziomu glukozy, w 31 oceniono poziom markerów stanu zapalnego, w 9 oceniono

funkcję rozszerzenia naczyń śródłonka, w 2 oceniono podatność tętnic, a w 4 oceniono sprawność poznawczą.

W badaniach wykorzystano 9 rodzajów orzechów: migdały, orzechy brazylijskie, orzechy nerkowca, orzechy laskowe, makadamia, orzeszki ziemne, pistacje, orzechy pekan i orzechy włoskie. Większość badań dotyczyła orzechów włoskich, migdałów i orzechów mieszanych [25].

W badaniach nad wpływem orzechów na regulację stężenia glukozy wykazano zmniejszenie stężenia insuliny na czczo o 14%, niewielki spadek stężenia glukozy na czczo i hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Wskazuje to na pozytywny wpływ spożycia orzechów na glikemię. Reasumując, istnieje wiele dowodów przedstawiających korzystny wpływ spożycia orzechów na kontrolę glikemii i wrażliwość na insulinę obserwowaną po upływie od 4 do 6 tygodni stosowania diety bogatej w orzechy. Jednak jest wiele niespójności utrudniających wyciągnięcie precyzyjnych wniosków na temat roli orzechów w tym względzie [25].

Rozważając wpływ spożycia orzechów na ciśnienie krwi, z dostępnych wyników badań obliczono, że w 24 z 36 badań ciśnienie skurczowe i rozkurczowe uległy obniżeniu o odpowiednio 0,73% i 0,75%. Zaobserwowano poprawę kontroli ciśnienia krwi, zwłaszcza gdy orzechy były spożywane regularnie przez dłuższy czas. Mimo iż wpływ spożycia orzechów na ciśnienie krwi wydaje się niewielki, to może mieć istotne znaczenie w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych [25].

Omawiając badania mierzące wpływ spożycia orzechów na poziom markerów stanu zapalnego, najczęściej oceniano wartość CRP (ang. *C-reactive protein*) oraz komórki cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule-1*, VCAM-1, ang. *vascular cell adhesion molecule-1*). Wykazano, że spożycie orzechów może poprawić poziomy markerów stanu zapalnego, szczególnie przy dawkach orzechów 30 g/dzień lub większych [25].

Kolejne badania dotyczyły wpływu spożycia orzechów na funkcję rozszerzenia naczyń śródłonka. Po spożyciu orzechów zaobserwowano wzrost względnego rozszerzenia naczyń o 19,7%. To sugeruje, że spożycie orzechów, zwłaszcza włoskich, ma pozytywny wpływ na funkcjonowanie śródłonka. Dysfunkcje śródłonka mogą być zauważone przed podwyższonym ciśnieniem krwi. Dlatego też mogą one stanowić czuły wskaźnik wczesnego pogorszenia stanu naczyń krwionośnych [25].

Wraz z Millions Veteran Program (MVP) Ivey i wsp. (2021) [6] przeprowadzili prospektywne badanie, które miało na celu przetestowanie hipotezy, że wielkość spożycia orzechów jest odwrotnie proporcjonalna do ryzyka wystąpienia udaru, choroby wieńcowej i śmiertelności z powodu chorób układu krążenia. W latach od 2011 do 2018 do programu zarejestrowano łącznie 179 827 uczestników. Uczestnicy programu nie mieli rozpoznanych chorób kardiologicznych. Ocenę ilości spożycia orzechów przeprowadzono za pomocą kwestionariuszy częstości jedzenia. Zdarzenia związane z udarem mózgu i chorobami układu krążenia zostały ustalone za pomocą elektronicznej dokumentacji medycznej. Obserwacja trwała 3,5 roku. Za pomocą modelu regresji Coxa badacze obliczyli skorygowany współczynnik ryzyka dla mierzonych zmiennych [6].

W trakcie obserwacji zidentyfikowano 3362 nowe przypadki udaru niedokrwiennego mózgu. Wśród osób spożywających orzechy więcej niż 5 razy w tygodniu stwierdzono zmniejszone ryzyko wystąpienia udaru (o 19%), choroby niedokrwiennej serca (o 22%),

mniejsze prawdopodobieństwo zgonu z powodu CVD w porównaniu do osób, które rzadko lub wcale nie spożywały orzechów [6].

Wpływ spożywania orzechów na zmniejszone ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych może wynikać z poprawy profilu lipidowego w surowicy ze względu na zmniejszenie stężenia cholesterolu całkowitego oraz możliwość zmniejszenia stężenia apolipoproteiny B w liniowej zależności dawka–odpowiedź. Działanie protekcyjne może również związane być z działaniem zawartej w orzechach L-argininy, która może poprawiać funkcję naczyń krwionośnych [6].

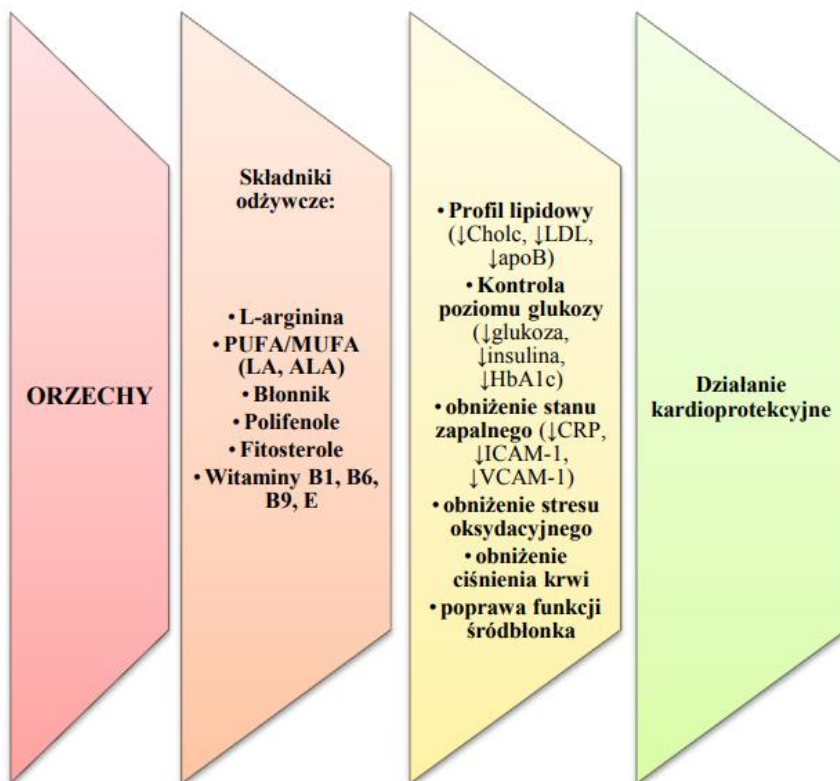
Bitok E. i wsp. [26] w 2018 roku przeprowadzili przegląd badań obserwacyjnych i badań z randomizacją z ostatnich 25 lat, w których oceniono wpływ spożycia orzechów na CVD. Na podstawie analizowanych danych stwierdzono, że istnieje silny związek między spożyciem orzechów a zmniejszonym ryzykiem choroby niedokrwiennej serca, zawału mięśnia sercowego i nagłej śmierci. Wyniki badań obserwacyjnych były poparte danymi pochodzącymi z randomizowanych badań, które wykazały, że orzechy zapewniają korzyści kardioprotekcyjne przede wszystkim poprzez obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego, stężenia LDL i apoB. Wiele badań wskazuje również, że spożywanie orzechów może obniżać stres oksydacyjny, stany zapalne, a także poprawić funkcję śród-błonka [26].

Morgillo i wsp. [27] wykonali przegląd literaturowy w poszukiwaniu dowodów na poparcie tezy dotyczącej wpływu spożycia orzechów drzewnych i orzeszków ziemnych w dawkach dziennych od 15 g do 128 g na wyniki pomiarów funkcji naczyniowych. Łącznie przeanalizowano 16 badań. Uwzględniono tylko nieinwazyjne techniki stosowane do oceny czynności naczyń, takie jak prędkość fali tętna, analiza fali tętna, cyfrowy puls objętościowy, kardiografia impedancyjna, napięcie tętnic za pomocą pletyzmografii. Wykluczono badania opisujące wyniki pomiarów FMD. W przeglądzie badań wzięto pod uwagę tylko recenzowane badania interwencyjne oceniające co najmniej 1 rodzaj orzechów oraz ich wpływ na czynność naczyń [27].

Przegląd danych literaturowych wykazał, że badania oceniające wpływ spożycia orzechów i orzeszków ziemnych na funkcje naczyniowe były niejednoznaczne. Korzyści związane ze spożyciem orzechów wykazało 6 z nich, a 10 nie wykazało żadnego efektu. Badania przeprowadzone na zdrowych osobach nie wykazały znaczącej poprawy, podczas gdy w 6 z 12 badań u osób z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych odnotowano istotne zmiany w co najmniej jednym pomiarze funkcji naczyń [27].

4. Podsumowanie

Wyniki powyższych badań sugerują, że regularne spożywanie orzechów może mieć pozytywny wpływ na zdrowie układu krążenia. Korzyści te były widoczne w badaniach z użyciem większej porcji orzechów (30 g/dzień) przez kilka tygodni lub dłużej. Dieta bogata w orzechy nie wpływała na zmianę masy ciała ani BMI pacjentów. Wykazano, że dieta zawierająca orzechy może mieć pozytywny wpływ na profil lipidowy, zwłaszcza u osób z cukrzycą, nadwagą i otyłością trzewną. Opisane wyniki ukazały, że orzechy zapewniają korzyści kardioprotekcyjne przede wszystkim poprzez redukcję stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i apolipoproteiny B (rys. 1).



Rysunek 1. Podsumowanie potencjalnego wpływu składników odżywczych zawartych w orzechach na poprawę czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [opracowanie własne na podstawie: 6, 18, 22, 25-27]

Orzechy mogą również wykazywać działanie przeciwutleniające, zapobiegając tym samym peroksydacji lipidów. Do orzechów wykazujących działanie obniżające stężenie cholesterolu całkowitego, LDL i apoB należą pistacje i orzechy włoskie. Dieta wzbogacona orzechami włoskimi poprawia także funkcję śródbłonna i obniża ciśnienie krwi. Głównym składnikiem orzechów działających kardioprotekcyjnie, przeciwmiażdżycowo i pozytywnie na śródbłonek jest kwas α -linolenowy. Wykazano, że u osób spożywających orzechy więcej niż 5 razy w tygodniu prawdopodobieństwo wystąpienia udaru było mniejsze o 19%, o 22% mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia choroby niedokrwiennej serca i o 24% mniejsze prawdopodobieństwo zgonu z powodu chorób sercowo-naczyniowych. Coraz więcej dowodów wskazuje również na protekcyjne działanie orzechów poprzez obniżenie stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego.

Podsumowując, opisane wyniki badań w większości wykazały, że regularne spożycie orzechów w dawce ok. 30 g/dzień wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, zwłaszcza u osób z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chorób układu krążenia.

Literatura

1. Szymkowska B., Snarska K.K., *Występowanie wybranych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w populacji osób młodych*, [w:] Kowalczyk K., Krajewska-Kułak E., Cybulski M. (red.), *Wybrane choroby cywilizacyjne XXI wieku*, t. 1, Białystok 2016.
2. Blomhoff R., Carlsen M.H., Andersen L.F., Jacobs D.R.Jr., *Health benefits of nuts: potential role of antioxidants*, *British Journal of Nutrition*, 96(2), 2006, s. 52-60.
3. Cierniak-Piotrowska M., Marciniak G., Stańczak J., *Statystyka zgonów i umieralności z powodu chorób układu krążenia*, [w:] Strzelecki Z., Szymborski J. (red. nauk.), *Zachorowalność i umieralność na choroby układu krążenia a sytuacja demograficzna Polski*, Rządowa Rada Ludnościowa, Warszawa 2015.
4. Xiao Y., Huang W., Peng C., Zhang J., Wong C., Kim J.H., Yeoh E.K., Su X., *Effect of nut consumption on vascular endothelial function: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*, *Clinical Nutrition*, 37, 2018, s. 831-839.
5. Ilow R., Regulska-Ilow B., Różańska D., Biernat J., Kowalisko A., *Występowanie czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w grupie 40- i 50-letnich mieszkańców Wrocławia. Część I*, *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 18(4), 2012, s. 427-434.
6. Ivey K.L., Nguyen X.-M.T., Quaden R.M., Ho Y.-L., Cho K., Gaziano J.M., Djousse L., *Association of nut consumption with risk of stroke and cardiovascular disease: the Million Veteran program*, *Nutrients*, 13(9), 2021, s. 3031.
7. Venkatachalam M., Sathe S.K., *Chemical composition of selected edible nut seeds*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 2006, s. 4705-4714.
8. Ros E., *Nuts and CVD*, *British Journal of Nutrition*, 113(2), 2015, s. 111-120.
9. Ros E., Mataix J., *Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health*, *British Journal of Nutrition*, 96(2), 2006, s. 29-35.
10. Sabaté J., Salas-Salvadó J., Ros E., *Nuts: nutrition and health outcomes. Preface*, *British Journal of Nutrition*, 96(2), 2006, s.1-2.
11. Neale E.P., Tapsell L.C., Guan V., Batterham M.J., *The effect of nut consumption on markers of inflammation and endothelial function: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*, *BMJ Open*, 7, 2017, s. 16863.
12. Salas-Salvadó J., Bulló M., Pérez-Heras A., *Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases*, *British Journal of Nutrition*, 96(2), 2006, s. 46-51.
13. Bienkiewicz M., Bator E., Bronkowska M., *Blonnik pokarmowy i jego znaczenie w profilaktyce zdrowotnej*, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 96(1), 2015, s. 57-63.
14. Wroniak M., Parzychowska J., Rękas A., *Charakterystyka i porównanie wartości żywieniowej orzechów i otrzymanych z nich olejów*, *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 71(3), 2016.
15. Alasalvar C., Bolling B.W., *Review of nut phytochemicals, fat-soluble bioactives, anti-oxidant components and health effects*, *British Journal of Nutrition*, 113, 2015, s. 68-78.
16. Milbury P.E., Chen C.Y., Dolnikowski G.G., Blemberg B.J., *Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 2006, s. 5027-5033.
17. Liu K., Hui S., Wang B., Kaliannan K., Guo X., Liang L., *Comparative effects of different types of tree nut consumption on blood lipids: a network meta-analysis of clinical trials*, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 111(1), 2020, s. 219-227.
18. Kim Y., Keogh J.B., Clifton P.M., *Does nut consumption reduce mortality and/or risk of cardiometabolic disease? An updated review based on meta-analyses*, *Int J Environ Res Public Health*, 16(24), 2019, s. 4957.
19. Vinson J.A., Cai Y., *Nuts, especially walnuts, have both antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits*, *Food & Function*, 3(2), 2012, s. 134-140.
20. Jarosz M. (red.), *Normy żywienia dla populacji Polski*, Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2017.

21. Jorsz M., Rychlik E., Stoś K., Charzejewska J. (red.), *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie*, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa 2020.
22. Ma Y., Njike V.Y., Millet J., *Effects of walnut consumption on endothelial function in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled crossover trial*, *Diabetes Care*, 33(2), 2010, s. 227-232.
23. Katz D.L., Davidhi A., Ma Y., Kavak Y., Bifulco L., Njike V.Y., *Effects of walnuts on endothelial function in overweight adults with visceral obesity: a randomized, controlled, crossover trial*, *Journal of the American College of Nutrition*, 31(6), 2012, s. 415-423.
24. Ros E., Núñez I., Pérez-Heras A., Serra M., Gilabert R., Casals E., Deulofeu R., *A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial*, *Circulation*, 109, 2004, s.1609-1614.
25. Barbour J.A., Howe P.R.C., Buckleya J.D., Bryan Ż., Coates A.M., *Nut consumption for vascular health and cognitive function*, *Nutrition Research Reviews*, 27(1), 2014, s.131-158.
26. Bitok E., Sabate J., *Nuts and cardiovascular disease*, *Progress in Cardiovascular Diseases*, 61(1), 2018, s.33-37.
27. Morgillo S., Hill A.M., Coates A.M., *The effects of nut consumption on vascular function*, *Nutrients*, 11(1), 2019, s.116.

Wpływ stosowania diety bogatej w orzechy na funkcjonowanie układu krążenia – przegląd badań

Streszczenie

Choroby sercowo-naczyniowe (CVD, ang. *cardiovascular disease*) są istotnym problemem zdrowotnym zarówno w Polsce, jak i na świecie. Liczne badania wykazały, że spożywanie orzechów może mieć pozytywny wpływ na profilaktykę i leczenie chorób układu krążenia. Orzechy są bogate w dużą ilość składników odżywczych, które mogą korzystnie wpływać na wiele funkcji kardioprotekcyjnych. Udowodniono silny związek między spożyciem orzechów a mniejszym prawdopodobieństwem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, udaru, choroby niedokrwiennej serca. Sugeruje się, że podstawowym mechanizmem, dzięki któremu orzechy chronią układ krążenia, jest poprawa profilu lipidowego poprzez obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL (lipoproteiny o małej gęstości) i apolipoproteiny B. Dieta bogata w orzechy może poprawiać funkcję śródbłonna naczyń dzięki zawartości L-argininy, która jest prekursorem tlenku azotu, silnego czynnika rozszerzającego naczynia krwionośne, odpowiedzialnego za regulację napięcia naczyń i ciśnienia krwi. Podsumowując, wyniki badań wykazały pozytywny związek regularnego spożycia orzechów w dawce ok. 30 g/dzień ze zmniejszonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, zwłaszcza u osób z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chorób układu krążenia.

Słowa kluczowe: orzechy, układ krążenia, profil lipidowy, L-arginina, śródbłonek naczyń

The influence of a rich in nuts diet on the functioning of the circulatory system – research review

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are a major health problem both in Poland and in the world. Numerous studies have shown that eating nuts can have a positive effect on the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Nuts are rich in many nutrients that can benefit many cardioprotective functions. A strong connection has been proven between the consumption of nuts and a lower probability of cardiovascular disease, stroke, and coronary heart disease. It has been suggested that the primary mechanism by which nuts protect the circulatory system is the improvement of the lipid profile by lowering total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and apolipoprotein B. A diet rich in nuts may improve vascular endothelial function due to the content of L-arginine, which is a precursor of nitric oxide, a powerful vasodilator responsible for regulating vascular tone and blood pressure. In conclusion, the results of the study showed a positive correlation of regular consumption of nuts in a dose of about 30 g/day with a reduced risk of cardiovascular disease, especially in people with an increased risk of cardiovascular disease.

Keywords: nuts, cardiovascular system, lipid profile, L-arginine, vascular endothelium

Tradycyjne i potencjalne zastosowanie wąkroty azjatyckiej *Centella asiatica* w medycynie i kosmetologii

1. Wprowadzenie

Wąkrota azjatycka (*Centella asiatica*, syn. *Hydrocotyle asiatica*) to roślina należąca do rodziny selerowatych (*Apiaceae*). Znana jest również pod nazwą gotu kola, która to nazwa wywodzi się z jednego z języków Indii. W języku syngaleskim słowo „kola” oznacza liść, a „gotu” – kielichowy kształt [1]. Tereny występowania wąkroty to południowo-wschodnia Azja, głównie Chiny, Indie, Sri Lanka, Madagaskar, Ameryka Południowa i Środkowa oraz Australia. Porasta wilgotne i nasłonecznione stanowiska, np. brzegi zbiorników wodnych. Surowcem zielarskim jest ziele, które stosuje się w tradycyjnej medycynie chińskiej i indyjskiej od tysięcy lat. Wąkrota azjatycka wykazuje szereg właściwości biologicznych wskazujących na możliwość jej szerokiego zastosowania w medycynie i kosmetologii. Potwierdzono klinicznie jej właściwości lecznicze przy gojeniu ran i zapobieganiu nadmiernemu bliznowaceniu. Ze względu na swój wpływ na układ nerwowy zaliczana jest do adaptogenów, poprawiających m.in. funkcje zapamiętywania, co stało się motorem badań nad jej zastosowaniem w leczeniu chorób neurologicznych. Wyniki badań wskazują również na potencjał przeciwnowotworowy i przeciwbakteryjny rośliny. W przemyśle kosmetycznym używana jest do produkcji kosmetyków przeciwmarszczkowych i rewitalizujących. Właściwości lecznicze wąkroty azjatyckiej są przypisywane triterpenom, flawonoidom i fitosterolom. Surowiec roślinny został wymieniony m.in. w Farmakopei Europejskiej, F. Niemieckiej czy F. Chińskiej [2]. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najważniejszych zastosowań ziela wąkroty azjatyckiej w medycynie i kosmetologii, z uwzględnieniem wyników badań naukowych wskazujących na nowe potencjalne wykorzystanie terapeutyczne.

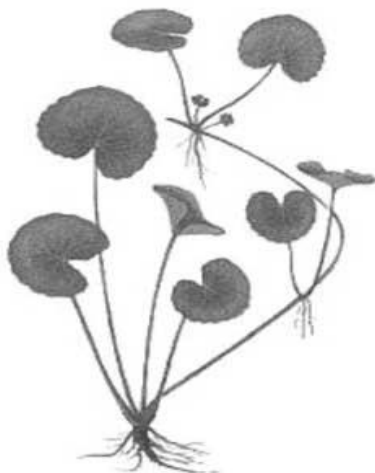
2. Charakterystyka rośliny

Gotu kola to niska roślina wieloletnia o cienkiej i płózającej się łodydze ulistnionej w węzłach (rys. 1). Występuje w dużych skupiskach, tworząc zielone kobierce. Rośnie niekiedy jako chwast pól uprawnych. Wysokość rośliny wynosi ok. 20 cm. Błazka liściowa jest zaokrąglona lub nerkowata oraz karbowana na brzegach. Ogonki liściowe są długie, ok. 5-10 razy dłuższe od błazki liściowej [3], kwiaty małe, zebrane w 3-4 główkokształtne baldachy wsparte na jajowatych przysadkach. Płatki kwiatów są koloru białego lub blad różowego, czasem czerwonego [3]. Owocem jest owalna rozłupka osiągająca do 8 mm długości, natomiast nasiona w rozłupce są pojedyncze [1].

¹ edyta_miszczuk@sggw.edu.pl, Zakład Farmakologii i Toksykologii, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

² magdalena_chlopecka@sggw.edu.pl, Zakład Farmakologii i Toksykologii, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

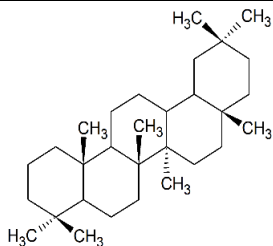
³ abajguz@uwb.edu.pl, Katedra Biologii i Ekologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, biologia.uwb.edu.pl.



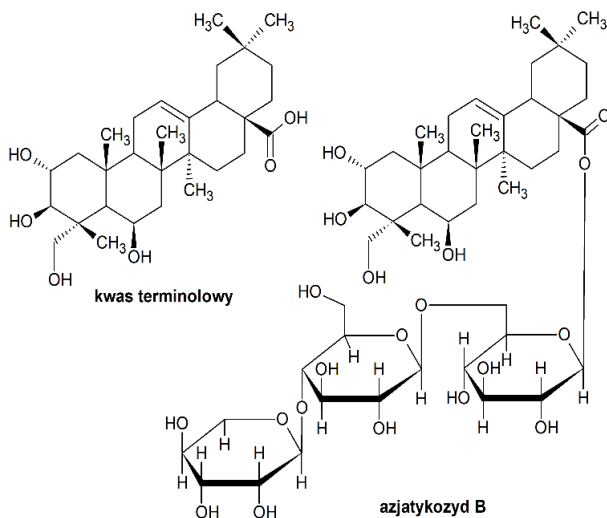
Rysunek 1. Wąkrota azjatycka – pokrój rośliny [1]

3. Skład chemiczny

Wąkrota azjatycka to surowiec bogaty w pentacykliczne triterpenoidy. Należą do nich pochodne oleanu (rys. 2) i ursanu (rys. 3). Najbardziej znanymi pochodnymi triterpenoidowymi saponin są kwasy: azjatykowy i madekasowy oraz ich glikozydy azjatykozyd i madekasozyd. Do pochodnych oleanu należą zaś kwas terminolowy i jego polisacharydowy ester: azjatykozyd B [1]. W mniejszych ilościach w roślinie obecne są centella-saponozydy B, C i D oraz dalsze pochodne ursanu i oleanu: kwas ursolowy, betulinowy, bramikowy, centelikowy, tankunikowy oraz ich glikozydy, jak np. braminozyd [3]. Według zaleceń *Farmakopei Europejskiej IX* ziele wąkroty azjatyckiej nie powinno zawierać mniej niż 6% glikozydów triterpenowych przeliczonych na azjatykozyd [4]. Skład chemiczny rośliny zależny jest od miejsca jej występowania. Na Madagaskarze dominują odmiany bogate w pochodne ursanu, głównie kwas azjatykowy i madekasowy oraz odpowiadające im glikozydy [1]. Surowiec ze Sri Lanki bogaty jest w centellozyd i kwas centelikowy. W Indiach występuje 5 różnych odmian gotu kola bogatych głównie w kwas azjatykowy i madekasowy oraz ich pochodne [1]. Ziele pochodzące z USA zawiera niespotykaną w innych odmianach pochodną ursanu (23-*O*-acetylomedekasozyd) i saponinową pochodną oleanu (23-*O*-acetyloazjatykozyd) [5].



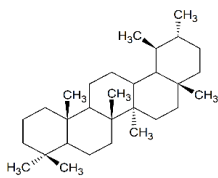
olean



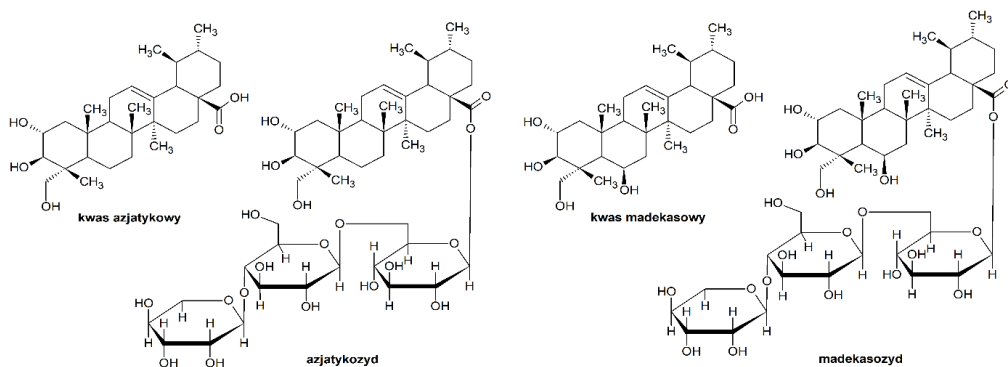
kwas terminolowy

azjatykozzyd B

Rysunek 2. Wzory strukturalne najważniejszych pochodnych oleanu: kwasu terminolowego i azjatykozydu B [opracowanie własne]



ursan



kwas azjatykowy

kwas madekasowy

azjatykozzyd

madekasozyd

Rysunek 3. Wzory strukturalne najważniejszych pochodnych ursanu: kwasu azjatykowego i madekasowego oraz azjatykozydu i madekasozydu [opracowanie własne]

Wśród wyciągów otrzymywanych z wąkroty azjatyckiej do najczęściej wykorzystywanych należą:

- TECA (ang. *titrated extract of Centella Asiatica*);
- TTFCA (ang. *Total Triterpenoid Fraction of Centella Asiatica*);
- TTF (ang. *Total Triterpenic Fraction*).

W składzie TECA oraz TTFCA znajdują się azjatykozyd oraz aglikony w postaci kwasu azjatykowego i kwasu madekasowego w proporcji 2 : 3 [6].

Ponadto ziele wąkroty azjatyckiej bogate jest we flawonoidy, takie jak kwercetyna i kemferol, oraz ich glikozydowe pochodne (m.in. katechina i luteolina) [5]. Surowiec zawiera karotenoidy (np. β -karoten) oraz olejek eteryczny, w którego skład wchodzi seskwiterpeny: α -humulen, mircen, p-cymol, β -kariofilen, a także monoterpeny: borneol, pinen, geraniol [2, 7]. Gotu kola jest surowcem bogatym w aminokwasy, witaminy, zawierającym duże ilości magnezu, żelaza i wapnia czy fitosteroli takich jak: β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol. Do pozostałych wtórnych metabolitów ziela obecnych w mniejszych ilościach należą garbniki, kwasy tłuszczowe i fenolowe oraz alkaloidy [1, 6, 7].

4. Farmakologia

Historia izolacji saponin triterpenowych sięga lat 40. XX wieku [7]. Jednak zachowały się zapiski o stosowaniu ziela gotu kola w medycynie ajurwedyjskiej starożytnych Indii i w tradycyjnej medycynie chińskiej. Znana była również na terenie Madagaskaru oraz Południowej Afryki. Pierwsze doniesienia o zastosowaniu ziela wąkroty azjatyckiej w medycynie europejskiej pochodzą z XIX wieku, kiedy używana była do leczenia trądu [2]. W dermatologii ziele wąkroty azjatyckiej wykorzystuje się w postaci maści czy kremów do leczenia ran, blizn, bliznowców, oparzeń oraz w przypadku kruchości i pęknięcia drobnych naczyń włosowatych. Świat poznał gotu kola jako tzw. *brain food*, środek ułatwiający zapamiętywanie i podnoszący poziom funkcji poznawczych. Zastosowanie wąkroty azjatyckiej w medycynie ludowej jest niezwykle szerokie i obejmuje m.in. leczenie wrzodów żołądka, nadciśnienia, problemów skórnych związanych z wypryskami i ropniami, malarii, depresji, cukrzycy czy usuwanie robaków pasożytniczych. Wiele tradycyjnych i ludowych zastosowań terapeutycznych ziela wąkroty azjatyckiej potwierdzono badaniami naukowymi i klinicznymi [6].

4.1. Leczenie ran i zapobieganie nadmiernemu bliznowaceni

Liczne badania kliniczne udowadniają działanie wąkroty azjatyckiej przyspieszające gojenie ran, w tym ran szytych, i zmniejszenie widoczności blizn, przy czym siła działania zależy od typu substancji aktywnej oraz zastosowanej dawki. Aglikony saponin triterpenowych działają efektywniej na proces gojenia się ran niż pochodne cukrowe [8]. Najwyższą aktywność biologiczną w tym zakresie posiada azjatykozyd, który pobudza fibroblasty do syntezy kolagenu, a w szczególności do wytwarzania hydroksyproliny budującej włókna kolagenowe i wpływającej na ich trwałość [9]. Ciekawym aspektem działania gotu kola jest wpływ rośliny na syntezę kolagenu, którego mechanizm pozostaje do tej pory niejasny [6]. Przypuszcza się, że do pobudzenia syntezy kolagenu dochodzi na drodze aktywacji kinazy receptora TGF- β . Badania dotyczące leczenia oparzeń II stopnia pokazują, że używanie kremu z 3% wyciągiem z ziela gotu kola pozwala na skrócenie gojenia o 7 dni w porównaniu ze stosowaniem kremu z sulfodiazyną srebra [10]. Podobny efekt potwierdzono po zastosowaniu opatrunku z wyciągiem z wąkroty

połączonego z wyciągiem z aloesu w porównaniu do szybkości gojenia pod opatrunkiem z chlorheksydyną [11]. Wyniki badań wskazują również, że zastosowanie azjatykozydu w małych dawkach, takich jak 1 pg, 1 ng czy 100 ng na obszar rany skutkowało wzrostem stężenia białka chemotaktycznego monocytów MCP-1/CCL2, czynnika wzrostu śródbłónka naczyń VEGF stymulującego do angiogenezy i regeneracji nabłonka przez napływ makrofagów do miejsca oparzenia, a także zmniejszenia wpływu stresu oksydacyjnego. Badania prowadzone na komórkach bliznowców pokazały, że azjatykozyd zmniejsza wpływ fibroblastów keloidowych i czynnika wzrostu GDF-9 odpowiedzialnych za przerost blizn. Działanie potwierdzono również w badaniach *in vivo* na szczurzym modelu rany, gdzie udowodniono szybszą przebudowę kolagenu i syntezę glikozaminoglikanów [12]. Podanie doustnie myszom etanolowego wyciągu z wąkroty azjatyckiej powodowało zmniejszenie powierzchni rany i jej szybszą regenerację przez przyspieszenie procesu ziarninowania, syntezy kolagenu i procesu naskórkowania [13]. Triterpenoidowe ekstrakty wąkroty azjatyckiej TECA i TTFCa łagodziły proces zapalenia i zmniejszały opuchliznę w miejscu zranienia u szczurów [9]. Podobnie podawanie myszom doustnie madekasozydu wspomagało gojenie się ran skóry wywołanych poparzeniem poprzez wzrost syntezy kolagenu i proliferację fibroblastów [14].

4.2. Działanie adaptogenne i poprawiające funkcje mózgu

W tradycyjnej medycynie hinduskiej czy chińskiej uspakajające, adaptogenne, antydepresyjne i poprawiające pamięć właściwości gotu kola są znane od tysiącleci. Za wspomniane efekty odpowiedzialne są głównie saponiny triterpenowe i bioflawonidy.

1. Działanie adaptogenne gotu kola i przystosowujące organizm do sytuacji stresowej polega na regulacji osi podwzgórze–przysadka–nadnercza, co wpływa na uwalnianie kortyzolu, oraz normalizacji wydzielania tlenu azotu rozszerzającego naczynia krwionośne [15].
2. Sedatywne właściwości wąkroty azjatyckiej wynikają z dużej zawartości braminozydu i azjatykozydu oraz ich aglikonów, które są w stanie przenikać przez barierę krew–mózg [16]. Braminozyd oddziałuje na receptory cholecystokininowe CCK_B, co powoduje wzmożone wydzielanie cholecystokininy (CCK), hormonu odgrywającego ważną rolę w układzie trawiennym i nerwowym, uwalnianym poprzez hydrolizę białek i tłuszczu. CCK w przewodzie pokarmowym pobudza perystaltykę jelit, produkcję glukagonu oraz zmniejsza łaknienie. W układzie nerwowym CCK wydzielana jest przez podwzgórze jako neuroprzebieżnik i uważa się, że wpływa na regulację nastroju i adaptację do stresu [17]. Azjatykozyd powoduje zmniejszenie w mózgu aktywności fosfolipazy A2 uwalniającej wolne kwasy tłuszczowe (w tym kwas arachidonowy) działające jako wtórne neuroprzebieżniki. Zahamowanie nadmiernego uwalniania kwasu arachidonowego ogranicza jego dalszy metabolizm, podczas którego może dochodzić do uwalniania wolnych rodników i uszkodzenia neuronów [18].
3. W badaniach na myszach stwierdzono, że wyciąg z gotu kola wpływa na uwalnianie neurotransmitterów w mózgu poprzez wzrost wydzielania serotoniny (5-HT), noradrenaliny (NA), dopaminy (DA) i ich metabolitów, co może wskazywać na właściwości antydepresyjne rośliny [17].
4. W badaniach nad chorobą Parkinsona i Alzheimera uzyskano również obiecujące wyniki po zastosowaniu wyciągu z ziela wąkroty azjatyckiej. Stwierdzono jej działanie antyoksydacyjne zmniejszające peroksydację lipidów i wzrost wydzielania

endogennych przeciwutleniaczy w mózgu [6]. W przebiegu choroby Alzheimera najważniejszą sprawą z perspektywy patogenezy jest odkładanie się w neuronach amyloidu β i rozkład acetylocholino (ACh) przez acetylocholinoesterazę (AChE), której aktywność rośnie w mózgu chorych. W badaniach *in vitro* wykazano, że stosowanie wyciągu hamowało rozkład ACh przez AChE i odkładanie amyloidu β [19]. Badania na szczurach Wistar wykazały zmniejszenie poziomu stężenia malondialdehydu MDA, z jednoczesnym wzrostem stężenia glutationu, katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej [6].

5. Podawanie wyciągu z gotu kola poprawiało pamięć, zdolności orientacyjne oraz poznawcze badanych szczurów i myszy [6, 18]. U myszy, którym podawano wyciąg ze świeżych liści wąkroty azjatyckiej odnotowano zwiększenie liczby wypustek nerwowych w dendrytach i rozgałęzień sieci neuronalnej oraz zmniejszenia obumierania neuronów [6, 16, 20]. Podanie wyciągu działało ochronnie na mitochondria w neuronach oraz poprawiało ich funkcje przez zmniejszenie stresu oksydacyjnego. U osób z chorobą Alzheimera stwierdzono poprawę funkcji hipokampa, obszaru mózgu istotnego dla funkcji poznawczych i zdolności zapamiętywania [16]. Poprawa funkcji poznawczych następowała także u szczurów, którym podawano wcześniej związki glinu, ołowiu czy streptozocynę [6]. Mimo licznych badań przedklinicznych z wykorzystaniem różnych modeli badawczych wykonano, jak dotąd, niewiele prób klinicznych. Jednym z przykładów takich badań jest zrealizowane w 1977 roku badanie kliniczne (podwójnie ślepa próba), w którym podano wyciąg z wąkroty azjatyckiej dzieciom z dysfunkcjami umysłowymi, uzyskując pozytywne wyniki wpływu wyciągu na funkcje mózgu. Podobne próby, ale z udziałem osób dorosłych, wykonano w Tajlandii i Indiach [19].
6. Wyniki badań wykonane z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych wskazują, że podanie wyciągu z wąkroty azjatyckiej hamuje napady drgawkowe wywołane podaniem pentylenotetrazolu indukowane stresem oksydacyjnym w neuronach mózgu przez podwyższenie progu drgawkowego [17]. Podobne wyniki badań uzyskano w przypadku drgawek spowodowanych podaniem strychniny. Stwierdzono wzrost stężenia kwasu γ -aminomasłowego (GABA), który jest neurotransmiterem hamującym w układzie nerwowym również na skutek wolniejszego metabolizmu GABA. Siła działania przeciwdrgawkowego wyciągu z wąkroty azjatyckiej była podobna do efektu po zastosowaniu syntetycznych leków przeciwdrgawkowych [6].

Opisany wpływ wyciągu i substancji czynnych wąkroty azjatyckiej na przytoczone mechanizmy biorące udział w patogenezie wielu chorób neuropsychiatrycznych dają nadzieję na tworzenie nowych schematów terapii tych właśnie zaburzeń. Należy jednak podkreślić, że wyniki badań *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych wymagają potwierdzenia w badaniach klinicznych.

4.3. Właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne

Doniesienia literaturowe wskazują, że wyciągi wodne i etanolowe z ziela wąkroty azjatyckiej pełnią także ważną rolę w ograniczeniu procesów zapalnych oraz stresu oksydacyjnego. Podanie wyciągu z gotu kola w modelu zwierzęcego alergicznego zapalenia skóry wywołanego bezwodnikiem ftalowym powodowało zmniejszenie poziomu cytokin prozapalnych: prostaglandyn, w szczególności PGE2 oraz cyklooksygenaz COX-1 i COX-2. Efekt ten był porównywalny z efektem przeciwzapalnym wywołanym przez

niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) takie jak aspiryna czy ibuprofen [6, 21]. Przebadano także triterpenoidowy wyciąg TECA, który dawał obiecujące wyniki w leczeniu zapalenia skóry, obniżając poziom interleukin prozapalnych, TNF- α oraz prostaglandyn [21]. W obecności TECA stwierdzono wiązanie i unieczynnienie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, którego aktywacja odgrywa dużą rolę w procesie zapalenia i progresji transformacji nowotworowej. TECA podnosił także aktywność białek opiekuńczych. W modelu udaru mózgu saponiny triterpenoidowe pełniły rolę protekcyjną i prowadziły do aktywacji mikrogleju [16]. Po podaniu azjatykozydu dostrzeżono zmniejszenie glikozylacji hemoglobiny i spadek poziomu jej formy HbA1c oraz zmniejszenie stężenia glukozy u ludzi dotkniętych cukrzycą [22]. Wykazano również, że azjatykozyd stabilizuje błony mitochondrialne, chroniąc te organella przed stresem oksydacyjnym [16]. Antyoksydacyjny potencjał wąkroty azjatyckiej jest porównywalny do efektu wywołwanego przez witaminę C i wynika z 3 mechanizmów: hamowania peroksydacji kwasu linolowego, pełnienia funkcji zmiatacza wolnych rodników oraz wychwytywania rodników [23].

4.4. Działanie na drobnoustroje

Na szczególną uwagę zasługują potencjalne możliwości wykorzystania wąkroty azjatyckiej w leczeniu chorób do dzisiaj pozostających wyzwaniem terapeutycznym, takich jak trąd czy gruźlica, które wywoływane są przez prątki z rodzaju *Mycobacterium*, odpowiednio *M. leprae* i *M. tuberculosis* [23, 24]. Etanolowe i heksanowe wyciągi z gotu kola wykazywały również działanie bakteriobójcze na bakterie z rodzaju *Shigella*, *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus* czy *Salmonella typhi*. Istnieją badania, których wyniki wskazują, że wąkrota azjatycka nie działa na takie szczepy bakterii jak *Escherichia coli* czy *Pseudomonas aeruginosa*, chociaż inne badania nie potwierdzają oporności tej bakterii na wyciągi gotu kola [23, 25]. Działanie grzybobójcze wąkroty azjatyckiej wykazano wobec drożdżaków *Candida albicans*, jak również grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe udowodniono dla herpeswirusów [23].

4.5. Działanie gastroprotecyjne

Jak dowodzą badania z wykorzystaniem wyciągu z wąkroty azjatyckiej, ma ona również działanie gastroprotecyjne, chroniące przed działaniem czynników uszkadzających błonę śluzową. Udowodniono jej działanie na *Helicobacter pylori* będące jedną z głównych przyczyn powstawania wrzodów żołądka we współczesnym świecie. Podanie myszom wyciągu z liści gotu kola utrudniało zakażenie *H. pylori* i zmniejszało ich kolonizację w błonie śluzowej żołądka [26]. Inne doświadczenia pokazują również pozytywny wpływ rośliny na potencjał regeneracyjny śluzówki żołądka. W badaniach histopatologicznych tkanek szczurów narażonych na długotrwałe działanie etanolu zauważono, że uszkodzenia śluzówki w postaci nadżerek zmniejszyły się, z jednoczesnym ograniczeniem nacieku limfocytów [27]. Wyjaśnieniem zaistniałych zmian może być fakt antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego działania gotu kola oraz jej działanie protekcyjne na śluzówkę żołądka przez osłabienie działania mieloperoksydazy w badanych tkankach [6, 27]. W przypadku wrzodów żołądka wywołanych indometacyną, substancją należącą do NLPZ, alkoholowy wyciąg z wąkroty azjatyckiej spowodował zmniejszenie aktywności COX i toksyczności malondialdehydu [28]. Istnieją również dane, które pozostają w sprzeczności z opisanymi wynikami. W badaniach tych nie potwierdzono znaczących zmian w obrazie histologicznym i biochemicznym, w tym istotnego zahamowania aktyw-

ności cytokiny prozapalnej TNF- α u szczurów z wywołanymi indometacyną wrzodami żołądka, przyjmujących wyciąg z liści gotu kola [29]. Powyższe fakty wskazują na możliwość wykorzystania wąkroty azjatyckiej w terapii i profilaktyce uszkodzeń błony śluzowej żołądka jako terapii wspomagającej leczenie konwencjonalne.

4.6. Działanie cytotoksyczne i antyproliferacyjne

Ważnym aspektem badań oceniających cechy biologiczne wąkroty azjatyckiej jest wykazanie jej właściwości przeciwnowotworowych. Wyniki badań na modelu mysim wykazują ochronny wpływ wyciągu na działania odległe wywołane przewlekłym narażeniem na działanie chromu i cyklofosfamidu [23]. W badaniu na młodych myszach, którym podawano benzo(a)piren i jednocześnie wodny wyciąg z wąkroty azjatyckiej zauważono zmniejszenie hiperplazji komórek nowotworowych oskrzeli i oskrzelików w odniesieniu do grupy kontrolnej [6]. W badaniach na mysim modelu kancerogenezy chemicznej wywołanej pochodną antracenu (DMBA) stwierdzono, że podawanie naskórne wyciągu z wąkroty azjatyckiej znacząco przyczynia się do remisji choroby [6]. Działanie przeciwnowotworowe rośliny zauważono również w przypadku nowotworów przewodu pokarmowego. W badaniach *in vitro* dotyczących raka okrężnicy stwierdzono, że podanie wyciągu z gotu kola znacząco obniża stężenia E-kadheryny i wimentyny (markerów tego nowotworu) oraz obniża poziom stresu oksydacyjnego wpływającego na komórki [30]. W badaniu wykonanym na komórkach raka jamy nosowo-gardłowej, opornym na leczenie cisplatyną, po podaniu wyciągu z ziela gotu kola wykryto szlak fosforylacji białka p38 i skierowanie komórek nowotworowych na drogę apoptozy [31]. Dostrzeżono aktywność proapoptotyczną komórek poprzez wzrost białek proapoptotycznych, np. BAX czy BCL2 w przypadku raka dróg żółciowych [32]. Ciekawym aspektem jest również zwiększenie siły działania leków przeciwnowotworowych, np. bleomycyny, po podaniu wyciągu z wąkroty azjatyckiej [10].

4.7. Wykorzystanie w terapii COVID-19

Główna proteaza wirusa SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 Mpro) jest jednym z potencjalnych punktów uchwytu w terapii lekami przeciw wirusowi SARS-CoV-2, znanym także pod nazwą choroby COVID-19, jaką wywołuje. Wyniki badań *in silico* wskazują, że jedną z potencjalnych substancji przydatnych w terapii COVID-19 jest azjatykozyd-6 [22]. W badaniach oceniających możliwość zastosowania wykazano, że przyjmowanie wyciągu spowalnia proces włóknienia mięszu płuc [33].

5. Zastosowanie w kosmetologii

Jak już wspomniano, wąkrotę azjatycką i jej wyciągi stosuje się przy leczeniu ran i blizn. Jest też stosowana w dermatologii, a wraz z odkrywaniem nowych właściwości rośliny wzrasta jej wykorzystanie w branży kosmetycznej. W składzie kosmetyków INCI wąkrota azjatycka określana jest jako CICA i jest ważnym składnikiem kremów przeciwzmarszczkowych i nawilżających oraz kosmetyków rekomendowanych do skóry z rozstępami czy cellulitem. Stosowana jest też do wzmocnienia włosów słabych i wypadających. Stąd CICA może być wykorzystywana w kremach, maściach, tonikach, balsamach czy mleczkach do ciała, a także w szamponach i odżywkach do włosów. W kremach do twarzy używana jest w stężeniach do 0,5% pod postacią odparowanego do sucha wyciągu wodnego lub alkoholowego oraz wyciągu wodnego z dodatkiem glikolu propylenowego

[34]. W składzie określanym przez INCI (ang. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) można spotkać ją pod następującymi nazwami:

- *CICA*;
- *Centella asiatica (gotu kola) extract*;
- *Centella asiatica leaf extract*;
- *Centella asiatica flower/stem/leaf extract*;
- *Centella asiatica leaf water*;
- *Asiaticoside*;
- *Asiatic acid*;
- *Madecassoside*;
- *Madecassic acid*.

Składnik ten jest zalecany do stosowania w przypadku cery problematycznej, np. po zabiegach medycyny estetycznej, z poparzeniami słonecznymi, z trądzikiem różowatym czy z widocznymi oznakami starzenia, przesuszzonej, z rumieniem i rozszerzonymi naczynekami. Wodne wyciągi z wąkroty azjatyckiej mają działanie łagodzące objawy łuszczycy, wykorzystywane są również z powodzeniem w terapii twardziny układowej i ogniskowej. U pacjentów z cellulitem wyciąg z wąkroty azjatyckiej redukuje jego widoczność poprzez zmniejszenie wielkości adipocytów, szczególnie w okolicach ud i pośladków. U kobiet w ciąży wąkrota azjatycka zapobiegała powstawaniu rozstępów [14]. Odkryto także, iż dodanie CICA do kosmetyków pomaga zapobiegać fotostarzeniu się skóry. W ziele gotu kola odkryto związki pochodne kwasu kawoilochinowego, które potrafią absorbować szkodliwe dla skóry długości fal UV (od 300 nm do 330 nm) odpowiadające za rozpad kolagenu [22]. Kremy z wąkrotą azjatycką mogą przydać się także do codziennej pielęgnacji skóry, ponieważ wyciąg z tej rośliny działa nawilżająco i przeciwdziała zapaleniu [35]. Do środków ostrożności przy jej stosowaniu należy unikanie skóry wokół oczu [14]. W przypadku skóry naczynkowej azjatykozyd powoduje wzrost elastyczności małych naczyń krwionośnych i stymuluje angiogenezę, zauważono także wzrost poziomu enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych antyoksydantów. Dowiedziano także skuteczności stosowania gotu kola w terapii modzeli, ropnych zapaleń skóry, a także poprawy wyglądu i kondycji skóry podczas codziennej pielęgnacji [8].

6. Podsumowanie

Wąkrota azjatycka, znana również jako gotu kola, jest niewielką rośliną należącą do rodziny selerowatych *Apiaceae*. Surowcem wykorzystywanym w formułacjach jest ziele, a roślina ma wiele zastosowań, szczególnie w kosmetologii i farmacji. Liczne badania oceniające właściwości biologiczne wąkroty azjatyckiej wskazują na duży potencjał tej rośliny, która może być wykorzystana w terapii alternatywnej lub wspomagającej leczenie konwencjonalne wielu chorób.

Literatura

1. Król D., *Wąkrota azjatycka (Centella asiatica L.) – właściwości lecznicze*, Postępy Fitoterapii, 2010, s. 101-105.
2. James J.T., Bubern I.A., *Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, Centella asiatica (L.) Urban*, Molecules, 2009, s. 3922-3941.
3. Karłowicz-Bodalska K., Han S., Han T., Miranowicz M., Bodalska A., *Centella asiatica (L.) Urban, syn. Hydrocotyle asiatica L. - wąkrota azjatycka – znana roślina lecznicza Dalekiego Wschodu*, Postępy Fitoterapii, 2013, s. 225-235.
4. *Centellae asiaticae herba*, [w:] *Farmakopea Europejska IX*, 2011. s.1311-1313.

5. Chandrika U.G., Prasad Kumarab P.A., *Gotu kola (Centella asiatica): nutritional properties and plausible health benefits*, Advances in Food and Nutrition Research, 2015, s. 125-157.
6. Agency European Medicines, *Safety assessment of Centella asiatica-derived ingredients as used in cosmetics*, 2022.
7. Brinkhaus B., Lindner M., Schuppan D., Hahn E.G., *Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant Centella asiatica*, Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2000, s. 427-448.
8. Markiewicz W., *Miodla indyjska i wężkrota azjatycka – mało znane rośliny występujące w preparatach weterynaryjnych*, Życie Weterynaryjne, 2020, s. 303-307.
9. Sanchez L.W., Watson R.R., *Bioactive foods promoting wound healing*, [w:] Watson R.R., Preedy V.R., *Fruits, vegetables, and herbs. Bioactive foods in health promotion*, 2016, s. 451-464.
10. Saeidinia A., Keihanian F., Lashkari A.P., Lahiji H.G., Mobayyen M., Heidarzade A., Golchai J., *Partial-thickness burn wounds healing by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and centiderm*, Medicine, 2017, s. 61-68.
11. Muangman P., Praditsuktavorn B., Chinaronchai K., Chuntrasakul C., *Clinical efficacy test of polyester containing herbal extract dressings in burn Wound Healing*, The International Journal of Lower Extremity Wounds, 2016, s. 203-212.
12. Shedoeva A., Leavesley D., Upton Z., Fan C., *Wound healing and the use of medicinal plants*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019, s. 1-30.
13. Suguna L., Sivakumar P., Chandrakasan G., *Effects of Centella asiatica extract on dermal wound healing in rats*, Indian Journal of Experimental Biology, 1996, s. 1208-1211.
14. Bylka W., Znajdek-Awiżeń P., Studzińska-Sroka E., Brzezińska M., *Centella asiatica in cosmetology*, Advances in Dermatology and Allergology, 2013, s. 46-49.
15. Provino R., *The role of adaptogens in stress management*, Australian Journal of Medical Herbalism, 2010, s. 41-49.
16. Wong J.H., Barron A.M., Abdullah J.M., *Mitoprotective effects of Centella asiatica (L.) Urb.: Anti-inflammatory and neuroprotective opportunities in neurodegenerative disease*, Frontiers in Pharmacology, 2021, s. 1-9.
17. Gohil K.J., Patel J.A., Gajjar A.K., *Pharmacological review on Centella asiatica: A potential herbal cure-all*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, s. 546-556.
18. Hashim P., *Centella asiatica in food and beverage applications and its potential antioxidant and neuroprotective effect*, International Food Research Journal, 2011, s. 1215-1222.
19. Orhan I.E., *Centella asiatica (L.) Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, s. 1-8.
20. Lokanathan Y., Omar N., Ahmad Puzi N.N., Saim A.H., Idrus R., *Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative Potential of Centella asiatica*, Malaysian Journal of Medical Sciences, 2016, s. 4-14.
21. Park J.H., Choi J.Y., Son D.J., *Anti-inflammatory effect of titrated extract of Centella asiatica in phthalic anhydride-induced allergic dermatitis animal model*, International Journal of Molecular Sciences, 2017, s. 1-14.
22. Maya P.G., Mahayasih W., Harizal H., Ahmad I., *In silico identification of natural products from Centella asiatica as severe acute respiratory syndromecoronavirus 2 main protease inhibitor*, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 2021, s. 261-266.
23. Zahara K. Bibi Y., Tabassum S., *Clinical and therapeutic benefits of Centella asiatica*, Pure and Applied Biology, 2014, s. 152-159.
24. Mudaliana S., *Antimicrobial activity of Centella asiatica and Gigantochloa apus*, Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 2021, s. 755-759.
25. Soyngbe O.S., Mongalo N.I., Makhafola T.J., *In vitro antibacterial and cytotoxic activity of leaf extracts of Centella asiatica (L.) Urb, Warburgia salutaris (Bertol. F.) Chiov and*

- Curtisia dentata* (Burm. F.) C.A.Sm – medicinal plants used in South Africa, BMC Complementary Alternative Medicine, 2018, s. 1-10.
26. Zheng H.M., Choi M.J., Kim J.M., Lee K.W., Park Y.H., Lee D.H., *In vitro and in vivo Anti-Helicobacter pylori activities of Centella asiatica leaf extract*, Preventive Nutrition of Food Sciences, 2016, s. 197-201.
 27. Abdulla M.A., AL-Bayat F.H., Younis L.T., Abu Hassan M.I., *Anti-ulcer activity of Centella asiatica leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats*, Journal of Medicinal Plant Research, 2010, s. 1253-1259.
 28. Zheng H.M., Choi M.J., Kim J.M., Cha K.H., Lee K.W., Park Y.H., Hong S.S., Lee D.H., *Centella asiatica leaf extract protects against indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats*, Journal of Medicinal Food, 2016, s. 38-46.
 29. Sriepindonnta P.M., Fitriani F.N., Thirza S.Q., Pratiwi M.D., Prima Putra Noviardi D.E., Kalsum U., Khotimah H., Mintaroem K., *The potential effects of Centella asiatica ethanolic extracts as an anti-inflammatory agent through decreasing TNF- α expression in indomethacin-induced gastric ulcer model rats*, International Conference on Life Sciences and Technology, 2021, s. 30-54.
 30. Sun B., Wu L., Wu Y., Zhang C., Qin L., *Therapeutic potential of Centella asiatica and its triterpenes: a review*, Frontiers in Pharmacology, 2020, s. 1-21.
 31. Liu Y.T., Chuang Y.C., Lo Y.S., Lin C.C., Hsi Y.T., Hsieh M.J., Chen M.K., *Asiatic acid, extracted from Centella asiatica and induces apoptosis pathway through the phosphorylation p38 mitogen-activated protein kinase in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells*, Biomolecules, 2020, s. 1-13.
 32. Sakonsinsiri C., Kaewlert W., Armartmuntree N., Thanan R., Pakdeechote P., *Anti-cancer activity of asiatic acid against human cholangiocarcinoma cells through inhibition of proliferation and induction of apoptosis*, Cellular and Molecular Biology, 2018, s. 28-33.
 33. Cesarone M.R., Hu S., Belcaro G., Cornelli U., Feragalli B., Corsi M., Bombardelli E., Cotellese R., Hosoi M., Rosenkvist L., *Pycnogenol®-Centellicum® supplementation improves lung fibrosis and post-COVID-19 lung healing*, Minerva Medica, 2022, s. 135-140.
 34. <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/centella-asiatica-extract> [data dostępu: 16.03.2023].
 35. Ratz-Łyko A., Arct J., Pytkowska K., *Moisturizing and antiinflammatory properties of cosmetic formulations containing Centella asiatica extract*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, s. 27-33.

Tradycyjne i potencjalne zastosowanie wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica*) w medycynie i kosmologii

Streszczenie

Wąkrota azjatycka (*Centella asiatica*) jest szeroko rozpowszechnioną rośliną strefy tropikalnej i subtropikalnej, znaną również pod nazwą gotu kola. Należy do rodziny selerowatych (*Apiaceae*), zaś surowcem wykorzystywanym w medycynie i kosmologii jest ziele. Głównymi substancjami czynnymi wąkroty azjatyckiej są triterpeny: kwas azjatykowy i madekasowy, a także ich glikozydy: azjatykozylid oraz fitosterole. Gotu kola znana jest w medycynie indyjskiej czy chińskiej od tysiącleci, lecz jej całkowity potencjał nie został jeszcze w pełni odkryty. Jej tradycyjne zastosowanie to naturalny środek leczący zranienia oraz rewitalizujący komórki nerwowe i wspomagający proces zapamiętywania. W krajach zachodnich pod koniec XX i na początku XXI wieku zdobyła popularność jako adaptogen i *brain food*. Jednak nie są to jedyne funkcje wąkroty azjatyckiej. Możliwe zastosowanie gotu kola jest szerokie: od działania fotoprotekcyjnego na komórki skóry i środka hamującego jej starzenie do immunomodulatora czy środka bakteriobójczego lub zastosowania w terapii cukrzycy, choroby nowotworowej, neurodegeneracyjnej, jak i działania gastroprotekcyjnego i przeciwwrzodowego, a jej nowy potencjał wciąż jest badany.

Celem niniejszej pracy jest przegląd udowodnionego klinicznie i już stosowanego od stuleci działania wąkroty azjatyckiej, a także potencjalnego wykorzystania tej rośliny w medycynie i kosmologii.

Słowa kluczowe: wąkrota azjatycka, adaptogeny, gotu kola, *brain food*

Traditional and potential use of Asian pennywort (*Centella asiatica*) in medicine and cosmetology

Abstract

Asian pennywort (*Centella asiatica*) is a widespread plant of tropical and subtropical zones, also known as gotu kola. It belongs to celery (Apiaceae) family and the material used in medicine and cosmetology is the herb. The main active substances of Asian pennywort are triterpens: asiatic and madecasic acids and their glycosides: asiaticosid and phytosterols. Gotu kola has been used in Indian and Chinese from thousands of years but its exact potential has not been discovered yet. Its traditional use is a natural remedy for healing wounds, revitalizing nerve cells and the process of remembering. In Western countries at the end of 20th century and the beginning 21st century it gained popularity as adaptogen and brain food. But these are not the only functions of gotu kola. The potential use of gotu kola is wide: from possible fotoprotective action on skin cells and a remedy inhibiting skin ageing, immunomodulator, antimicrobial agent or its use in diabetes mellitus, cancer, neurodegenerative diseases. It has gastroprotective and anti-ulcer action. Its new potential is still examining.

The aim of this paper is a brief review of clinically proven use from thousands of years and potential use of this plant in medicine and cosmetology.

Keywords: Asian pennywort, adaptogen, gotu kola, brain food

Ostropest plamisty – rzadki składnik kosmetyków

1. Wprowadzenie

Składniki botaniczne są stosowane w pielęgnacji skóry od tysięcy lat. Potencjał substancji czynnych zawartych w roślinach i wykazujących pozytywny wpływ na ludzką skórę wydaje się nieograniczony. Nowoczesne techniki badawcze umożliwiają nie tylko identyfikację aktywnych biologicznie czynników w produktach roślinnych, ale także dają możliwość poznania ich mechanizmów działania na komórki ludzkiej skóry. W XXI wieku obserwujemy ponowne, ogromne zainteresowanie kosmetykami naturalnymi, przy równoczesnym wzroście świadomości konsumentów w kwestii efektywności oraz bezpieczeństwa ich stosowania [1]. Jedną z substancji, którą zaczyna dostrzegać współczesna kosmetologia i dermatologia, jest sylimaryna wyizolowana z ostropestu plamistego, wykazująca korzystne działanie terapeutyczne i pielęgnacyjne w odniesieniu do ludzkiej skóry.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest ukazanie możliwości wykorzystania składników wyizolowanych z ostropestu plamistego we współczesnych, innowacyjnych dermokosmetykach. Ponadto przedstawiono kluczowe właściwości prozdrowotne ostropestu.

3. Ostropest plamisty – charakterystyka botaniczna i fitochemiczna

Ostropest plamisty (łac. *Silybum marianum*) jest rośliną znaną od wieków, zaś jej owoce i ziele wykorzystywane są w leczeniu od wielu lat. Niegdyś najczęściej stosowaną formą były odwary, którymi skutecznie leczono zatrucia i zaburzenia dyspeptyczne, ale również wykorzystywano je w leczeniu ran oraz stanów zapalnych skóry [2, 3]. Do tej pory w niektórych krajach Europy nadal spożywane są kielki ostropestu, a także świeże liście. Z kolei uprażone nasiona ostropestu traktowane są jako zamiennik kawy [4]. *Silybum marianum* rozprzestrzenił się także jako roślina ozdobna, często spotykana w ogrodach lub też mająca zastosowanie jako żywopłoty. Należy podkreślić, iż jest rośliną miododajną, o dużej wydajności. Ponadto ostropest wykorzystywany jest jako roślina chroniąca uprawy przed dziką zwierzyną – siejąc bowiem kilkumetrowe ramy z ostropestu wokół upraw penetrowanych przez zwierzynę, tworzy się naturalne bariery, ponieważ roślina ta dorasta do wysokości blisko 2 metrów [5]. Jej sztywne, proste łodygi, a także duże i stosunkowo gęste liście pokryte na obrzeżach kolcami tworzą skuteczną zaporę. Ostropest plamisty posiada również unikatową zdolność przekazywania glebie własnych składników odżywczych, można zatem nazwać go swoistym poplonem [5]. Może być siany w tej samej lokalizacji przez 10 lat bez konieczności nawożenia gleby. Jednocześnie w trakcie wzrostu korzeń wydziela substancje hamujące

¹ ewa.pierzchala@sum.edu.pl, Zakład Medycyny Estetycznej, Katedra Kosmetologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

² kmazurek@sum.edu.pl, Zakład Medycyny Estetycznej, Katedra Kosmetologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

wzrost innych roślin, w tym chwastów. Wykorzystywany jest także jako pasza dla zwierząt [4, 6]. *Ostropest plamisty* posiada zatem wiele dobroczynnych dla człowieka cech, o których częściowo zapomniano. Zauważalny obecnie renesans zainteresowania tą rośliną sprawia, iż ponownie odkrywamy wszechstronność jej zastosowania.

Rodzaj *Silybum* obejmuje 2 gatunki – *Silybum eburneum* cechujący się obecnością zielonych liści oraz *Silybum marianum* o biało zielonych liściach, gdzie biel tworzy rysunek żyłek na liściach. *Ostropest* posiada białe lub fuksjowe kwiaty. Rośliny te tworzą spore kępy, co nawiązuje do ich nazwy, bowiem grecki *sylibos* oznacza właśnie kępę. Nazwy tej prawdopodobnie jako pierwszy użył grecki lekarz i farmakolog Dioskurydes. Pierwsze wzmianki o leczniczych właściwościach *ostropestu* pochodzą sprzed ponad 2 tysięcy lat. Informacje na jego temat można odnaleźć w dziele Tefrasta (ok. 372-287 p.n.e.), a także Pliniusza Starszego (23-79). Na właściwości *ostropestu* zwrócił uwagę także angielski zielarz John Gerard (1545-1611) oraz botanik Nicholas Culper (1616-1654). Pierwsze apteczne wyciągi sylimaryny pojawiły się w latach 40. XX wieku. Pierwotnie wykorzystywano przede wszystkim właściwości antyhepatotoksyczne *ostropestu* [2, 4, 7].

Najczęściej *ostropest plamisty* uprawiany jest jako roślina lecznicza w krajach Europy Południowej i Środkowej. Również w środkowej i północnej części Polski można spotkać jego uprawy. Kluczowym surowcem *ostropestu* są jego owoce, niełupki. Ekstrahowane z nich kompleksy flawonolignanów określane są wspólną nazwą „sylimaryna”. Jej zawartość w niełupkach ocenia się na od 1,0% do 3,05%. Skład owych kompleksów zależy od genotypu rośliny, dlatego też w przemyśle farmaceutycznym wyciągi te wymagają standaryzacji [4, 8].

W skład flawonolignanów sylimaryny wchodzi sylibina – w 2 formach diastereoizomerycznych, izosylibina – również w 2 formach, sylidianina, sylikrystyna oraz flawonoid taksyfolina. Struktura chemiczna sylibiny, składnika stanowiącego od 50% do 70% sylimaryny, została ustalona w 1968 roku przez Peltera i Hansela, a następnie dopracowana w 1975 roku. Sylibina uznawana jest za najsilniej działający i najaktywniejszy składnik kompleksu. Według polskiej normy jakościowej surowiec *ostropestu* z upraw powinien zawierać co najmniej 1,5% sylimaryny. Źródłem sylimaryny poza owocami *ostropestu* mogą być także jego liście, jest to jednak ściśle zależne od gatunku, a także stanowiska uprawy [4, 9-12].

Oprócz kompleksu flawonolignanów surowiec *ostropestu* zawiera także niewielkie ilości garbnika, kwercytynę, tyraminę, fitosterole, histaminę, kwasy organiczne, śluzu, minerały, witaminy (wit. C, wit. K). Z nasion pozyskuje się także oleje (zawierające głównie kwas linolowy i oleinowy), białka (kluczowym aminokwasem identyfikowanym w białku jest kwas glutaminowy), sterole (w tym tokoferole, β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol), cukry, a także błonnik. Wzajemne proporcje tych składników różnią się w zależności od siedliska wzrastania i stopnia dojrzałości nasion. Związki zawarte w owocach *ostropestu* mają charakter lipofilowy, a co za tym idzie słabo rozpuszczają się w wodzie. Niewykluczone zatem, że flawonolignany będą obecne w roztworach wodnych tylko w niewielkim stężeniu. Jest to ważny aspekt, który należy wziąć pod uwagę, tworząc formułacje dermokosmetyków, bowiem w kosmetykach o podłożu lipofilowym substancje aktywne mają możliwość przedostania się w głąb naskórka [3, 4, 9-13].

4. Sylimaryna – pierwotne zastosowanie w lecznictwie

Na polskim rynku farmaceutycznym można odnaleźć kilkadziesiąt preparatów zawierających sylimarynę. Część z nich zarejestrowana jest jako suplementy diety, a część jako leki. Nie została ustalona dawka graniczna sylimaryny, która rozdzielałaby te 2 kategorie produktów. Zawartość sylimaryny waha się bowiem od kilkunastu do ponad 100 miligramów na jednostkę dawkowania. Należy podkreślić, iż niekoniecznie w lekach zawartość tej substancji czynnej jest wyższa niż w suplementach. Ponadto w celach spożywczych można zakupić nasiona i oleje z ostropestu.

Pierwsze badania dotyczyły działania hepatoprotekcyjnego ekstraktów pozyskiwanych z ostropestu. Ochrona komórek wątroby ma charakter wielopłaszczyznowy, zaś rozwój technik badawczych umożliwił zdefiniowanie mechanizmów poszczególnych szlaków ochrony komórkowej. Zarejestrowano wielorakie właściwości farmakologiczne składników pozyskiwanych z ostropestu plamistego, które wykorzystywane są z powodzeniem w hepatologii. Zalicza się do nich działanie przeciwutleniające, regeneracyjne, żółciopędne, hepatoprotekcyjne, immunostymulujące, przeciwwzapalne. Ponadto sylimaryna hamuje proces włóknienia wątroby [2, 14].

5. Farmakologiczne działanie substancji czynnych pozyskiwanych z ostropestu – możliwości wykorzystania w dermatologii i kosmetologii

Observacje w dziedzinie hepatologii zainteresowały w ostatnim czasie sektor przemysłu dermokosmetycznego. Na podstawie dotychczasowych badań stwierdzono, iż zarówno kompleks flawonolignanów, jak i substancje zawarte w oleju tłoczonym z nasion mogą korzystnie działać na ludzką skórę. Właściwości ostropestu nabrały szczególnego znaczenia w momencie zdefiniowania roli stresu oksydacyjnego w uszkodzeniu komórek naskórka i skóry właściwej. Początek XXI wieku zaowocował pierwszymi badaniami i publikacjami dotyczącymi działania substancji czynnych pozyskanych z ostropestu na ludzką skórę. W przeważającej mierze opierają się one na wcześniejszych modelach mysich lub dokonanej ocenie hepatocytów. Wiele uwagi poświęcono sylimarynie jako substancji wykazującej działanie fotoprotekcyjne oraz antyfotokarcynogenne w odniesieniu do komórek skóry [15-17].

Kluczowe właściwości antyoksydacyjne w kompleksie sylimaryny przypisuje się sylibinie. Zaobserwowano, że po jej zastosowaniu i naświetlaniu skóry promieniowaniem UV spada w niej produkcja nadtlenu diwodoru. Jednocześnie badania na ludzkich keratynocytach HaCaT wykazały korzystne działanie sylimaryny w naprawie uszkodzeń DNA. Z kolei obserwacje przeprowadzone na ludzkich fibroblastach udowodniły, iż cały kompleks sylimaryny, którym potraktowano hodowlę komórkową, wykazywał działanie antyoksydacyjne i, co zaskakujące, było ono tym wyższe, im niższe stężenie sylimaryny zastosowano w badaniu *in vitro* [17, 18].

Sylimaryna bowiem hamuje aktywność enzymów biorących udział w powstawaniu reaktywnych form tlenu, m.in. oksydazy NADPH, wykazuje zdolność wymiatania wolnych rodników, chelatowania jonów żelaza i miedzi, co ogranicza powstawanie reaktywnych rodników hydroksylowych zaangażowanych w oksydacyjne uszkodzenia DNA czy lipidów. Ponadto sylimaryna zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych – katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej [2]. Pierwotne oraz wtórne mechanizmy antyoksydacyjne ostropestu plamistego, działając synergistycznie, zwiększają całkowity potencjał oksydacyjny rośliny. Należy podkreślić, iż wzrost wydajności antyoksydacyjnej, zapew-

nionej przez sylimarynę, ma istotne znaczenie w ograniczeniu procesu glikacji białek prowadzącego do powstania tzw. AGE (ang. *advanced glycation end-products*) – zaawansowanych (końcowych) produktów glikacji. Proces glikacji zaburza strukturę i funkcje białek, w tym najistotniejszego komponentu białkowego skóry właściwej – kolagenu, przyczyniając się m.in. do utraty elastyczności skóry, zaburzenia mechanizmu regeneracji skóry czy też szybszego jej starzenia [19]. Przytoczone wyniki badań wskazały potencjalne możliwości wykorzystania substancji czynnych z ostropestu plamistego w preparatach dermokosmetycznych [17, 18].

Prowadzono także badania z wykorzystaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR, ang. *electron paramagnetic resonance*) w kontekście oceny potencjału przeciwutleniającego składników czynnych pozyskanych z *Silybum marianum*. Wykazano, że wodny odwar z ziela ostropestu posiada silniejsze właściwości antyoksydacyjne niż napar. Udowodniono także, iż sylimaryna zapobiega utlenianiu lipidów zarówno błon komórkowych, jak i warstwy lipidowej skóry. W skórze myszy, na którą zaaplikowano sylimarynę, a następnie poddano ekspozycji na promieniowanie UV, zaobserwowano mniejszą infiltrację leukocytów oraz spadek produkcji nadtlenu diwodoru, co potwierdziło redukcję stresu oksydacyjnego. Sylimaryna zwiększa także produkcję glutationu w komórkach, co jest kolejnym aspektem warunkującym jej wybitne właściwości antyoksydacyjne [13, 20-23]. Ponadto wykazuje właściwości detoksykujące w stosunku do ksenobiotyków. Obniża toksyczną aktywność benzopirenu – wielopierścieniowego węglowodoru aromatycznego, powszechnie występującego w środowisku, który łatwo dostaje się do organizmu drogą oddechową, pokarmową oraz poprzez kontakt ze skórą, powodując upośledzenie jej mechanizmów obronnych. Benzopiren identyfikowany jest w zanieczyszczonym środowisku, a ponadto znajduje się w dymie tytoniowym. Powstaje także w wyniku nieprawidłowej obróbki cieplnej białek i dostarczany jest wraz z pożywieniem. Sylimaryna wykazuje hamujący wpływ na aktywność cytochromu P-450, przez co prawdopodobnie może ograniczać stres oksydacyjny oraz zmniejszać poziom metabolitów o potencjale nowotworczym [24].

Sylibina, zarówno aplikowana na skórę, jak i przyjmowana doustnie w postaci suplementu, wykazuje działanie fotoprotekcyjne, jednocześnie wzmaga apoptozę uszkodzonych komórek naskórka, ograniczając tym samym ryzyko rozwoju raków skóry. Minimalizuje ryzyko poparzeń indukowanych promieniowaniem UVB. W testach klinicznych dowiedziono również możliwości leczenia uszkodzeń i stanów zapalnych indukowanych promieniowaniem UVA [25].

Zaobserwowano, iż po podaniu *per os* sylimaryny w dawce 200 mg/kg masy ciała zarówno stężenie trójglicerydów w osoczu, jak i produktów peroksydacji lipidów w wątrobie było niższe, natomiast poziom glutationu w wątrobie był wyższy mimo podania znaczącej dawki alkoholu. Również niższe dawki sylimaryny przyczyniały się do wzrostu poziomu glutationu w komórkach wątroby oraz utrzymywania jego podniesionego poziomu [26]. Obiecujące wyniki badań poświęconych korzystnemu działaniu sylimaryny na stężenie glutationu utwierdziły badaczy w przekonaniu, iż substancja ta może stać się przełomową nie tylko w odniesieniu do hepatocytów, ale także w stosunku do komórek skóry, redukując chociażby proces egzogenego starzenia.

Niezwykle istotne jest silne działanie immunomodulujące indukowane sylimaryną. Podawanie *per os* sylimaryny powoduje bowiem zwiększenie aktywności i poziomu limfocytów T, interleukin, a także redukuje poziom immunoglobulin [4]. Z kolei w ho-

dowlach fibroblastów traktowanych sylibiną zarejestrowano podwyższony poziom metaloproteinazy 1 i 2 (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*), a także znacznie obniżoną ekspresję kolagenu typu I, co może sugerować jej przydatność w prewencji chorób przebiegających z włóknieniem skóry. Te wyjątkowe właściwości sylibiny są już wykorzystywane w zapobieganiu włóknienia wątroby, niewykluczone jednak, że wkrótce mogą znaleźć szersze zastosowanie także w dermatologii i kosmetologii w odniesieniu do blizn przerosłych i keloidów czy też w terapii sklerodermii [2, 14, 27].

Ciekawe wydają się najnowsze doniesienia dotyczące działania wyekstrahowanych z ostropestu plamistego składników na mieszki włosowe. Zaobserwowano ich korzystny wpływ na produkcję istotnej w odbudowie włosa keratyny K75, a także na aktywację w mieszkach włosowych naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*). Ponadto wydłużają fazę anagenu, poprawiają mikrokrażenie oraz przyczyniają się do spadku androgenów w mieszkach włosowym. Ostropest plamisty może zatem być potencjalnie wykorzystywany zarówno w leczeniu wypadania włosów, jak i w przygotowaniu skóry głowy do przeszczepu, a także w ułatwieniu przyjęcia się przeszczepionych graftów i szybszym odrastaniu włosów [28, 29].

Interesujące z punktu widzenia dermatologii są właściwości przeciwbakteryjne sylimaryny. Hamuje bowiem wzrost metacylioopornych bakterii, takich jak *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* czy *Staphylococcus aureus*. Szczególnie gronkowiec złocisty często kolonizuje skórę i jest przyczyną przewlekłych stanów zapalnych w przebiegu m.in. atopowego zapalenia skóry (AZS) czy łuszczycy. Sylimaryna wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [4, 30, 31]. Szerokie spektrum jej działania sprawia, iż może być istotnym składnikiem balsamów pielęgnacyjnych dla osób z dermatozami przebiegającymi ze świądem, gdzie dużym problemem jest uszkodzenie bariery naskórkowej z wtórnym zainfekowaniem. Ponadto sylimaryna wykazuje działanie grzybobójcze w stosunku do niektórych drożdżaków oraz grzybów z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*. Działanie jej jest tym lepsze, im większe stężenie sylimaryny. Badania mikrobiologiczne sugerują, że ze względu na konieczność zastosowania dużych dawek terapeutycznych sylimaryna niekoniecznie może być wdrożona jako lek przeciwdrobnoustrojowy [4]. Może natomiast być z powodzeniem stosowana w profilaktyce zakażeń skóry. Dostępne badania wskazują także hamujące działanie sylimaryny na patogeny odpowiedzialne za próchnicę zębów [4]. Można zatem wysnuć przypuszczenie, że będzie korzystnym składnikiem preparatów do leczenia zapaleń błony śluzowej jamy ustnej, zapaleń okołoustnych, a także zapalenia mieszanego kątów ust. Niewykluczone również, iż może być zastosowana w niektórych odmianach trądziku różowatego, gdzie stan zapalny zlokalizowany jest wokół ust i nosa, a także w łojotokowym zapaleniu skóry.

Przełomowe okazały się badania dotyczące właściwości przeciwnowotworowych sylimaryny. Najwięcej doniesień literaturowych dotyczy jej działania na komórki raka wątroby, prostaty, pęcherza moczowego, jajnika, płuc, piersi, szyjki macicy, jamy ustnej, jelita grubego. Zastosowanie sylimaryny zwiększyło apoptozę komórek rakowych w badanych liniach komórkowych. Jej skuteczność obserwowano również w badaniach klinicznych. Niezwykle istotne w kontekście hamowania rozwoju choroby nowotworowej są właściwości antyangiogenne sylimaryny. W badaniach nad rakiem prostaty zaobserwowano, iż sylibina hamuje osteoklastogenezę, co może sugerować jej skuteczność w leczeniu przerzutów nowotworowych do kości [11, 15, 28, 32-35]. W stosunku do skóry

sylibina również wykazuje potencjał naprawczy. Ogranicza powstawanie dimerów tymidynowych indukowanych działaniem promieniowania UVB. Wspomaga naprawę DNA, a także inicjuje apoptozę uszkodzonych komórek skóry poprzez wzrost poziomu białka p53, ograniczając ryzyko powstania raków skóry. Ponadto sylibinina wykazuje działanie przeciwzapalne [16, 36].

6. Podsumowanie

Jak wskazują przytoczone przykłady, ostropest plamisty posiada szerokie zastosowanie terapeutyczne. W kosmologii najwcześniej zainteresowano się najprostszą formą surowca, a mianowicie olejem pozyskiwanym z ostropestu. Wykorzystywano go zarówno jako pojedynczy produkt do masażu i natłuszczenia skóry, jak i składnik preparatów złożonych. Obecnie wiadomo, że uzupełnia niedobory niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), wbudowując się w spoiwo międzykomórkowe warstwy rogowej naskórka określane jako cement międzykomórkowy. Jest źródłem naturalnych antyoksydantów. Coraz częściej wykorzystuje się olej z ostropestu bogaty w sterole (głównie β -sitosterol oraz stigmasterol w kosmetykach przeznaczonych do pielęgnacji skóry z łojotokiem i trądzikiem. Ekstrakty z ostropestu upłynniają wydzielinę ujść gruczołów łojowych, ograniczając powstawanie zaskórników. Flawonolignany z kolei wykazują efekt estrogenopodobny, działając poprzez mediowanie pracy receptorów estrogeno- zależnych, co może być wykorzystane w terapii przeciwstarzeniowej [4, 17, 18, 37].

Najnowsze doniesienia dotyczące możliwości terapeutycznych sylimaryny zachęcają do szerszego wykorzystania ostropestu w kosmologii i dermatologii. Niestety ilość dermokosmetyków zawierających sylimarynę nadal jest znikoma. Poza tym tylko nieliczne produkty posiadają informację na temat faktycznej zawartości standaryzowanej sylimaryny.

Literatura

1. Ferreira M.S., Magalhães M.C., Oliveira R., Sousa-Lobo J.M., Almeida I.F., *Trends in the use of botanicals in anti-aging cosmetics*, *Molecules*, 12, 2021, s. 3584.
2. Abenavoli L., Izzo A.A., Milić N., Cicala C., Santini A., Capasso R., *Milk thistle (Silybum marianum): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases*, *Phytotherapy Research*, 11, 2018, s. 2202-2213.
3. Blumenthal M., Busse W.R., Goldberg A., Gruenwald J., Hall T., Klein A., Riggins C.W., Rister R.S., Tyler V.E., *The complete German Commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines*, The American Botanical Council, Austin 1998, s. 73-685.
4. Nurzyńska-Wierdak R., Dyduch J., Sawicka A., Łabuda H., Buczkowska H., *Ostropest plamisty (Silybum marianum [L.] Gaertn.) – fitochemia i efekty terapeutyczne*, *Annales Horticulturae*, 4, 2018, s. 15-32.
5. Marceddu R., Dinolfo L., Carrubba A., Sarno M., Di Miceli G., *Milk thistle (Silybum marianum L.) as a novel multipurpose crop for agriculture in marginal environments: A review*, *Agronomy*, 3, 2022, s. 729.
6. Bendowski W., Michalczuk M., Józwiak A., Kareem K.Y., Łozicki A., Karwacki J., Bień D., *Using milk thistle (Silybum marianum) extract to improve the welfare, growth performance and meat quality of broiler chicken*, *Animals (Basel)*, 9, 2022, s. 1085.
7. Brantley S.J., Argikar A.A., Lin Y.S., Nagar S., Paine M.F., *Herb-drug interactions: challenges and opportunities for improved predictions*, *Drug Metabolism & Disposition*, 3, 2014, s. 301-317.

8. Andrzejewska J., Skinder Z., *Ostropest plamisty – uwagi o nazewnictwie, substancjach czynnych i rozwoju rośliny*, Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura, 1, 2006, s. 5-10.
9. Kren V., Walterová D., *Silybin and silymarin-new effects and application*, Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 1, 2005, s. 29-41.
10. AbouZid S.F., Ahmed H.S., Moawad A.S., Owis A.I., Chen S.N., Nachtergaeel A., McAlpine J.B., Brent Friesen J., Pauli G.F., *Chemotaxonomic and biosynthetic relationships between flavonolignans produced by Silybum marianum populations*, Fitoterapia, 119, 2017, s. 175-184.
11. Křen V., Valentová K., *Silybin and its congeners: from traditional medicine to molecular effects*, Natural Product Reports, 6, 2022, s. 1264-1281.
12. Csupor D., Csorba A., Hohmann J., *Recent advances in the analysis of flavonolignans of Silybum marianum*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 130, 2016, s. 301-317.
13. Lee D.Y., Liu Y., *Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, isolated from Silybum marianum (milk thistle)*, Journal of Natural Products, 9, 2003, s. 1171-1174.
14. Zuber R., Modrianský M., Dvorák Z., *Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities*, Phytotherapy Research, 7, 2002, s. 632-638.
15. Jiang C., Agarwal R., Lü J., *Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1, 2000, s. 371-378.
16. Katiyar S.K., *Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects (review)*, International Journal of Oncology, 1, 2005, s. 169-176.
17. Singh R.P., Agarwal R., *Cosmeceuticals and silibinin*, Clinics in Dermatology, 5, 2009, s. 479-484.
18. Drouet S., Leclerc E.A., Garros L., Tungmunnithum D., Kabra A., Abbasi B.H., Lainé É., Hano C., *A green ultrasound-assisted extraction optimization of the natural antioxidant and anti-aging flavonolignans from milk thistle Silybum marianum (L.) Gaertn. Fruits for cosmetic applications*, Antioxidants (Basel), 8, 2019, s. 304.
19. Warwas M., Piwowar A., Kopiec G., *Zaawansowane produkty glikacji (AGE) w organizmie – powstawanie, losy, interakcja z receptorami i jej następstwa*, Farmacja Polska, 8, 2010, s. 585-590.
20. Vostálová J., Tinková E., Biedermann D., Kosina P., Ulrichová J., Rajnochová Svobodová A., *Skin protective activity of silymarin and its flavonolignans*, Molecules, 6, 2019, s. 1022-1026.
21. Adhikari M., Arora R., Chawla R., Sharma J., Dhaker A.S., Gupta D., Dubey N., Kumar R., Ivanov V., Gadjeva V., Gevrenova R., Sharma R.K., *Evaluation of silymarin as a promising radioprotector*, Zeitschrift für Naturforschung C, 5-6, 2010, s. 337-346.
22. Kim H.J., Park H.S., Lee I.S., *Microbial transformation of silybin by Trichoderma koningii*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 4, 2006, s. 790-793.
23. Neha K.C., Jaggi A.S., Singh N., *Silymarin and its role in chronic diseases*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 929, 2016, s. 25-44.
24. Jancova P., Anzenbacherova E., Papouskova B., Lemr K., Luzna P., Veinlichova A., Anzenbacher P., Simanek V., *Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro*, Drug Metabolism & Disposition, 11, 2007, s. 2035-2039.
25. Draelos Z.D., Diaz I., Cohen A., Mao J., Boyd T., *A novel skin brightening topical technology*, Journal of Cosmetic Dermatology, 12, 2020, s. 3280-3285.
26. Bijak M., *Silybin, a major bioactive component of milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn.) – chemistry, bioavailability, and metabolism*, Molecules, 11, 2017, s. 1942-1945.

27. Cho J.W., Il K.J., Lee K.S., *Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of Smad2/3-dependent signaling pathways: potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids*, International Journal of Molecular Medicine, 5, 2013, s. 1148-1152.
28. Duthie S.J., Johnson W., Dobson V.L., *The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells*, Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1-2, 1997, s. 141-151.
29. www.ducray.com/pl-pl/ekspercka-odpowiedz-ducray/wypadanie-wlosow [data dostępu: 20.02.2023].
30. Wang X., Zhang Z., Wu S.C., *Health benefits of Silybum marianum: phytochemistry, pharmacology, and applications*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 2020, s. 11644-1166.
31. Lee D.G., Kim H.K., Park Y., Park S.C., Woo E.R., Jeong H.G., Hahm K.S., *Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from Silybum marianum*, Archives of Pharmacal Research, 8, 2003, s. 597-600.
32. El-Shitany N.A., Hegazy S., El-Desoky K., *Evidences for antiosteoporotic and selective estrogen receptor modulator activity of silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectomized rats*, Phytomedicine, 17(2), 2010, s. 116-125.
33. Koltai T., Fliegel L., *Role of silymarin in cancer treatment: facts, hypotheses, and questions*, Journal of Evidence-Based Integrative Medicine, 27, 2022, s. 2515-2518.
34. Singh R.P., Tyagi A.K., Zhao J., *Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis*, Carcinogenesis, 3, 2002, s. 499-510.
35. Emadi S.A., Ghasemzadeh Rahbardar M., Mehri S., Hosseinzadeh H., *A review of therapeutic potentials of milk thistle (Silybum marianum L.) and its main constituent, silymarin, on cancer, and their related patents*, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 10, 2022, s. 1166-1176.
36. Prasad R.R., Paudel S., Raina K., Agarwal R., *Silibinin and non-melanoma skin cancers*, Journal of Traditional and Complementary Medicine, 3, 2020, s. 236-244.
37. Meddeb W., Rezig L., Abderrabba M., Lizard G., Mejrj M., *Tunisian milk thistle: an investigation of the chemical composition and the characterization of its cold-pressed seed oils*, International Journal of Molecular Sciences, 12, 2017, s. 2582.

Ostropest plamisty – rzadki składnik kosmetyków

Streszczenie

Ostropest plamisty (*Silybum marianum*) jest rośliną znaną od wieków. Pierwsze wzmianki o leczniczych właściwościach ostropestu pochodzą sprzed blisko 2 tysięcy lat. Najczęściej ostropest plamisty kojarzony jest z protekcją wątroby i dróg żółciowych, prawdopodobnie ze względu na wieloletnią obecność na rynku farmaceutycznym sylimaryny – stosowanej powszechnie we wspieraniu pracy tych narządów.

Celem niniejszej pracy jest ukazanie możliwości wykorzystania składników wyizolowanych z ostropestu plamistego we współczesnych, innowacyjnych dermokosmetykach. Ponadto przedstawiono kluczowe właściwości prozdrowotne ostropestu.

Stosunkowo niedawno zaczęto zastanawiać się nad wykorzystaniem dobroczynnych właściwości tej rośliny, opierając się nie tylko na znanej już sylimarynie, ale także flawonoidach, olejkach eterycznych, sterolach, aminach biogennych, cukrach czy białkach także w niej identyfikowanych. Najistotniejsza w chwili obecnej wydaje się możliwość wykorzystania ostropestu plamistego w kosmetyce ze względu na działanie antyoksydacyjne, hamowanie utleniania lipidów, poprawę płynności i składu sebum, co jest szczególnie istotne we wszystkich schorzeniach przebiegających z łojotokiem. Jednocześnie ostropest ogranicza uwalnianie histaminy z komórek tłuszcznych, aktywność 5-lipooksygenazy, a także zmniejsza biosynteze prozapalnych prostaglandyn. Poza tym aktywuje rybosomową syntetazę białkową tRNA, co pomaga w wytwarzaniu nowych białek, czyli regeneracji komórek. Oprócz tego sylimaryna posiada właściwości fotoprotekcyjne – hamuje powstawanie rumienia wywołanego przez promieniowanie UVB, a także indukuje regenerację DNA po uszkodzeniu

inicjowanym przez UVB. Niezwykle interesujący wydaje się wpływ silymaryny na tkankę łączną, w tym protekcyjne działanie wobec tworzenia się keloidów. Coraz więcej badań sugeruje, iż może mieć także działanie przeciwnowotworowe.

Prawdopodobnie nie znamy jeszcze wszystkich właściwości ostropestu i nie potrafimy ich do końca spożytkować. Zastosowanie silymaryny zarówno w leczeniu chorób skóry, jak i w jej pielęgnacji wydaje się zatem niezwykle ciekawym zagadnieniem, które dopiero zostanie wykorzystane na większą skalę.

Słowa kluczowe: ostropest plamisty, silymaryna, dermokosmetyki

Milk thistle – a rare ingredient in cosmetics

Abstract

Milk thistle (*Silybum marianum*) is a plant that's been known for centuries. First mentions of its healing properties come from nearly 2,000 years ago. Most often, milk thistle is associated with protection of the liver and bile ducts, probably due to the long-term presence of silymarin on the pharmaceutical market, commonly used to support the work of these organs.

The aim of this work is to show the possibility of using ingredients isolated from milk thistle in modern, innovative dermocosmetics. In addition, the key health-promoting properties of milk thistle are presented.

Relatively recently, people began to consider the use of the beneficial properties of this plant based not only on the already known silymarin, but also flavonoids, essential oils, sterols, biogenic amines, sugars and proteins which are also identified in it. At present, the most important seems to be the possibility of using milk thistle in cosmetics due to its antioxidant effect, inhibition of lipid oxidation, improvement of sebum fluidity and composition, which is particularly important in all diseases with seborrhea. Milk thistle reduces the release histamine from mast cells, the activity of 5-lipoxygenase, and also reduces the biosynthesis of pro-inflammatory prostaglandins. In addition, it activates the aminoacyl-tRNA synthetase which helps in the production of new proteins, i.e. cell regeneration. In addition, silymarin has photoprotective properties – it inhibits the formation of erythema caused by UVB radiation, and also induces DNA regeneration after UVB-initiated damage. The effect of silymarin on the connective tissue, including the protective effect against the formation of keloids, seems to be extremely interesting. More and more research suggests that it may also have anti-cancer effects.

So far, we probably don't know all the properties of milk thistle and we can't fully use them. The use of silymarin both in the treatment of skin diseases and in its care seems to be an extremely interesting issue, which will only be used on a larger scale.

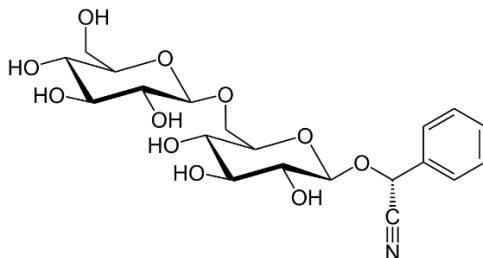
Keywords: milk thistle, silymarin, dermocosmetics

Aktywność biologiczna amigdaliny

1. Wprowadzenie

Glikozydy cyjanogenne (nitylozydy) to związki chemiczne produkowane przez wiele gatunków roślin należących do różnych rodzin botanicznych, m.in. len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.) [1], koniczynę białą (*Trifolium repens* L.) [2], maniok jadalny (*Manihot esculenta* Crantz) [3] czy migdałowiec pospolity (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) [4]. Związki te są magazynowane w wakuolach i uwalniane oraz aktywowane przez cytoplazmatyczne enzymy w przypadku ataku rośliny przez fitofagi [5]. β -Glukozydazy oraz α -hydroksynitylasy prowadzą do degradacji nitylozydów, powodując uwolnienie toksycznego cyjanowodoru [5, 6]. Przechowywanie glikozydów cyjanogennych w postaci nieaktywnej w wakuolach zapobiega uszkodzeniu rośliny w normalnych warunkach. Nitylozydy mogą odpowiadać za kontrolę kiełkowania, tworzenie pąków, transport węgla i azotu oraz działać jako przeciwutleniacze [5]. Jednym z najbardziej znanych nitylozydów jest amigdalina, którą po raz pierwszy wyizolowali z gorzkich migdałów w latach 30. XIX wieku francuscy chemicy P.J. Robiquet i A.F. Boutron-Charlard [7].

Amigdalina jest naturalnym glikozydem cyjanogennym, w którym aglikon stanowi 2-hydroksy-2-fenylacetonitryl (tzw. mandelonitryl). Część cukrową amigdaliny stanowi gencjiozoza, czyli 2 cząsteczki β -D-glukopiranozy połączone wiązaniem β -1,6-glikozydowym (rys. 1). Nazwa chemiczna amigdaliny zalecana przez IUPAC to (2R)-[(6-O- β -D-glukopiranozylo- β -D-glukopiranozylo)oksy]fenylacetonitryl, a jej wzór sumaryczny to $C_{20}H_{27}NO_{11}$ [8].



Rysunek 1. Wzór strukturalny amigdaliny
Źródło: opracowanie własne na podstawie [8].

Najważniejszym naturalnym źródłem amigdaliny są nasiona roślin z rodziny różowatych (*Rosaceae* Juss.). Zawartość amigdaliny różni się znacznie między poszczególnymi gatunkami. Najobficiej występuje ona w nasionach owoców migdałowca pospolitego (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb). Gorzki smak wewnętrznej części nasienia migdałów jest cechą recesywną, a zmiana w recesywnym genie Sweet kernel [Sk] powoduje, że słodkie i półgorzkie migdały zawierają mniej amigdaliny [4]. Zawartość amigdaliny

¹ kryswo1327@student.polsl.pl, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska.

² gabriela.pastuch-gawolek@polsl.pl, Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska.

w gorzkich migdałach waha się od 33 g/kg do 54 g/kg w zależności od odmiany, w przypadku półgorzkich migdałów wartość ta znacząco spada (od 0,5 g/kg do 1,8 g/kg), zaś w odmianach słodkich jej średnia zawartość wynosi już tylko 0,063 g/kg [9].

Zawartość amigdaliny w nasionach innych przedstawicieli różowatych (*Rosaceae*) jest znacznie niższa, a jej największą średnią zawartość mają nasiona zielonej śliwki (17,5 g/kg), moreli słodkiej (14,4 g/kg), czarnej śliwki (10 g/kg), brzoskwini (6,8 g/kg), czerwonej wiśni (3,9 g/kg), jabłka (3 g/kg), czarnej wiśni (2,7 g/kg) i gruszki (1,3 g/kg) [10]. W przypadku moreli gorzkiej zawartość amigdaliny w zależności od odmiany waha się w przedziale od 44 g/kg do 64 g/kg [11]. Zawartość amigdaliny w poszczególnych nasionach w znacznej mierze zależy od odmiany, regionu występowania, czynników środowiskowych, a także praktyki uprawy [10].

Obecność amigdaliny, obok innych glikozydów cyjanogennych, wykryto u kabaczka (*Cucurbita*) z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae* Juss.), ale również u przedstawicieli motylkowatych (*Fabaceae* Lindl.), np. w grochu (*Pisum*), wilczomleczowatych (*Euphorbiaceae* Juss.), np. manioku (*Manihot*), a także w roślinach z rodziny wiechlinowatych (*Poaceae* (R. Br.) Barnh.), np. w nasionach prosa (*Panicum*) i sorgo (*Sorghum*) [10, 12].

Pierwsze potwierdzone doniesienia o podawaniu amigdaliny chorym w USA sięgają lat 20. XX wieku [13]. Natomiast już w latach 70. XX wieku stosowanie amigdaliny było jedną z najpowszechniejszych niekonwencjonalnych terapii przeciwnowotworowych – do 1978 roku stosowało ją niemal 70 tysięcy chorych na raka Amerykanów [14].

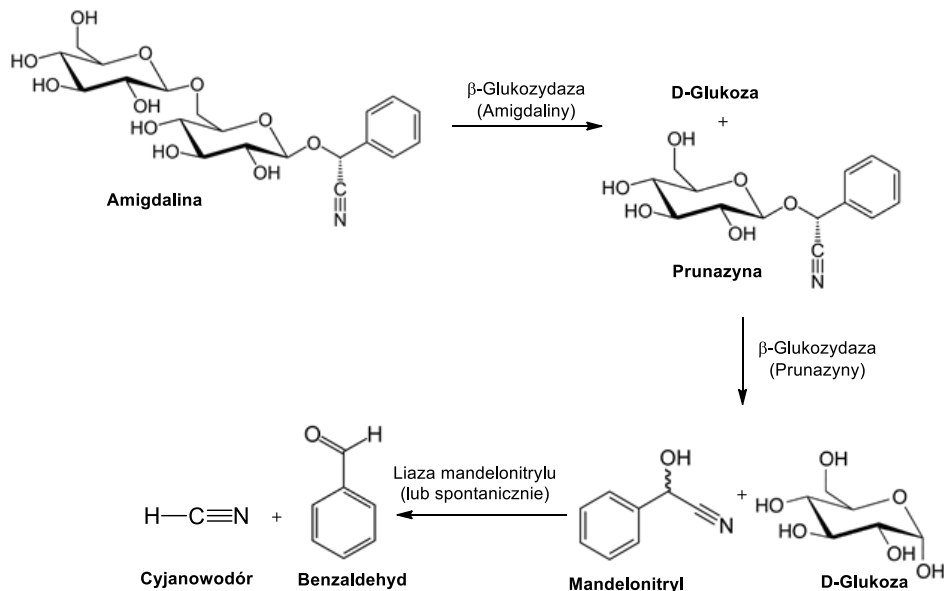
Tematyka związana z możliwością wykorzystania amigdaliny w terapii przeciwnowotworowej była obiektem zainteresowania wielu badaczy, a liczne badania poświęcone tej kwestii stały się przedmiotem kilku interesujących przeglądowych prac naukowych [8, 15-19]. Jednakże wciąż nie ma jednoznacznego stanowiska co do skuteczności i bezpieczeństwa stosowania amigdaliny w terapii przeciwnowotworowej. W związku z tym tematyka ta pozostaje nadal przedmiotem badań i dyskusji w środowisku naukowym.

Celem niniejszej publikacji jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącej zastosowania amigdaliny w terapii przeciwnowotworowej, podstawowych mechanizmów jej działania oraz oceny skuteczności w leczeniu różnych typów nowotworów. Przedstawiono także analizę profilu toksykologicznego oraz omówiono potencjalne cele działania amigdaliny wynikające z jej biologicznej aktywności. Nacisk położono na najnowsze aktualizacje badań nad amigdaliną w celu możliwie najlepszej oceny jej właściwości farmakologicznych.

2. Enzymatyczna hydroliza amigdaliny

Reakcja hydrolizy amigdaliny zachodzi w co najmniej 3 etapach (rys. 2). Pierwszy etap obejmuje rozerwanie wiązania β -(1-6)-glikozydowego gencjobiozy, w wyniku czego powstaje prunazyne (β -glukozyd D-(-)-mandelonitrylu) oraz glukoza. W 2. etapie prunazyne hydrolizuje do (+)-mandelonitrylu oraz glukozy. W ostatnim etapie (+)-mandelonitryl jest rozkładany do benzaldehydu oraz cyjanowodoru [20, 21]. W przypadku roślin udział w hydrolizie amigdaliny biorą kolejno 2 wysoce specyficzne enzymy, β -glukozydaza amigdaliny (EC 3.2.1.117) oraz β -glukozydaza prunazyne (EC 3.2.1.118) [22, 23]. Powstały mandelonitryl jest natomiast rozkładany pod wpływem liazy mandelonitrylu (EC 4.1.2.10) [24]. W przypadku człowieka zostały opisane 2 różne szlaki metaboliczne amigdaliny podawanej doustnie. Pierwszy szlak został opisany jako metabolizm pierwszego przejścia amigdaliny do prunazyne przez odszczepienie końcowej reszty

glukozy w wyniku działania $\beta(1-6)$ -glukozydazy w proksymalnej części jelita cienkiego. Drugim szlakiem jest całkowita hydroliza amigdaliny do glukozy, benzaldehydu i cyjanowodoru pod wpływem β -glukozydazy wytwarzanej przez mikroflorę okrężnicy [25]. Enzymem biorącym udział w hydrolizie amigdaliny w organizmie człowieka jest β -glukozydaza, zwana też emulsyną (EC 3.2.1.21), wykazująca szeroką specyficzność dla β -D-glukozydów [26]. W organizmie ludzkim mandelonitryl jest niestabilny i spontanicznie ulega rozkładowi z wytworzeniem cyjanowodoru i benzaldehydu [15]. Początkowe 2 etapy hydrolizy, prowadzące do otrzymania mandelonitrylu, zachodzą w środowisku kwaśnym, natomiast rozkład mandelonitrylu do benzaldehydu i cyjanowodoru ma miejsce w środowisku alkalicznym [27].



Rysunek 2. Schemat enzymatycznej hydrolizy amigdaliny
Źródło: opracowanie własne na podstawie [15].

3. Aktywność biologiczna amigdaliny

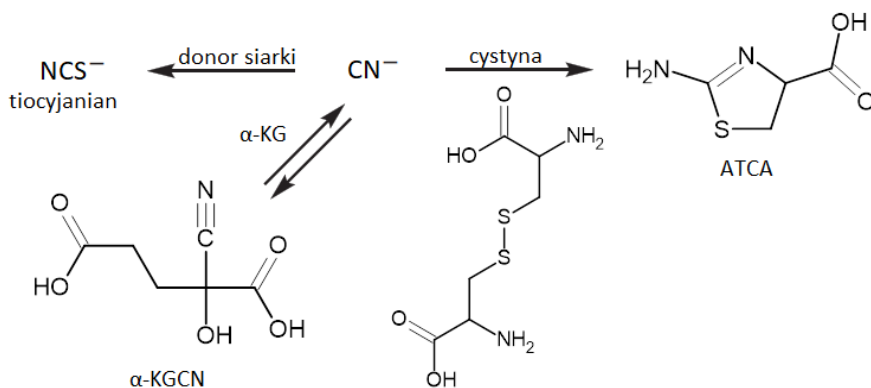
Obecność cyjanowodoru i benzaldehydu w strukturze amigdaliny decyduje o jej aktywności biologicznej. Wskutek kontaktu amigdaliny z enzymami, które ją hydrolizują, podczas maceracji tkanek rośliny zawierającej glikozydy cyjanogenne następuje uwolnienie cyjanowodoru. U ludzi powstawanie cyjanowodoru jest powodowane przez mikroflorę bakteryjną jelita, która jest zdolna do wytwarzania β -glukozydazy [26, 28, 29].

3.1. Działanie i detoksykacja w organizmie

W wyniku całkowitej hydrolizy 1 g amigdaliny uwalnia się 59 mg cyjanowodoru [30]. Cyjanowódor, wiążąc się z miejscem aktywnym oksydazy cytochromu C (zawierającym jony żelaza Fe^{3+}), hamuje funkcjonowanie białka oraz metabolizm tlenu, prowadząc do „uduszenia się” komórki [31]. Około 80% cyjanowodoru ulega detoksykacji w wątrobie [31]. Jest to możliwe dzięki obecności w mitochondriach enzymu rodanazy (EC 2.8.1.1) [7], która przekształca cyjanki w mniej toksyczne tiocyjaniany wydalone z moczem [16]. Niezbędna do tej reakcji siarka jest pobierana z innych związków, np. tiosiarczanów.

Tiocyjaniany nie blokują transportu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym [32]. Zawartość rodanazy w komórkach nowotworowych jest znacznie niższa niż w komórkach zdrowych, a zatem komórki nowotworowe mają ograniczoną zdolność do detoksykacji cyjanowodoru [33]. Glikoliza beztlenowa jest dominującym szlakiem metabolicznym w komórkach nowotworowych. W efekcie powstałe kwaśne środowisko, wywołane syntezą kwasu mlekowego, zwiększa aktywność β -glukozydazy, co skutkuje zwiększoną produkcją cyjanowodoru w komórkach nowotworowych i wzmocnieniem procesu apoptozy komórki [34].

Metabolizm cyjanowodoru w żywym organizmie może przebiegać na różne sposoby. Jeden z nich obejmuje połączenie cyjanowodoru z hydroksykobalaminą i utworzenie cyjanokobalaminy (witaminy B₁₂) [16]. Pozostałe jony cyjankowe są utleniane do mrówczanów i dwutlenku węgla. Mrówczany są wydalane z moczem, a dwutlenek węgla przez płuca [16]. Niewielka ilość cyjanków łączy się również z L-cysteiną, tworząc kwas 2-amino-2-tiazolino-4-karboksylowy (ATCA). Ten szlak odpowiada za około 15% metabolizmu cyjanków [35]. Tiocyjaniany i ATCA są chemicznie stabilnymi metabolitami i zostają ostatecznie wydalone z moczem [36]. Innym szlakiem detoksykacji jest reakcja cyjanku z endogennym α -ketoglutaranem (α -KG) z wytworzeniem cyjanohydryny α -ketoglutaranu (a-KGCN). Zakłada się, że szlak ten staje się ważny, gdy szlaki tiocyjanianu oraz ATCA są przeciążone [37]. Możliwe drogi detoksykacji cyjanków przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 3. Detoksykacja jonów cyjankowych
Źródło: opracowanie własne na podstawie [30].

Podczas gdy tworzenie ATCA i α -KGCN przebiega bez udziału enzymów, główny szlak detoksykacji cyjanku, tj. tworzenie tiocyjanianu, odbywa się za pośrednictwem 3 enzymów. Pierwszym enzymem jest wspomniana wcześniej rodanaza, która przenosi siarkę ze źródła siarki sulfanowej do cyjanku [38]. Enzym 2., tj. siarkotransferaza 3-merkaptopirogronianowo-cyjankowa (EC 2.8.1.2, MPST), katalizuje przenoszenie siarki z 3-merkaptopirogronianu na siarczyny i cyjanki [39]. W ten sposób MPST może dostarczać tiosiarczan do rodanu, ale także bezpośrednio przekształcać cyjanek w tiocyjaniany. Z kolei 3. enzym, γ -liaza cystationowa (EC 4.4.1.1.), przekształca cysteinę w tiocysteinę, będącą donorem siarki sulfanowej dla rodanku [40]. Ponadto przeprowadzone badania wskazują, że również kwas liponowy może brać udział w detoksykacji cyjanków, zwiększając szybkość wydalania tiocyjanianu [32].

3.2. Problem toksyczności amigdaliny

Sama amigdalina nie jest związkiem toksycznym, dopiero końcowe produkty jej hydrolizy – benzaldehyd oraz, w szczególności, cyjanowodor wykazują właściwości toksyczne [10, 17, 41]. Wytwarzany cyjanowodor może wywołać toksyczne działanie o różnym nasileniu, które zależy od wielu czynników, takich jak podana dawka, droga podania, wiek, masa ciała oraz ogólny stan organizmu. Doustne podanie amigdaliny wywołuje większą toksyczność niż podanie drogą dożylną. Średnia dawka śmiertelna (LD50) amigdaliny po podaniu doustnym szczerom wynosi 880 mg/kg masy ciała [17]. Droga iniekcji może prowadzić do mniejszej toksyczności cyjanowodoru ze względu na mniejszą aktywność β -glukozydazy i rodnanazy [42-46]. Doustna dawka amigdaliny poniżej 1 g dziennie jest całkowicie bezpieczna dla organizmu [41, 47]. Wstrzyknięcie amigdaliny dożylnie w dawkach 6, 9 i 18 mg/kg zwiększa poziom cyjanowodoru we krwi i może prowadzić do znacznego obniżenia poziomu kwasu mlekowego we krwi, za co prawdopodobnie odpowiada zmniejszona, w wyniku obniżenia pH, aktywność enzymu dehydrogenazy mleczanowej [48-51].

Odnotowano kilka przypadków ostrej toksyczności po doustnym podaniu amigdaliny wynikającej z niemożności dokładnego dostosowania dawki w zależności od indywidualnych warunków pacjenta i jego mikrobioty jelitowej [52]. Aby lepiej zrozumieć wpływ amigdaliny na zdrowie pacjentów, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań skupiających się nie tylko na jej właściwościach farmakologicznych i toksykologicznych, jak większość dotychczasowych badań [53-55], ale również na poznaniu mechanizmów działania samej amigdaliny i ograniczeniu skutków ubocznych jej stosowania.

Badania na zwierzętach nie dostarczają solidnej podstawy do oceny związanego z toksycznością amigdaliny ostrego zagrożenia dla zdrowia człowieka. U myszy, królików i psów najwyższa dawka amigdaliny, która nie wywołuje skutków ubocznych, wynosi 3 g/kg przy podaniu dożylnym lub domięśniowym oraz 75 mg/kg przy podaniu doustnym [18]. Natomiast maksymalna tolerowana dawka amigdaliny u ludzi po podaniu dożylnym wynosi około 70 mg/kg [18].

Należy unikać jednoczesnego przyjmowania amigdaliny i witamin, zwłaszcza witaminy C, która może nasilać konwersję amigdaliny do cyjanku i zwiększać jej toksyczne działanie w organizmie. Istnieją dowody na to, że duże dawki witaminy C obniżają poziom cysteiny, która jest zaangażowana w proces detoksykacji cyjanku do tiocyjnianu [52, 56, 57].

Po podaniu doustnym amigdalina ulega hydrolizie wywoływanej przez β -glukozydazę, w wyniku czego stężenie amigdaliny we krwi jest niskie, a stężenie cyjanków oraz prunazyny wzrasta [15]. Natomiast po podaniu dożylnym stężenie amigdaliny we krwi jest wysokie, a cyjanków praktycznie się nie wykrywa [58]. W przypadku infuzji dożylnych amigdalina jest wydalana głównie w swojej pierwotnej postaci z moczem [59]. Dożylna infuzja amigdaliny może ominąć degradację enzymatyczną w przewodzie pokarmowym i nie powodować toksyczności cyjankowej związanej z rozkładem amigdaliny, podczas gdy podawanie doustne powoduje znaczący wzrost poziomu cyjanków we krwi [60].

3.3. Wpływ na układ odpornościowy

Amigdalina w dawkach od 25 μ g/ml do 400 μ g/ml powoduje zwiększone wydzielanie polihydroksyalkanianów w wyniku proliferacji limfocytów T we krwi [61]. Proces ten przyczynia się do zwiększenia wydzielania interleukiny 2 (IL-2), będącej cytokiną

odpowiedzialną za wzrost limfocytów T oraz interferonu γ (IFN- γ), czyli białek produkowanych przez komórki w wyniku obecności patogenów. Zahamowane zostaje wydzielanie transformującego czynnika wzrostu beta 1 (TGF- β 1), który przyczynia się do odpowiedniego kontrolowania wzrostu i różnicowania komórek. Ostatecznie efektem działania amigdaliny jest poprawa funkcji odpornościowych organizmu. W badaniach *in vivo* na szczurach z przeszczepioną nerką amigdalina (w dawce 10 mg/kg dootrzewnowo) hamowała proliferację komórek odpornościowych, wywierała działanie immunosupresyjne i wydłużała czas przeżycia szczurów [61, 62]. Jednakże w innym badaniu, przeprowadzonym na myszach z przeszczepioną nerką, ta sama ilość amigdaliny zmniejszała aktywność immunosupresyjną [61, 63]. Ponadto amigdalina (w dawce 5 mg/kg dootrzewnowo) wpływała na lokalną aktywność komórek odpornościowych i znacząco zmniejszała ogniska endometriozy [64]. Większość badań potwierdza zwiększenie wydajności komórek odpornościowych przez amigdalinę, ale w niektórych przypadkach zaobserwowano również zwiększenie szansy powodzenia przeszczepów [65-67]. W związku z tym, aby zweryfikować te sprzeczne wyniki, konieczne jest przeprowadzenie większej ilości badań *in vivo* na zwierzętach.

3.4. Działanie przeciwzwłóknieniowe

Głównymi przyczynami zwłóknienia śródmiąższowego nerek są hiperplazja fibroblastów nerek (KFB) oraz nadmierna ilość macierzy pozakomórkowej (ECM). Transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF- β 1) może przekształcać nieaktywne fibroblasty nerkowe w miofibroblasty [68]. W badaniach na ludzkich komórkach KFB stwierdzono, że amigdalina w zakresie stężeń od 25 μ g/ml do 200 μ g/ml hamuje proliferację fibroblastów w sposób zależny od stężenia [61]. Ponadto amigdalina w zakresie stężeń od 50 μ g/ml do 400 μ g/ml może hamować wydzielanie TGF- β 1 w limfocytach krwi obwodowej stymulowanych przez fitohemaglutyninę w sposób zależny od stężenia [60, 62]. W badaniach *in vivo* na szczurach z jednostronną niedrożnością moczowodu stwierdzono, że amigdalina podawana dootrzewnowo w dawkach 3 mg/kg i 5 mg/kg zmniejsza rozległość zmian cewkowo-śródmiąższowych [61].

Zwłóknienie wątroby cechuje się nadmierną produkcją i odkładaniem białek ECM [69]. Głównymi czynnikami progresji zwłóknienia wątroby są TGF- β oraz czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF) [70]. W badaniach *in vitro* wykazano, że amigdalina (w stężeniu 200 μ g/ml; po 48 godzinach i 72 godzinach) obniża poziomy ekspresji mRNA CTGF oraz TGF- β w komórkach gwiazdzistych wątroby [71]. W innym badaniu amigdalina (w zakresie stężeń od 5 mol/l do 10 mol/l) znacząco hamowała ekspresję płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) oraz mRNA insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF) [62]. Badania te wskazują, że amigdalina może być nowym środkiem terapeutycznym stosowanym w przypadku zwłóknienia wątroby.

Dootrzewnowe podanie amigdaliny w dawce 48 mg znacznie zmniejszało ilość kolagenu w płucach i ceruloplazminy w surowicy u szczurów z indukowanym przez SiO₂ zwłóknieniem płuc [72]. W badaniu na szczurach ze zwłóknieniem płuc wywołanym przez bleomycynę podanie dootrzewnowe amigdaliny w dawce 15 mg/kg skutkowało zmniejszeniem ekspresji kolagenu typu I i typu III [73].

W badaniu *in vivo* stwierdzono, że dożylnie podawanie amigdaliny w dawce 10 mg/kg szczurom z przewlekłym zapaleniem trzustki wywołanym dichlorkiem dibutylocyny prowadzi do zwiększenia masy ciała oraz przepływu krwi przez trzustkę. Dodatkowo

zaobserwowano zmniejszenie zwłóknienia trzustki oraz zniszczenia zrazików, a także obniżenie ekspresji α -aktyny mięśni gładkich, PDGF-BB, TGF- β 1 i endoteliny-1 oraz zwiększenie ekspresji peptydu związanego z genem kalcytoniny [74].

3.5. Działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe

Makrofagi indukują wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 oraz IL-12 [75, 76]. Podczas reakcji zapalnej uwalniane są czynniki zapalne IL-23, chemokina 2 oraz chemokina 5, które aktywują szlaki sygnałowe jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF- κ B) oraz kinaz p38 [77]. Aktywowany mitogenem szlak sygnałowy kinazy białkowej p38 (MAPK) jest jednym z czynników transkrypcyjnych NF- κ B, który aktywuje ekspresję czynników prozapalnych w odpowiedzi na różne bodźce. Nadaktywna sygnalizacja p38 MAPK/NF- κ B odgrywa istotną rolę w stanach zapalnych choroby [77].

W badaniu *in vitro* na mysich komórkach mikrogleju BV2 wykazano, że amigdalina może zmniejszać produkcję prostaglandyn E2, poziom cyklooksygenazy-1 (COX-1), cyklooksygenazy-2 (COX-2) oraz mRNA indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) [77]. W mysich makrofagach otrzewnowych (RAW264.7) amigdalina w stężeniu 50 mmol/l znacząco obniżała ekspresję IL-17A, IL-23, mRNA chemokiny 2 i chemokiny 5 oraz poziom białka p-p38 [78]. Natomiast w badaniu *in vivo* na myszach podawana dootrzewnowo amigdalina w zakresie dawek od 0,5 mg/kg do 2 mg/kg znacznie zmniejszała ostre uszkodzenie płuc wywołane lipopolisacharydem (LPS), a efekt ten związany był ze zmniejszeniem poziomu TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz NF- κ B [79].

Ból jest jednym z objawów stanu zapalnego, który może wystąpić w wyniku pobudzenia receptorów bólowych przez cytokiny, które są uwalniane podczas procesu zapalnego [80]. Amigdalina zmniejsza ekspresję mRNA IL-1 β oraz TNF- α i łagodzi odpowiedź bólową komórek RAW264.7, indukowaną LPS [81]. W badaniu *in vivo* amigdalina w dawce 0,005 mg/kg podana domięśniowo złagodziła ból u szczurów z zapaleniem stawów wywołanym karageniną [81]. W teście wicia się myszy (model bólu wywołanego kwasem octowym) wykazano, że działanie przeciwbólowe amigdaliny w dawkach 100 i 300 mg/kg zaczyna się po ok. 30-45 minutach od podania doustnego, osiągając szczyt skuteczności po upływie od 1,5 godziny do 2 godzin (bez efektów tolerancji na lek) [82]. Wyniki badań wskazują, że amigdalina może być stosowana jako środek przeciwbólowy o działaniu antynocycyptywnym i przeciwzapalnym.

3.6. Działanie przeciwbakteryjne, przeciwasożytnicze i przeciwwirusowe

Amigdalina może stanowić alternatywę dla syntetycznych antybiotyków, których powszechne stosowanie stopniowo wpływa na zwiększającą się oporność bakterii na antybiotykoterapię [83]. Ekstrakt z nasion i owoców moreli wykazuje aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* względem bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, a także grzybów [84, 85]. Amigdalina hamuje również wzrost prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*) oraz bakterii *Helicobacter pylori* [86, 87]. Ekstrakt z moreli wykazuje także działanie przeciwasożytnicze wobec wiciowców, m.in. leiszmanii tropikalnej (*Leishmania tropica*), hamując wzrost promastigotów i amastigotów [88]. Ekstrakty z nasion wykazują także działanie przeciwwirusowe względem wirusa grypy typu A: H₁N₁ oraz hamujący wpływ na proteazę HIV-1 [89].

3.7. Działanie przeciwastmatyczne

Rozpad amigdaliny i powstanie cyjanowodoru wpływa na syntezę płucnych surfaktantów, co może przyczyniać się do uspokojenia ruchów oddechowych [19]. W badaniu wykazano, że amigdalina sprzyja namnażaniu komórek nabłonka pęcherzyków płucnych typu II (AECII) wystawionych na działanie powietrza, a najlepsze wyniki uzyskano dla stężenia roztworu amigdaliny 200 $\mu\text{mol/l}$ [19].

W innym badaniu stwierdzono, że podawanie amigdaliny w dawkach 100, 200 i 400 $\mu\text{g/ml}$ zwiększa żywotność komórek nabłonka oskrzeli BEAS-2B narażonych na LPS (w dawce 25 $\mu\text{g/ml}$), które są modelem astmy typu kaszel (CVA), w porównaniu z komórkami nietraktowanymi amigdalina. Ponadto amigdalina przeciwdziała apoptozie wywołanej przez LPS, ogranicza odpowiedzi zapalne (syntezę prozapalnych cytokin), a także zmniejsza produkcję białka śluzu oraz hamuje szlak sygnałowy kompleksów białkowych TLR4/NF- κB w komórkach BEAS-2B [90].

3.8. Efekt przeciwmiażdżycowy

W badaniu *in vivo* stwierdzono, że dootrzewnowe podanie amigdaliny w dawce 1 mg/kg myszom z unieczynnionym genem apolipoproteiny E obniża poziomy cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, cholesterolu lipoprotein o małej gęstości, metaloproteinazy-2 oraz metaloproteinazy-9 macierzy i promuje apoptozę komórek blaszki miażdżycowej [91]. Amigdalina może również ograniczać postęp miażdżycy u myszy z niedoborem apolipoproteiny E poprzez indukcję regulatorowych limfocytów T oraz łagodzić postęp miażdżycy, hamując ekspresję i aktywność receptorów toll-podobnych [91, 92]. Dootrzewnowe podanie amigdaliny w dawce 3 g/kg myszom ze stresem retikulum śródplazmatycznego, indukowanym przez wstrzyknięcie tunikamycyny, zwiększało poziomy transaminazy alaninowej, transaminazy asparaginianowej oraz lipidów w surowicy [93]. W badaniu klinicznym przeprowadzonym na ochotnikach spożywających owoce moreli (w ilości 200 g dziennie przez 3 tygodnie) wykazano umiarkowane obniżenie poziomu trójglicerydów, cholesterolu całkowitego, LDL, VLDL oraz znaczny wzrost poziomu HDL w osoczu [94].

3.9. Działanie kardioprotekcyjne

W badaniu *in vivo* na szczurach z przerostem mięśnia sercowego wywołanym izoproterenolem stwierdzono, że dootrzewnowe podanie amigdaliny w dawce 40 mg/kg wywiera ochronny wpływ na przerost mięśnia sercowego, zmniejszając poziomy hydroksyproliny, dialdehydu malonowego oraz aktywności kinazy kreatynowej [95]. Ponadto amigdalina powoduje wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz w efekcie skutecznie hamuje przerost mięśnia sercowego, szlak transdukcji sygnału i proliferację kolagenu w mięśniu sercowym, co świadczy o jej działaniu antyoksydacyjnym i kardioprotekcyjnym [95]. W badaniu *in vivo* na myszach z hiperglikemią indukowaną alloxanem wykazano, że amigdalina może również obniżyć poziom glukozy we krwi [96].

3.10. Ograniczenie neurodegeneracji

Dane literaturowe wskazują, że w szczurzych komórkach guza chromochłonnego PC12 amigdalina w zakresie stężeń od 2,5 mmol/l do 20 mmol/l może stymulować wzrost neurytów i chronić komórki przed neurotoksycznością indukowaną przez oksydopaminę (6-OHDA) poprzez zwiększenie ekspresji kalretikuliny [97]. Ponadto amigdalina

w zakresie stężeń od 0,003 mmol/l do 0,020 mmol/l indukowała aktywację kinazy Akt w komórkach PC12, co wskazuje na jej właściwości neurotroficzne [98]. Wyniki sugerują, że amigdalina może mieć potencjał w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona.

3.11. Rola w układzie płciowym

Amigdalina w dawce 10 mg/ml stymulowała uwalnianie cząsteczek regulujących steroidy (estradiol-17 β) w komórkach ziarnistych jajnika świni [99]. W badaniu *in vitro* na próbkach nasienia pobranych od byków holsztyńskich stwierdzono, że amigdalina w zakresie stężeń od 0,4 mmol/l do 2 mmol/l zmniejsza aktywność hialuronidazy i ruchliwość plemników [100]. W badaniu *in vivo* na myszach z zaburzoną aktywnością spermatogenezy indukowaną octanem ołowiu wykazano, że dootrzewnowe podanie amigdaliny w dawkach od 15 mg/kg do 30 mg/kg zwiększa aktywność ATPazy, dysmutazy ponadtlenkowej i poziom testosteronu w tkankach jąder. Stabilizuje również błonę komórkową poprzez działanie przeciwutleniające, obniża poziom tlenu azotu i mediatorów zapalnych, zwiększa gęstość plemników, ogranicza ich deformację i przywraca prawidłową aktywność spermatogenezy u myszy narażonych na działanie octanu [101].

3.12. Rola w układzie trawiennym

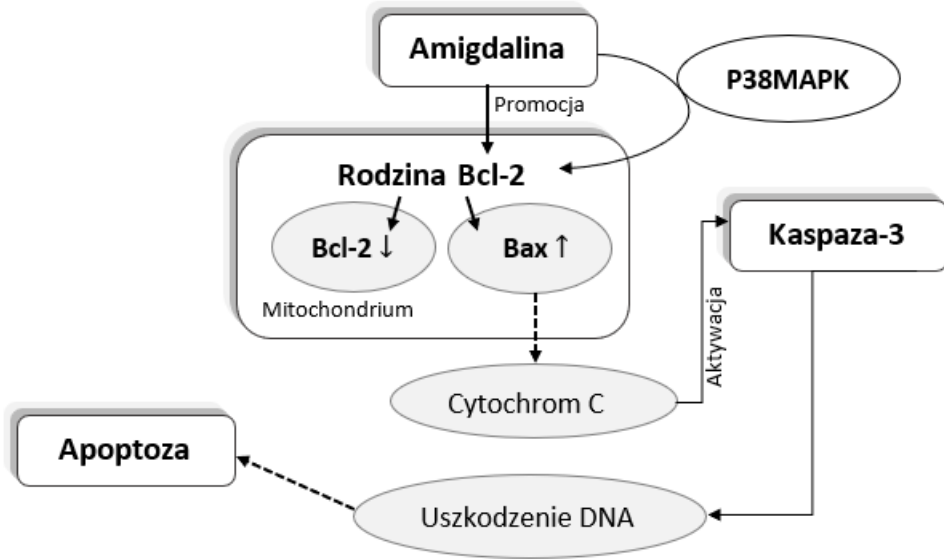
Benzaldehyd powstający w wyniku rozkładu amigdaliny odgrywa istotną rolę w hamowaniu aktywności pepsyny i cyklu trawienia. Związek ten jest niezbędny w leczeniu ostrych i zanikowych chorób żołądka u myszy [102]. W badaniu *in vivo* na szczurach z wrzodami żołądka indukowanymi podawaniem alkoholu stwierdzono, że amigdalina chroni błonę śluzową poprzez wspomaganie gojenia, hamowanie aktywności pepsyny, wytwarzanie tlenu azotu oraz supresję TNF- α [103]. Ponadto w badaniu na myszach z wrzodami żołądka wywołanymi stresem związanym z obniżoną temperaturą zaobserwowano, że amigdalina podawana dootrzewnowo w dawkach 20 mg/kg i 40 mg/kg może łagodzić wrzody żołądka [103]. Amigdalina podnosi również aktywność enzymów trzustkowych oraz zwiększa wydzielanie insuliny, co prowadzi do obniżenia poziomu glukozy we krwi [26].

4. Aktywność przeciwnowotworowa amigdaliny

Przeciwnowotworowe działanie amigdaliny skupia się przede wszystkim na produkcji substancji toksycznej, jaką jest cyjanowodór, który indukuje apoptozę i reguluje cykl komórkowy w celu zmniejszenia aktywności komórek nowotworowych oraz regulacji funkcji immunologicznych.

4.1. Wywoływanie apoptozy komórki nowotworowej

Na apoptozę znaczący wpływ mają aktywności białek z rodziny Bcl-2 oraz proteazy cysteinowe (rys. 4). Apoptozie zapobiega ekspresja przeciwapoptotycznego białka Bcl-2 regulującego proces śmierci komórki. Białko X związane z Bcl-2 (Bax) jest białkiem proapoptotycznym, którego wysoka ekspresja promuje śmierć komórki. Amigdalina aktywuje proapoptotyczną cząsteczkę sygnałową p38 kinazy białkowej, co powoduje aktywację Bax oraz inhibicję Bcl-2. Aktywacja kaspazy-3, zainicjowana przez cytozoolową replikację białka Bax i uwolnienie cytochromu C, jest głównym mechanizmem apoptozy komórek [104, 105]. Polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP) jest enzymem biorącym udział w naprawie DNA, który podczas procesu apoptozy staje się substratem do produkcji kaspazy-3, co inicjuje pękanie nici DNA [106].



Rysunek 4. Indukowanie apoptozy przez amigdalinę
 Źródło: opracowanie własne na podstawie [65].

W komórkach nowotworowych gruczołu krokowego DU145 (opornych na kastrację) oraz LNCaP (wrażliwych na kastrację) amigdalina w zakresie stężeń od 0,1 mg/ml do 10 mg/ml zmniejszała ekspresję białka Bcl-2 oraz zwiększała ekspresję białka Bax. Poprawiała także aktywność enzymu kaspazy-3 [106]. Stężenie amigdaliny wywołujące apoptozę 50% komórek nowotworowych (IC₅₀) w badaniu *in vitro* oznaczono na poziomie 10 mg/ml (po 24 godzinach) [106].

W komórkach potrójnie ujemnego raka piersi Hs578T z nadekspresją receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) amigdalina (w stężeniach w zakresie od 10 mg/ml do 40 mg/ml) wpływała znacząco na obniżenie ekspresji Bcl-2, podwyższenie ekspresji Bax oraz rozszczepienie kaspazy-3 i PARP. Aktywowała również proapoptotyczną cząsteczkę sygnałową p38 kinazy białkowej (p38 MAPK) w komórkach Hs578T, prowadząc do apoptozy komórek nowotworowych [104]. Wartość IC₅₀ po 24-godzinym traktowaniu amigdaliną komórek Hs578T oznaczono na poziomie 60 mg/ml [104].

W liniach komórkowych ludzkiego raka piersi SK-BR-3 z nadekspresją HER2 amigdalina (w zakresie stężeń od 5 mg/ml do 20 mg/ml) indukowała śmierć apoptotyczną poprzez zwiększanie poziomu białka Bax oraz zmniejszanie ekspresji białka Bcl-2 [107]. Stwierdzono, że może także wiązać się z miejscami aktywnymi aminokwasów w białkach Bcl-2 oraz HER2 poprzez wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe. Wartość IC₅₀ po 24-godzinym traktowaniu amigdaliną komórek SK-BR-3 oznaczono na poziomie 10 mg/ml [107].

Obserwowano również, że w liniach komórkowych ludzkiego raka szyjki macicy (HeLa) amigdalina w stężeniach z zakresu od 1,25 mg/ml do 20 mg/ml indukowała apoptozę komórek nowotworowych poprzez zwiększenie ekspresji białek Bax oraz aktywności kaspazy-3, a także zmniejszenie poziomu białek Bcl-2 [108]. Przeżywalność komórek HeLa zmieniała się w zależności od zastosowanego stężenia amigdaliny. Wartość

IC₅₀ po 24-godzinym traktowaniu amigdalina komórek HeLa oznaczono na poziomie 20 mg/ml [108]. W przypadku zdrowych komórek FL traktowanych amigdalina w badanym zakresie stężeń nie zaobserwowano istotnych zmian w liczbie komórek [108].

W badaniu *in vivo* samcom nagich myszy BALB/c z ksenoprzeszczepami komórek nowotworowych HeLa podawano amigdalina (300 mg/kg) w dawkach 0,2 ml przez 14 dni [108]. Zaobserwowano 2-krotne zmniejszenie objętości guza u myszy leczonych amigdalina w porównaniu do myszy, którym podawano sól fizjologiczną. Masy ciała w grupie leczonej amigdalina nie różniły się od grupy kontrolnej [108].

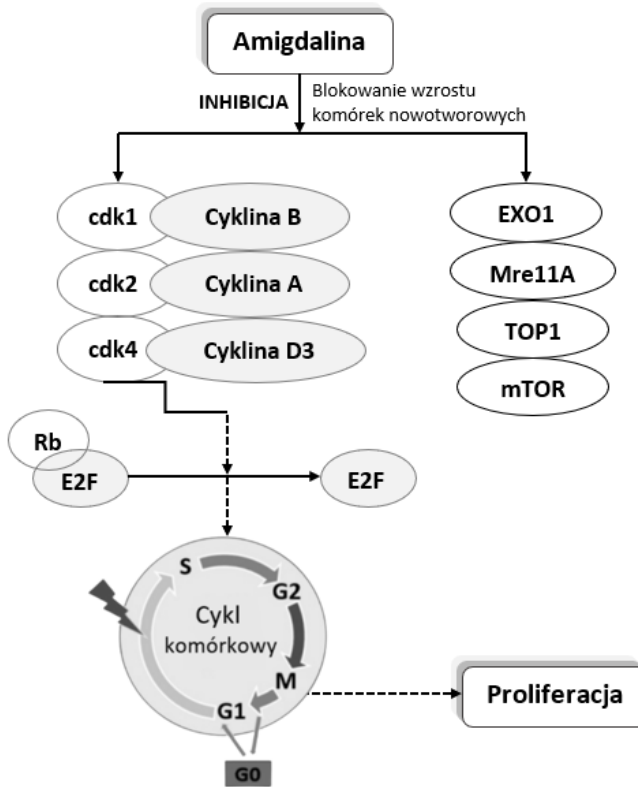
Z kolei w badaniu *in vitro*, w którym komórki ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60 traktowano amigdalina (w zakresie stężeń od 1 mg/ml do 20 mg/ml) w połączeniu z β -glukozydazą, stwierdzono zmniejszony wskaźnik przeżywalności komórek w zależności od zastosowanej dawki oraz zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych [109]. Wartość IC₅₀ po 48-godzinym traktowaniu amigdalina komórek HL-60 w obecności 250 mM β -glukozydazy wyniosła 6,4 mg/ml. Natomiast wartość IC₅₀ po 48-godzinym traktowaniu wolną amigdalina oznaczono na poziomie 11 mg/ml [109].

W badaniu *in vitro* na komórkach raka trzustki PANC-1 oraz komórkach nabłonkowych 293/KDR amigdalina (w zakresie stężeń od 5 mg/ml do 40 mg/ml) po 48 godzinach znacząco zwiększała ekspresję białek Bax, aktywność kaspazy-3 oraz zmniejszała ekspresję białek Bcl-2 w komórkach PANC-1 [110]. Taktowanie amigdalina linii komórkowej 293/KDR nie miało wpływu na ekspresję białek z rodziny Bcl-2 oraz kaspazy-3. Wartość IC₅₀ po 72-godzinym traktowaniu amigdalina linii komórkowej PANC-1 oznaczono na poziomie 35 mg/ml. Amigdalina wykazała stosunkowo niską cytotoksyczność w stosunku do komórek 293/KDR – przeżywalność zdrowych komórek po 72-godzinym traktowaniu amigdalina (w stężeniu 40 mg/ml) wyniosła 80% [110].

4.2. Hamowanie wzrostu komórek nowotworowych

Amigdalina wpływa na przebieg cyklu komórkowego poprzez inhibicję aktywności kinaz cyklicznych CDK_s tworzących kompleksy ze sprzężonymi cyklinami. Wywołana przez amigdalina supresja kinazy cdk2 oraz sprzężonej cykliny A, a także kinazy cdk4 oraz sprzężonej cykliny D3, będących ważnym regulatorem przejścia między fazą G1 a fazą S, indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie przerwy G1/G0, powodując zahamowanie proliferacji i wzrostu komórek [65]. Amigdalina hamuje również aktywność kinaz cdk1 oraz sprzężonych z nimi cyklin B, odpowiadających za regulację progresji z fazy G2 do fazy M, powodując zablokowanie podziału komórki w fazie G2 [65]. E2F jest czynnikiem transkrypcyjnym biorącym udział w regulacji cyklu komórkowego i syntezy DNA, a jego celem są kinazy zależne od cyklin [111]. Białko Rb jest białkiem supresorowym nowotworu zapobiegającym nadmiernemu wzrostowi komórek poprzez hamowanie progresji cyklu komórkowego [111]. Białko Rb wiąże się z domeną aktywacyjną czynnika transkrypcyjnego E2F, utrzymując komórkę w fazie G1, tym samym zapobiegając progresji cyklu komórkowego. W przypadku fosforylacji białek Rb, inicjowanej przez cyklinę D oraz cdk4, po stymulacji czynnika wzrostu następuje aktywacja E2F, który pośredniczy w transaktywacji genów docelowych E2F ułatwiających przejście z fazy G1 do fazy S cyklu [65, 111]. Ponadto amigdalina inaktywuje kinazy mTOR, które pełnią funkcję regulatora proliferacji komórek, a także transkrypcji i translacji, inaktywuje enzymy egzonukleazy 1 (EXO1) odpowiedzialne za naprawę helisy DNA, zmniejsza aktywność dwuniciowej nukleazy naprawczej (MRE11A) odpowiadającej za

naprawę pęknięć dwuniciowych DNA, a także enzymu topoiizomerazy 1 (TOP1) odpowiedzialnego za hydrolizę jednego wiązania – nacięcie jednej nici i usuwanie z cząsteczki DNA superskrętów [65]. Wpływ amigdaliny na blokowanie proliferacji komórek nowotworowych przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Indukowanie apoptozy przez amigdalinę
Źródło: opracowanie własne na podstawie [65].

W przypadku nowotworów prostaty wysoce aktywny jest szlak kinazy białkowej B (AKT) ssaczego celu rapamycyny (mTOR), który odgrywa istotną rolę w rozwoju chorób opornych na kastrację [112]. Amigdalina (w zakresie stężeń od 1 mg/ml do 10 mg/ml) w sposób zależny od stężenia zmniejszała tempo wzrostu oraz osłabiała tworzenie kolonii komórek nowotworowych prostaty PC3 i DU-145 opornych na kastrację oraz komórek LNCaP wrażliwych na kastrację, nie wykazując efektów ubocznych związanych z toksycznością [112]. Zaobserwowano spadek liczby komórek w fazie G2/M i w fazie S oraz wzrost liczby komórek fazy G0/G1 cyklu komórkowego. Dwutygodniowe podawanie amigdaliny obniżało poziom kinaz zależnych od cyklina cdk1, cdk2 i cdk4, co przyczyniało się do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych. Wartości IC_{50} po 24-godzinym traktowaniu amigdalina oznaczono na poziomie 10 mg/ml dla wszystkich badanych rodzajów komórek nowotworowych [112].

W ludzkich komórkach nowotworu okrężnicy SNU-C4 amigdalina (w zakresie stężeń od 0,25 mg/ml do 5 mg/ml) znacząco obniżała poziom mRNA EXO1, MRE11A, TOP1 oraz mTOR, tym samym ograniczając proliferację komórek nowotworowych

SNU-C4 [113]. W najwyższym badanym stężeniu amigdaliny 5 mg/ml zaobserwowano zmniejszenie proliferacji komórek nowotworowych SNU-C4 o 30% w stosunku do komórek nietraktowanych amigdalina [113].

W badaniu *in vitro* na liniach komórkowych raka pęcherza moczowego UMUC3, RT112 i TCCSUP stwierdzono, że amigdalina (w zakresie stężeń od 1,25 mg/ml do 10 mg/ml) w sposób zależny od stężenia zmniejsza wzrost i proliferację komórek we wszystkich 3 liniach oraz znacznie opóźnia progresję cyklu komórkowego, zatrzymując cykl w fazie G0/G1 [114]. Ponadto w badanym zakresie stężeń amigdalina zmniejszała aktywności kinazy cdk2 oraz cykliny A, a także ekspresję kinazy cdk4 w liniach komórkowych RT112 i TCCSUP [114]. W najwyższym badanym stężeniu amigdaliny (10 mg/ml) zaobserwowano zmniejszenie proliferacji wszystkich badanych rodzajów komórek nowotworowych o 25% w stosunku do komórek nietraktowanych amigdalina [114].

W badaniu *in vitro* stwierdzono, że wodno-metanolowy ekstrakt z pestek moreli, a także frakcja zawierająca amigdalinę wykazują działanie przeciwnowotworowe poprzez indukowanie apoptozy, zmniejszanie proliferacji komórek, zwiększanie obrony antyoksydacyjnej oraz zmniejszanie uwalniania czynnika prozapalnego TNF- α [115]. Działanie antyproliferacyjne amigdaliny w komórkach raka wątroby HepG2 zostało potwierdzone w badaniach *in vitro*, a wartości IC₅₀ po 24-godzinym oraz 48-godzinym traktowaniu amigdalina komórek HepG2 wyniosły odpowiednio 25,26 mg/ml i 6,20 mg/ml [115].

W badaniu *in vivo* zaobserwowano, że podawana dożylnie amigdalina w dawce 50 mg/kg poprzez mechanizm zmniejszenia proliferacji komórek nowotworowych znacznie zmniejsza masę (o 56,17%) i objętość (o 57,99%) guza u nagich myszy z ksenoprzeciepem raka jelita grubego [116]. Nie stwierdzono istotnej toksyczności w stosunku do zdrowych narządów [116].

W liniach komórkowych ludzkich nowotworów piersi T47D i MCF-7 amigdalina w stężeniach 4 mmol/l, 8 mmol/l, 16 mmol/l, 32 mmol/l i 65 mmol/l hamowała wzrost komórek nowotworowych w sposób zależny od stężenia i czasu podawania [117]. Traktowanie komórek amigdalina w stężeniu 65 mmol/l przez 24 godziny, 48 godzin i 72 godziny spowodowało spadek przeżycia komórek raka piersi MCF-7 odpowiednio o 23%, 54% i 68% oraz spadek żywotności komórek T47D odpowiednio o 14%, 37% i 55%. Wartości IC₅₀ po 72-godzinym okresie podawania amigdaliny oznaczono na poziomie 39 mM i 45 mM odpowiednio dla komórek MCF-7 i T47D [117].

Komórki gruczolakoraka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231 i komórki fibroblastów płuc MRC-5 traktowano amigdalina (stosując stężenia w przedziale od 2,5 mg/ml do 30 mg/ml) przez 7 dni [118]. Aktywność β -glukozydazy w obu typach komórek nowotworowych traktowanych amigdalina była znacząco wyższa w porównaniu ze zdrowymi komórkami MRC-5 oraz komórkami nowotworowymi nietraktowanymi amigdalina [118]. Stężenie amigdaliny wynoszące 10 mg/ml skutecznie hamowało wzrost obu linii komórkowych nowotworów, nie wywierając istotnego wpływu na zdrowe komórki fibroblastów [118]. Amigdalina w dawkach 10 mg/ml oraz 30 mg/ml zmniejszała proliferację komórek MCF-7 odpowiednio o 94,3% i 99,6%, komórek MDA-MB-231 o 92,4% i 99,7% oraz zdrowych komórek fibroblastów MRC-5 o 20% i 99,8% w porównaniu z komórkami nietraktowanymi amigdalina [118].

W liniach komórkowych płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej SCC/KB amigdalina w zakresie stężeń od 10 μ g/ml do 200 μ g/ml wykazywała działanie cyto-

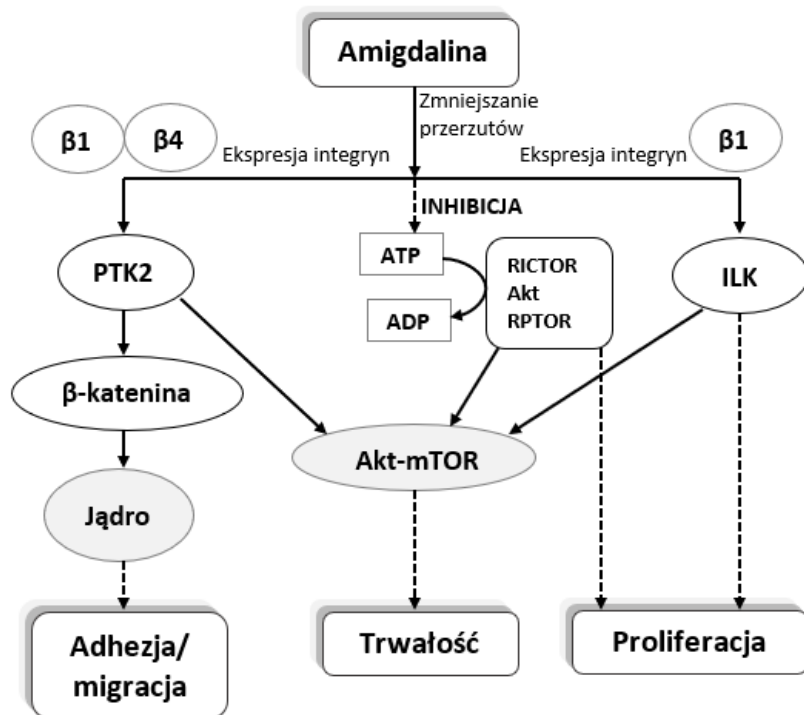
toksyczne i antyproliferacyjne oraz zmniejszała żywotność komórek SCC/KB w sposób zależny od stężenia [119]. Amigdalina stosowana w badaniu została wydzielona w postaci etanolowego ekstraktu z nasion gorzkich migdałów oraz moreli. Ekstrakt z gorzkich migdałów wykazywał maksymalną skuteczność przy stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$, zabijając 78% komórek nowotworowych, podczas gdy ekstrakt z pestek moreli swoje maksimum osiągnął przy stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, zabijając 82% komórek nowotworowych. Wartości IC_{50} w przypadku ekstraktu z migdałów i ekstraktu z pestek moreli wyniosły odpowiednio 32 i 61 $\mu\text{g/ml}$ [119].

W badaniu *in vitro* wykazano, że traktowanie linii komórkowych raka nerkowo-komórkowego (RCC): A498, Caki-1 i KTC-26 amigdalina w stężeniu 10 mg/ml przez 24 godziny i 14 dni powoduje znaczne zmniejszenie wzrostu i proliferacji wszystkich badanych linii komórek RCC [120]. Efekt ten jest skorelowany ze zmniejszeniem liczby komórek RCC w fazie G2/M oraz zwiększoną liczbą komórek w fazie G0/G1 (Caki-1 i A498) lub zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie S (KTC-26). Ponadto amigdalina powodowała znaczny spadek ekspresji kinazy cdk1 i cykliny B, cdk2 i cykliny A oraz cdk4 i cykliny D3. Amigdalina modulowała również markery różnicowania, E- i N-kadherynę, przyczyniając się do zmniejszenia przerzutów. Po 24 godzinach traktowania amigdalina zaobserwowano znaczny spadek poziomu powierzchniowej N-kadheryny w 3 badanych liniach komórkowych. Po 2 tygodniach odnotowano również wyraźnie zwiększoną ekspresję E-kadheryny na powierzchni komórek Caki-1 i KTC-26, natomiast nie stwierdzono istotnego wpływu amigdaliny na E-kadherynę w komórkach A498. W komórkach KTC-26 wzrost poziomu E-kadheryny był związany ze znacznym zmniejszeniem poziomu powierzchniowej N-kadheryny [120]. W badanym stężeniu amigdaliny 10 mg/ml zaobserwowano zmniejszenie proliferacji komórek nowotworowych średnio o 20% w stosunku do komórek nietraktowanych amigdalina we wszystkich 3 liniach komórkowych po 24 godzinach, bez istotnych zmian po 14 dniach [120].

4.3. Ograniczenie przerzutów

Za blisko 90% zgonów w następstwie choroby nowotworowej odpowiada tworzenie się nowotworów przerzutowych, czyli guzów wtórnych, pochodzących od pierwotnego nowotworu złośliwego [121]. Integryny $\beta 1$ i $\beta 4$ mogą indukować aktywację białkowej kinazy tyrozynowej (PTK2) prowadzącej do uwolnienia β -kateniny. β -Katenina może migrować do jądra komórkowego w celu wywołania wzrostu komórek nowotworowych i białek odpowiedzialnych za jego migrację [122]. Obok PTK2 integryna $\beta 1$ może też aktywować kinazy połączone z integryną (ILK), co prowadzi do zainicjowania szlaku sygnałowego Akt-mTOR. Aktywny szlak Akt-mTOR odpowiada za regulację apoptozy, adhezję i proliferację komórek. Amigdalina hamuje ekspresję integryn $\beta 1$ i $\beta 4$, co skutkuje zmniejszeniem stężenia PTK2, ILK oraz β -kateniny, w efekcie czego zahamowany zostaje szlak Akt-mTOR [123]. Ważną funkcję w procesie zachowania trwałości komórek odgrywa również białko RICTOR (niewrażliwy na rapamycynę towarzysz ssaczego celu rapamycyny), który będąc składnikiem kompleksu białkowego, integruje sygnały pochodzące ze składników odżywczych i czynników wzrostu w celu regulacji wzrostu komórek. W interakcje z RICTOR oraz mTOR wchodzi także białko RPTOR, kodujące część szlaku sygnałowego regulującego wzrost komórek i reagujące na poziomy składników odżywczych w organizmie. Kinaza białkowa B (Akt) odgrywa ważną rolę w apoptozie, migracji i proliferacji komórek, gdzie poprzez uleganie fosforylacji daje sygnał do akty-

wacji szlaku Akt-mTOR. Amigdalina hamuje fosforylację Akt i RICTOR, zmniejszając nadaktywność szlaku Akt-mTOR w komórkach nowotworowych i ograniczając proliferację oraz przetrzuty. Z tego względu amigdalina może być stosowana jako substancja ograniczająca namnażanie się komórek nowotworowych [124]. Rola amigdaliny w ograniczaniu przetrzutów nowotworowych została przedstawiona na rysunku 6.



Rysunek 6. Wpływ amigdaliny na szlak sygnałowy Akt-mTOR oraz ekspresję integryny
Źródło: opracowanie własne na podstawie [65].

W badaniu *in vitro* na liniach komórkowych H1299/M i PA/M niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) o wysokim stopniu przetrzutów wykazano, że amigdalina w stężeniach 2,5 mg/ml oraz 5 mg/ml hamuje zdolności proliferacyjne i migracyjne komórek H1299/M oraz PA/M na skutek zmniejszenia ekspresji integryny $\beta 1$ oraz $\beta 4$, a także ILK, PTK2 i β -kateniny oraz wzmocnienia ekspresji E-kadheryny. Zmniejszeniu uległa również szybkość fosforylacji Akt i RICTOR, co hamowało aktywność szlaku sygnałowego Akt-mTOR [125]. Amigdalina w stężeniach 2,5 mg/ml i 5 mg/ml zmniejszała proliferację obu linii komórkowych odpowiednio o 15,6% i 25,1%. Obliczona *in silico* wartość IC_{50} dla obu linii komórkowych wyniosła 12,2 mg/ml. Zatem skuteczne zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych wymaga wyższych stężeń amigdaliny, natomiast niższe stężenia amigdaliny skutecznie ograniczają zdolności inwazyjne i migracyjne komórek nowotworowych [125].

W badaniu *in vitro* na komórkach raka pęcherza moczowego UMUC-3, TCCSUP oraz RT112 traktowanych amigdaliną w stężeniu 10 mg/ml stwierdzono, że stosowanie amigdaliny przez 24 godziny oraz 2 tygodnie wyraźnie zmniejsza adhezję i migrację komórek UMUC-3 (odpowiednio o 25% i 5% po 24 godzinach oraz 45% i 50% po

2 tygodniach) i RT112 (odpowiednio o 80% i 5% po 24 godzinach oraz 35% i 70% po 2 tygodniach) [126]. Adhezja komórek TCCSUP również została zmniejszona (o 80% po 24 godzinach i 65% po 2 tygodniach), natomiast migracja w przypadku tych komórek była podwyższona pod wpływem działania amigdaliny (o 5% po 24 godzinach i 400% po 2 tygodniach). Zaobserwowano zmniejszenie ekspresji integryn, ograniczenie ekspresji ILK oraz PTK2 we wszystkich badanych liniach komórek nowotworowych. Obniżenie poziomu integryny $\beta 1$ spowodowało znaczny spadek zarówno adhezji, jak i migracji w badanych komórkach UMUC-3, a także istotne ograniczenie adhezji komórek TCCSUP [126]. Ograniczenie ekspresji integryny $\beta 4$ powodowało natomiast znaczny spadek migracji komórek RT112. Wywołany amigdalina wzrost migracji komórek TCCSUP wskazuje, że korzystne działanie przeciwnowotworowe amigdaliny może zależeć od rodzaju komórek nowotworowych [126].

5. Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono szeroki zakres działania i zastosowania amigdaliny, nad czym wciąż prowadzone są badania.

Amigdalina obok działania przeciwnowotworowego może wykazywać szereg innych zastosowań, co potwierdzone zostało zarówno na podstawie badań *in vitro*, jak i *in vivo*.

Działanie przeciwnowotworowe amigdaliny można opisać na bazie 3 podstawowych mechanizmów, które bardzo często się ze sobą łączą:

1. Wywoływanie apoptozy komórki poprzez regulację ekspresji białek Bcl-2 i Bax.
2. Hamowanie proliferacji komórek nowotworowych poprzez inhibicję aktywności kinaz zależnych od cyklin oraz enzymów, co wpływa na zablokowanie cyklu komórkowego.
3. Ograniczanie przerzutów poprzez regulację ekspresji integryn, E- i N-kadheryny oraz szlaku sygnałowego Akt-mTOR.

Problemem utrudniającym analizę badań jest brak wykonywania prób kontrolnych na zdrowych komórkach, przez co w wielu przypadkach niemożliwe jest określenie wpływu amigdaliny na cały organizm człowieka. Obecnie dostępne badania pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że ważną rolę w ograniczeniu ogólnoustrojowej toksyczności ma droga podania leku. Pozajelitowe podawanie preparatów zawierających amigdalina w formie roztworów do wstrzyknięć minimalizuje negatywny wpływ na zdrowe tkanki. Brakuje również wiarygodnych danych potwierdzających tezę, że amigdalina ma korzystny wpływ na pacjentów z różnymi typami nowotworów. Jak dotąd opublikowano niewiele badań dotyczących potencjalnych celów działania amigdaliny, dlatego konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia mechanizmów farmakologicznych amigdaliny pod kątem optymalnej dawki, możliwości łącznego stosowania amigdaliny z innymi lekami przeciwnowotworowymi, a także różnych modyfikacji amigdaliny, w celu wzmocnienia jej działania przeciwnowotworowego i zmniejszenia działań niepożądanych w badaniach klinicznych.

Aktywność oraz selektywność dostarczania amigdaliny do komórek nowotworowych można poprawić poprzez kapsułkowanie z wykorzystaniem nanocząsteczek dostarczających leki lub poprzez wprowadzenie enzymatycznych terapii prolekowych. Współcześnie naukowcy opracowują i badają nanonośniki do różnych zastosowań, z których jednym jest „kontrolowany system dostarczania leków”. Rozwinięcie tego tematu może stanowić materiał do kolejnego artykułu przeglądowego.

Literatura

1. Cutler A.J., Conn E.E., *The biosynthesis of cyanogenic glucosides in Linum usitatissimum (linen flax) in vitro*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 212(2), 1981, s. 468-474.
2. Hughes M.A., *The cyanogenic polymorphism in Trifolium repens L. (white clover)*, Heredity, 66, 1991, s. 105-115.
3. Andersen M.D., Busk P.K., Svendsen I., Møller B.L., *Cytochromes P450 from cassava (Manihot esculenta Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin: cloning, functional expression in Pichia pastoris, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes*, Journal of Biological Chemistry, 275(3), 2000, s. 1966-1975.
4. Sanchez-Perez R., Jorgensen K., Olsen C.E., Dicenta F., Moller B.L., *Bitterness in almonds*, Plant Physiology, 146(3), 2008, s. 1040-1052.
5. Gleadow R.M., Møller B.L., *Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity*, Annual Review of Plant Biology, 65, 2014, s. 155-185.
6. Clegg D.O., Conn E.E., Janzen D.H., *Developmental fate of the cyanogenic glycoside linamarin in Costa Rican wild lima bean seeds*, Nature, 278(5702), 1979, s. 343-344.
7. Greenberg D.M., *The vitamin fraud in cancer quackery*, The Western Journal of Medicine, 122(4), 1975, s. 345-348.
8. Shi J., Chen Q., Xu M., Xia Q., Zheng T., Teng J., Li M., Fan L., *Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: a review*, Cancer Medicine, 8(6), 2019, s. 3004-3011.
9. Lee J., Zhang G., Wood E., Rogel Castillo C., Mitchell A.E., *Quantification of amygdalin in nonbitter, semibitter, and bitter almonds (Prunus dulcis) by UHPLC-(ESI)QqQ MS/MS*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(32), 2013, s. 7754-7759.
10. Bolarinwa I.F., Orfila C., Morgan M.R.A., *Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK*, Food Chemistry, 152(1), 2014, s. 133-139.
11. Yildirim F.A., Askin M.A., *Variability of amygdalin content in seeds of sweet and bitter apricot cultivars in Turkey*, African Journal of Biotechnology, 9(39), 2010, s. 6522-6524.
12. Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P., *Lehrbuch der lebensmittelchemie*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 2008, s. 784-786.
13. Curt G.A., *Unsound methods of cancer treatment*, Principles & Practice of Oncology Updates, 4(12), 1990, s. 1-10.
14. Moss R.W., *Patient perspectives: Tijuana cancer clinics in the post-NAFTA era*, Integrative Cancer Therapies, 4(1), 2005, s. 65-86.
15. Blaheta R.A., Nelson K., Haferkamp A., Juengel E., *Amygdalin, quackery or cure?* Phytomedicine, 23(4), 2016, s. 367-376.
16. Nowak A., Zielińska A., *Aktywność przeciwnowotworowa amigdaliny*, Postępy Fitoterapii, 17(4), 2016, s. 282-292.
17. Qadir M., Fatima K., *Review on pharmacological activity of amygdalin*, Archives in Cancer Research, 5(4), 2017, s. 10-12.
18. Song Z., Xu X., *Advanced research on anti-tumor effects of Amygdalin*, Journal of Cancer Research and Therapeutics, 10(5), 2014, s. 3-7.
19. Lv J.Z., Deng J.G., *Research progress in pharmacological effects of amygdalin*, Drugs & Clinic, 27(5), 2012, s. 530-535.
20. Armstrong H.E., Armstrong E.F., Horton E., *Studies on enzyme action. XII: The enzymes of emulsin*, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 80(540), 1908, s. 321-331.
21. Fischer E., *Ueber die verbindungen der zucker mit den alkoholen und ketonen*, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 28(1), 1895, s. 1145-1167.

22. Pigman W.W., *Specificity, classification, and mechanism of action of the glycosidases*, *Advances in Enzymology*, 4, 1944, s. 41-74.
23. Jermyn M.A., *Glycosidases*, *Pure and Applied Chemistry*, 11, 1961, s. 92-116.
24. Haisman D.R., Knight D.J., *The enzymic hydrolysis of amygdalin*, *The Biochemical Journal*, 103(2), 1967, s. 528-534.
25. Strugala G.J., Rauws A.G., Elbers R., *Intestinal first pass metabolism of amygdalin in the rat in vitro*, *Biochemical Pharmacology*, 35(13), 1986, s. 2123-2128.
26. Shim S.M., Kwon H., *Metabolites of amygdalin under simulated human digestive fluids*, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(8), 2010, s. 770-779.
27. Freese A., Brady R.O., Gal A.E., *A β -glucosidase in feline kidney that hydrolyzes amygdalin (Laetrile)*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(2), 1980, s. 363-368.
28. Chang J., Zhang Y., *Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger**, *Process Biochemistry*, 47(2), 2012, s. 195-200.
29. Rietjens I.M.C.M., Martena M.J., Boersma M.G., Spiegelenberg W., Alink G.M., *Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytochemicals*, *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(2), 2005, s. 131-158.
30. EFSA, *Acute health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in raw Apricot kernels and products derived from raw Apricot kernels*, *EFSA Journal*, 14(4), 2016, s. 1-47.
31. Jaszczak E., Polkowska Z., Narkowicz S., Namieśnik J., *Cyanides in the environment – analysis – problems and challenges*, *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(19), 2017, s. 15929-15948.
32. Bilska-Wilkosz A., Dudek M., Knutelska J., Wlodek L., *The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide*, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 72(1), 2015, s. 49-52.
33. Xu N.X., *The research progress of amygdalin*, *Inner Mongolia Chinese Medicine*, 31(1), 2012, s. 66-67.
34. Xing G.X., Li N., Yang J.Y., Cui L.J., Wang T., *Research progress of natural amygdalin*, *China Traditional Chinese Medicine*, 25(1), 2003, s. 1007-1009.
35. Wood J.L., Cooley S.L., *Detoxication of cyanide by cystine*, *The Journal of Biological Chemistry*, 218(1), 1956, s. 449-457.
36. Bhandari R.K., Oda R.P., Petrikovics I., Thompson D.E., Brenner M., Mahon S.B., Bebart V.S., Rockwood G.A., Logue B.A., *Cyanide toxicokinetics: the behavior of cyanide, thiocyanate and 2-amino-2-thiazoline-4-carboxylic acid in multiple animal models*, *Journal of Analytical Toxicology*, 38(4), 2014, s. 218-225.
37. Mitchell B.L., Bhandari R.K., Bebart V.S., Rockwood G.A., Boss G.R., Logue B.A., *Toxicokinetic profiles of alpha-ketoglutarate cyanohydrin, a cyanide detoxification product, following exposure to potassium cyanide*, *Toxicology Letters*, 222(1), 2013, s. 83-89.
38. Wróbel M., Jurkowska H., Śliwa L., Srebro Z., *Sulfurtransferases and cyanide detoxification in mouse liver, kidney, and brain*, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 14(6), 2004, s. 331-337.
39. Jarabak R., Westley J., *3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase: rapid equilibrium-ordered mechanism with cyanide as the acceptor substrate*, *Biochemistry*, 19(5), 1980, s. 900-904.
40. Baskin S.I., Porter D.W., Rockwood G.A., Romano J.A. Jr., Patel H.C., Kiser R.C., Cook C.M., Ternay A.L. Jr., *In vitro and in vivo comparison of sulfur donors as cyanide therapeutic compounds*, *Journal of Applied Toxicology*, 19(3), 1999, s. 173-183.
41. Choi S.P., Song Y.K., Kim K.J., Lim H.H., *Amygdalin extract from armeniaca semen induces apoptosis through bax-dependent caspase-3 activation in human cervical cancer cell line ME-180*, *The Journal of Korean Medicine*, 26(4), 2005, s. 130-134.
42. Bromley J., Hughes B.G.M., Leong D.C.S., Buckley N.A., *Life-threatening interaction between complementary medicines: Cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C*, *Annals of Pharmacotherapy*, 39(9), 2005, s. 1566-1569.

43. London-Shafir I., Shafir S., Eisikowitch D., *Amygdalin in almond nectar and pollen – facts and possible roles*, Plant Systematics and Evolution, 238(4), 2003, s. 87-95.
44. Gewitz H.S., Pistorius E.K., Voss H., Vennesland B., *Cyanide formation in preparations from *Chlorella vulgaris* Beijerinck: Effect of sonication and amygdalin addition*, Planta, 131(2), 1976, s. 145-148.
45. Moertel C.G., Ames M.M., Kovach J.S., Moyer T.P., Rubin J.R., Tinker J.H., *A pharmacologic and toxicological study of amygdalin*, Journal of the American Medical Association, 245(6), 1981, s. 591-594.
46. Li X.M., Lu W.Q., Qin Z.L., Jin B.Q., Wu F.Y., *Preliminary study on pharmacokinetics and toxicology of amygdalin*, New Drugs Clinical Medicine, 5(3), 1986, s. 141.
47. Khandekar J.D., Edelman H., *Studies of amygdalin (laetrile) toxicity in rodents*, Journal of the American Medical Association, 242(2), 1979, s. 169-171.
48. Vickers N.J., *Animal communication: When I'm calling you, will you answer too?* Current Biology, 27(14), 2017, s. 713-715.
49. Beier R.C., Nigg H.N., *Toxicology of naturally occurring chemicals in food*, [w:] Hui Y.H. (red.), *Foodborne disease handbook*, CRC Press, 3, 2019, s. 37-186.
50. Sahin S., *Cyanide poisoning in a children caused by apricot seeds*, Journal of Health & Medical Informatics, 2(1), 2011, s. 1-2.
51. Chan T.Y.K., *A probable case of amygdalin-induced peripheral neuropathy in a vegetarian with vitamin B12 deficiency*, Therapeutic Drug Monitoring, 28(1), 2016, s. 140-141.
52. Litovitz T.L., Larkin R.F., Myers R.A.M., *Cyanide poisoning treated with hyperbaric oxygen*, American Journal of Emergency Medicine, 1, 1983, s. 94-101.
53. Kapoor S., *Safety of studies analysing clinical benefit of amygdalin*, Immunopharmacology and Immunotoxicology, 36(1), 2014, s. 87.
54. Zhou C., Qian L., Ma H., Yu X., Zhang Y., Qu W., Zhang X., Xia W., *Enhancement of amygdalin activated with β -D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis*, Carbohydrate Polymers, 90(1), 2012, s. 516-523.
55. Jaswal V., Palanivelu J., Chidambaram R., *Effects of the gut microbiota on amygdalin and its use as an anti-cancer therapy: Substantial review on the key components involved in altering dose efficacy and toxicity*, Biochemistry and Biophysics Reports, 14, 2018, s. 125-132.
56. Basu T.K., *High-dose ascorbic acid decreases detoxification of cyanide derived from amygdalin (laetrile): studies in guinea pigs*, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 61(11), 1983, s. 1426-1430.
57. Calabrese E.J., *Conjoint use of laetrile and megadoses of ascorbic acid in cancer treatment: possible side effects*, Medical Hypotheses, 5(9), 1979, s. 995-997.
58. Li X., Shi F., Gu P., Liu L., He H., Ding L., *A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of amygdalin and paeoniflorin in human plasma and its application*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 92, 2014, s. 160-164.
59. Li X., Shi F., Jian L., Ding L., *An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of amygdalin and paeoniflorin in human urine and application to urinary excretion study*, Acta Pharmaceutica Sinica, 50(10), 2015, s. 1330-1335.
60. Mani J., Rutz J., Maxeiner S., Juengel E., Bon D., Roos F., Chun F.K., Blaheta R.A., *Cyanide and lactate levels in patients during chronic oral amygdalin intake followed by intravenous amygdalin administration*, Complementary Therapies in Medicine, 43, 2019, s. 295-299.
61. Guo J., Wu W., Sheng M., Yang S., Tan J., *Amygdalin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease*, Molecular Medicine Reports, 7(5), 2013, s. 1453-1457.
62. Guo J.Q., Wang L.J., Ye Y.F., Tan J.M., Wu W.Z., Yang S.L., *The effect of amygdalin on the graft kidney in rats*, Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 9, 2008, s. 22-24.

63. Luo H., Zhao F., Zhang F., Liu N., *Influence of amygdalin on PDG, IGF and PDGFR expression in HSC-T6 cells*, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 2018, s. 3693-3698.
64. Dogru H.Y., Isguder C.K., Arici A., Ozsoy A.Z., Delibas I.B., Cakmak B., *Effect of amygdalin on the treatment and recurrence of endometriosis in an experimental rat study*, *Periodicum Biologorum*, 3(119), 2017, s. 173-180.
65. He X.Y., Wu L.J., Wang W.X., Xie P.J., Chen Y.H., Wang F., *Amygdalin – a pharmacological and toxicological review*, *Journal of Ethnopharmacology*, 254, 2020, s. 1-11.
66. Salvadori M., Rosso G., Bertoni E., *Update on ischemia reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment*, *World Journal of Transplantation*, 5(2), 2015, s. 52-67.
67. Jiagang D., Li Ch., Wang H., Hao E., Du Zh., Bao Ch., Lv J., Wang Y., *Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(3), 2011, s. 523-529.
68. Dong Z., Sun Y., Wei G., Li S., Zhao Z., *Ergosterol ameliorates diabetic nephropathy by attenuating mesangial cell proliferation and extracellular matrix deposition via the TGF- β 1/smad2 signaling pathway*, *Nutrients*, 11(2), 2019, s. 1-18.
69. Chen L., Li L., Chen J., Li L., Zheng Z., Ren J., Qiu Y., *Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- α ligand, attenuates liver fibrosis targeting hepatic stellate cells*, *Oncotarget*, 6(40), 2015, s. 42530-42540.
70. Inagaki Y., Okazaki I., *Aprofitaments emergents sobre el factor transformador beta del senyal Smad en la fibrogènesi hepatica*, *Gut*, 56, 2007, s. 284-292.
71. Luo H., Li L., Tang J., Zhang F., Zhao F., Sun D., Wang X., *Amygdalin inhibits HSC-T6 cell proliferation and fibrosis through the regulation of TGF- β /CTGF*, *Molecular & Cellular Toxicology*, 12(3), 2016, s. 265-271.
72. Hong C.F., Lou J.P., Zhou H.S., He L.Y., Zhu L.Q., *The study of effects of semen persicae extract on silicotic fibrosis in rats*, *Journal of Laboratory Medicine*, 4, 2000, s. 218-219.
73. Du H.K., Song F.C., Zhou X., Li H., Zhang J.P., *Effect of amygdalin on type I and III collagen expression in rats with pulmonary fibrosis induced by bleomycin*, *Journal of Chinese PLA Postgraduate Medical School*, 30(5), 2009, s. 712-717.
74. Zhang X.Q., Hu J.G., Zhou Y.Z., Cui L.H., Li C.X., Cui N.Q., Zhang S.K., *Amygdalin improves microcirculatory disturbance and attenuates pancreatic fibrosis by regulating the expression of endothelin-1 and calcitonin gene-related peptide in rats*, *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(5), 2018, s. 437-443.
75. Jiang J., Yan L., Shi Z., Wang L., Shan L., *Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of Citrus changshan-huyou) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF- κ B and MAPKs*, *Phytomedicine*, 64, 2019, s. 1-9.
76. Boshtam M., Asgary S., Kouhpayeh S., Shariati L., Khanahmad H., *Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review*, *Inflammation*, 40(1), 2016, s. 340-349.
77. Yang H.Y., Chang H.K., Lee J.W., Kim Y.S., Kim H., Lee M.H., Shin M.S., Ham D.H., Park H.K., Lee H., Kim C.J., *Amygdalin suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells*, *Neurological Research*, 29(1), 2007, s. 59-64.
78. Zhong X.Q., Li L., Lu C.J., Lu Y., Wei J.A., Han L., *Anti-inflammation effect of amygdalin on macrophage 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide*, *Traditional Chinese Drug Research Clinical Pharmacology*, 29(3), 2018, s. 257-263.
79. Luo D.M., Shan Z.G., Ge J.L., Liu Q., Luo L., *Effects of amygdalin on TNF- α and sICAM-1 of rats with type II collagen-induced arthritis*, *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 27(7), 2015, s. 75-77.

80. Watkins L.R., Maier S.F., *Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(14), 1999, s. 7710-7713.
81. Hwang H.J., Lee H.J., Kim C.J., Shim I., Hahm D.Y., *Inhibitory effect of amygdalin on lipopolysaccharide-inducible TNF-alpha and IL-1beta mRNA expression and carrageenan-induced rat arthritis*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(10), 2008, s. 1641-1647.
82. Zhu Y.P., Su Z.W., *Analgesic effect and no physical dependence of amygdalin*, Zhongguo Zhongyao Zazhi, 19(2), 1994, s. 105-128.
83. Taheri Y., Jokovic N., Vitorovic J., Grundmann O., Maroyi A., Calina D., *The burden of the serious and difficult-to-treat infections and a new antibiotic available: cefiderocol*, Frontiers in Pharmacology, 11, 2021 s. 1-18.
84. Amiran F., Shafaghat A., Shafaghatlonbar M., *Omega-6 content, antioxidant and antimicrobial activities of hexanic extract from Prunus armeniaca L. Kernel from north-west Iran*, National Academy Science Letters, 38(2), 2015, s. 107-111.
85. Nafis A., Kasrati A., Jamali C.A., Custódio L., Vitalini S., Iriti M., Hassani L., *A Comparative study of the in vitro antimicrobial and synergistic effect of essential oils from Laurus nobilis L. and Prunus armeniaca L. from Morocco with antimicrobial drugs: new approach for health promoting products*, Antibiotics, 9(4), 2020, s. 140.
86. Jaya S., Siddheswaran P., Kumar K.S., Karthiyayini T., *Anti-tubercular activity of fruits of Prunus armeniaca (L.)*, International Journal of Pharma and Bio Sciences, 1, 2010, s. 1-5.
87. Mujtaba A., Masud T., Ahmad A., Ahmed W., Jabbar S., Levin R.E., *Antibacterial activity by chlorogenic acid isolated through resin from apricot (Prunus Armeniaca L.)*, Pakistan Journal of Agricultural Research, 30(2), 2017, s. 144-148.
88. Shaheen N., Qureshi N.A., Ashraf A., Iqbal A., Fatima H., *In vitro anti-leishmanial activity of Prunus armeniaca fractions on Leishmania tropica and molecular docking studies*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 213, 2020, s. 1-38.
89. Kitic D., Miladinovic B., Randjelovic M., Szopa A., Sharifi-Rad J., Calina D., Seidel V., *Anticancer potential and other pharmacological properties of Prunus armeniaca L.: an updated overview*, Plants (Basel), 11(14), 2022, s. 1-22.
90. Si Z., Zhang B., *Amygdalin attenuates airway epithelium apoptosis, inflammation, and epithelial-mesenchymal transition through restraining the TLR4/NF- κ B signaling pathway on LPS-treated BEAS-2B bronchial epithelial cells*, International Archives of Allergy and Immunology, 182(1), 2021, s. 997-1007.
91. Deng J.G., Li C.Y., Wang H.L., Hao E.W., Du Z.C., Bao C.H., Lv J.Z., Wang Y., *Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 411(3), 2011, s. 523-529.
92. Zhao F., Yang Z., *Amygdalin attenuates atherosclerosis progress through inhibiting of toll-like receptors expression and activity*, Journal of Animal Veterinary Advances, 11, 2012, s. 1613-1621.
93. Moslehi A., Farahabadi M., Chavoshzadeh S.A., Barati A., Ababzadeh S., Mohammadbeigi A., *The effect of amygdalin on endoplasmic reticulum (ER) stress induced hepatic steatosis in mice*, The Malaysian Journal of Medical Sciences, 25(1), 2018, s. 16-23.
94. Hussein L., Abdel-Rahim E.A., Afify A.E.-M.M., El-Arab A.E., Labib E., *Effectiveness of apricots (Prunus armeniaca), pomegranate (Punica granatum) juice and lactic acid fermented sobya on plasma levels of lipid profile parameters and total homocysteine among Egyptian adults*, Food Science & Nutrition, 22(5), 2014, s. 2225.
95. Chen Y., *Effect of amygdalin on the action of myocardial hypertrophy induced by isoproterenol in rats*, University of Yanbian, Yanji 2014, s. 1-10.

96. Li Y.L., *Selecting the hypolipidemic parts of Armeniacaee semen and studying on its quality standard*, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 2013, s. 1-12.
97. Cheng Y., Yang C., Zhao J., Tseb H.F., Rong J.H., *Proteomic identification of calcium-binding chaperone calreticulin as a potential mediator for the neuroprotective and neurotogenic activities of fruit-derived glycoside amygdalin*, Journal of Nutritional Biochemistry, 26(2), 2015, s. 146-154.
98. Yang C., Zhao J., Cheng Y., Li X.C., Rong J.H., *Bioactivity-guided fractionation identifies amygdalin as a potent neurotrophic agent from herbal medicine Semen Persicae extract*, BioMed Research International, 1, 2014, s. 1-10.
99. Halenár M., Medvedová M., Maruniaková N., Kolesárová A., *Assessment of a potential preventive ability of amygdalin in mycotoxin-induced ovarian toxicity*, Journal of Environmental Science and Health, Part B, 50(6), 2015, s. 411-416.
100. Tanyildizi S., Bozkurt T., *In vitro effects of linamarin, amygdalin and gossypol acetic acid on hyaluronidase activity, sperm motility and morphological abnormality in bull sperm*, Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 28, 2004, s. 819-822.
101. Fan H.Y., Li X.L., Zhang X.J., Yang M.H., Lin Y.B., Wang Y.C., Ren K., *Effect of amygdalin on the spermatogenesis disturbance induced by lead acetate in male mice*, Journal of Toxicology, 30(5), 2016, s. 353-357.
102. Nabavizadeh F., Alizadeh A.M., Sadroslami Z., Adeli S., *Gastroprotective effects of amygdalin on experimental gastric ulcer: Role of NO and TNF- α* , Journal of Medicinal Plants Research, 5(14), 2011, s. 3122-3127.
103. Cai Y., Li Y.M., Zhong L., *Effect of amygdalin on gastric ulcer in experimental models*, Journal of China Pharmaceutical University, 3(1), 2003, s. 60-62.
104. Lee H.M., Moon A., *Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells*, Biomolecules & Therapeutics, 24(1), 2016, s. 62-66.
105. Zhang Q., Liu J., Zhang M., Wei S., Li R., Gao Y., Peng W., Wu C., *Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular mechanism for herbal medicine and its active components to treat rheumatoid arthritis*, Biomolecules, 9(12), 2019, s. 795.
106. Chang H.K., Shin M.S., Yang H.Y., Lee J.W., Kim Y.S., Lee M.H., Kim J., Kim K.H., Kim C.J., *Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells*, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29(8), 2006, s. 1597-1602.
107. Moradipoodeh B., Jamalán M., Zeinali M., Fereidoonnehzad M., Mohammadzadeh G., *In vitro and in silico anticancer activity of amygdalin on the SK-BR-3 human breast cancer cell line*, Molecular Biology Reports, 46(6), 2019, s. 6361-6370.
108. Chen Y., Ma J., Wang F., Hu J., Cui A., Wei C.G., Yang Q., Li F., *Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells*, Immunopharmacology and Immunotoxicology, 35(1), 2013, s. 43-51.
109. Hee-Young K., Seon-Pyo H., Dong-Hoon H., Jeong Hee K., *Apoptosis induction of Persicae Semen extract in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells*, Archives of Pharmacal Research, 26(2), 2003, s. 157-161.
110. Aamazadeh F., Ostadrahimi A., Rahbar Saadat Y., Barar J., *Bitter apricot ethanolic extract induces apoptosis through increasing expression of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 in PANC-1 pancreatic cancer cells*, Molecular Biology Reports, 47(3), 2020, s. 1895-1904.
111. Vietri M., Bianchi M., Ludlow J.W., Mittnacht S., Villa-Moruzzi E., *Direct interaction between the catalytic subunit of protein phosphatase 1 and pRb*, Cancer Cell International, 2006, 6(1), s. 1-9.
112. Makarević J., Tsaur I., Juengel E., Borgmann H., Nelson K., Thomas C., Bartsch G., Haferkamp A., Blaheta R.A., *Amygdalin delays cell cycle progression and blocks growth of prostate cancer cells in vitro*, Life Sciences, 147, 2016, s. 137-142.

113. Park J.H., Yoon S.H., Han L.S., Zheng L.T., Jung K.H., Uhm Y.K., Lee J.H., Jeong J.S., Joo W.S., Yim S.V., Chung J.H., Hong S.P., *Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells*, World Journal of Gastroenterology, 11(33), 2005, s. 5156-5161.
114. Makarević J., Rutz J., Juengel E., Kaulfuss S., Reiter M., Tsauro I., Bartsch G., Haferkamp A., Blaheta R.A., *Amygdalin blocks bladder cancer cell growth in vitro by diminishing cyclin A and cdk2*, PLoS One, 9(8), 2014, s. 1-9.
115. Chen Y., Al-Ghamdi A.A., Elshikh M.S., Shah M.H., Al-Dosary M.A., Abbasi A.M., *Phytochemical profiling, antioxidant and HepG2 cancer cells' antiproliferation potential in the kernels of apricot cultivars*, Saudi Journal of Biological Sciences, 27, 2020, s. 163-172.
116. Lian Y.J., Xu T.W., Zheng Y., Ke M.L., Li Z., Huang T., Chen D.D., *Therapeutic effect of anti-CEA M cAb- β -glucosidase conjugate/amygdalin system on colorectal cancer xenografts in nude mice*, Central China Medical Journal, 29(1), 2005, s. 49-50.
117. Abboud M.M., Al Awaida W., Alkhateeb H.H., Abu-Ayyad A.N., *Antitumor action of amygdalin on human breast cancer cells by selective sensitization to oxidative stress*, Nutrition and Cancer, 1, 2018, s. 1-8.
118. Moon J.Y., Kim S.W., Yun G.M., Lee H.S., Kim Y.D., Jeong G.J., Ullah I., Rho G.J., Jeon B.G., *Inhibition of cell growth and down-regulation of telomerase activity by amygdalin in human cancer cell lines*, Animal Cells and Systems, 19(5), 2015, s. 295-304.
119. Sireesha D., Reddy B.S., Reginald B.A., Samatha M., Kamal F., *Effect of amygdalin on oral cancer cell line: an in vitro study*, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 23(1), 2019, s. 104-107.
120. Juengel E., Thomas A., Rutz J., Makarevic J., Tsauro I., Nelson K., Haferkamp A., Blaheta R.A., *Amygdalin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells in vitro*, International Journal of Molecular Medicine, 37(2), 2016, s. 526-532.
121. Cai Y., Wang J.Y., Liu H., *Clinical observation of whole brain radiotherapy concomitant with targeted therapy for brain metastasis in non-small cell lung cancer patients with chemotherapy failure*, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 14(10), 2013, s. 5699-5703.
122. Xia H., Seeman J., Hong J., Hergert P., Bodem V., Jessurun J., Smith K., Nho R., Kahm J., Gaillard P., Henke C., *Low alpha(2)beta(1) integrin function enhances the proliferation of fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis by activation of the beta-catenin pathway*, The American Journal of Pathology, 181(1), 2012, s. 222-233.
123. Watabe H., Furuhashi T., Tani-Ishii N., Mikuni-Takagaki Y., *Mechanotransduction activates $\alpha\beta_1$ integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts*, Experimental Cell Research, 317(18), 2011, s. 2642-2649.
124. Milazzo S., Ernst E., Lejeune S., Boehm K., Horneber M., *Laetrile treatment for cancer*, The Cochrane Database of Systematic Reviews, 1(11), 2011, s. 1-13.
125. Qian L., Xie B, Wang Y., Qian J., *Amygdalin-mediated inhibition of non-small cell lung cancer cell invasion in vitro*, International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 8(5), 2015, s. 5363-5370.
126. Makarević J., Rutz J., Juengel E., Kaulfuss S., Tsauro I., Nelson K., Pfitzenmaier J., Haferkamp A., Blaheta R.A., *Amygdalin influences bladder cancer cell adhesion and invasion in vitro*, PLoS One, 9(10), 2014, s. 1-11.

Aktywność biologiczna amigdaliny

Streszczenie

Amigdalina jest glikozydem cyjanogennym naturalnie występującym w dużych stężeniach w nasionach gorzkich migdałów oraz w innych pestkach owoców z rodziny roślin różowatych (Rosaceae), na przykład gorzkich moreli, różnych odmian sliwek, brzoskwiń, wiśni czy jabłek. Związek ten wykazuje szeroki zakres działań farmakologicznych, takich jak działanie immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwbólowe i przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnatłuszczowe, przeciwniażdżycowe i kardioprotekcyjne

oraz wspomagające prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego, pokarmowego i nerwowego. Ostatnimi czasy coraz większą uwagę zwraca się na jej działanie przeciwnowotworowe, które jest przedmiotem wielu badań przedklinicznych. Badania potwierdzają, że amygdalina na skutek enzymatycznej hydrolizy z uwolnieniem cyjanowodoru wykazuje skuteczny efekt cytotoksyczny na wiele rodzajów linii komórek nowotworowych. Cyjanowodor wiąże się z oksydazą cytochromu C, ograniczając oddychanie komórkowe poprzez inhibicję prawidłowego funkcjonowania enzymu, co w efekcie prowadzi do apoptozy komórki nowotworowej. Potencjalne toksyczne działanie na zdrowe komórki można zminimalizować poprzez parenteralne dostarczanie amygdaliny lub zastosowanie nowoczesnych celowanych terapii przeciwnowotworowych. Publikacja zawiera przegląd aktualnych doniesień naukowych na temat aktywności biologicznej amygdaliny, analizy działania, mechanizmów przeciwnowotworowych skupiających się na indukowaniu apoptozy, ograniczaniu proliferacji komórek i zmniejszaniu przerzutów nowotworowych. Aktualne badania rzucają nowe światło na możliwość wykorzystania amygdaliny w skutecznych, personalizowanych terapiach przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe: amygdalina, aktywność farmakologiczna, glikozydy cyjanogenne, mechanizmy działania, terapia przeciwnowotworowa

Biological activity of amygdalin

Abstract

Amygdalin is a cyanogenic glycoside, naturally occurring in high concentrations in bitter almond seeds and in other fruit seeds from the Rosaceae family, such as bitter apricots, various varieties of plums, peaches, cherries and apples. This compound has a wide range of pharmacological activities, such as immunomodulatory, antifibrotic, analgesic and anti-inflammatory, antimicrobial, anti-asthmatic, anti-atherosclerotic and cardio-protective effects, as well as supporting the proper functioning of the reproductive, digestive and nervous systems. Recently, more and more attention has been paid to its anticancer effect, which is the subject of many preclinical studies. Studies confirm that amygdalin, as a result of enzymatic hydrolysis with the release of hydrogen cyanide, has an effective cytotoxic effect on many types of cancer cell lines. Hydrogen cyanide binds to cytochrome C oxidase, limiting cellular respiration by inhibiting the proper functioning of the enzyme, which in turn leads to apoptosis of the cancer cell. Potential toxic effects on healthy cells can be minimized by parenteral delivery of amygdalin or the use of modern targeted anticancer therapies. The publication contains a review of current scientific reports on the biological activity of amygdalin, analysis of its action, anti-cancer mechanisms, focusing on inducing apoptosis, limiting cell proliferation and reducing cancer metastases. Current research sheds new light on the possibility of using amygdalin in effective, personalized anti-cancer therapies.

Keywords: amygdalin, pharmacological activity, cyanogenic glycosides, mechanisms of action, anticancer therapy

Wybrane składniki pochodzenia roślinnego w terapii i pielęgnacji skóry z zaburzeniami pigmentacyjnymi

1. Wprowadzenie

Barwniki naturalnie występujące w ludzkiej skórze warunkują kluczowe cechy fenotypowe danej jednostki w postaci koloru skóry czy włosów, jednak ich zasadniczą funkcją jest umiejętność pochłaniania i rozpraszania promieniowania ultrafioletowego (UV, ang. *ultraviolet*), co przekłada się na ochronę DNA. Komórkami odpowiedzialnymi za syntezę barwników są melanocyty, fizjologicznie zlokalizowane w warstwie podstawnej naskórka, zaś produktami złożonego procesu melanogenezy jest eumelanina (barwnik czarnobrazowy) bądź feomelanina (barwnik czerwonożółty). Kolor włosów i skóry uzależniony jest od wzajemnych proporcji obu barwników [1, 2]. Każdy melanocyt przekazuje, poprzez wypustki dendrytyczne, barwnik do około 30-40 otaczających go keratynocytów, tworząc tzw. jednostkę melanocytarną [2].

Niewątpliwie barwniki ludzkiej skóry pełnią istotną funkcję ochronną przed promieniowaniem UV. Trzeba jednak podkreślić, iż jednym z kluczowych problemów współczesnej dermatologii, medycyny estetycznej, a także kosmetologii są zaburzenia pigmentacji skóry zaliczane do defektów istotnie obniżających jakość życia pacjentów. Należą do nich zarówno hiperpigmentacje, jak i plamy cechujące się deficytem melaniny – tak charakterystyczne dla bielactwa nabytego (*vitiligo*).

Zaburzenia pigmentacyjne mogą przybierać różną postać, a także występować w rozmaitych lokalizacjach. Mogą mieć charakter wrodzony lub nabyty. Wszystkie nieprawidłowości we wzorcu barwnikowym skóry powinny zostać poddane diagnostyce. Znamienita większość klasyfikowana jest jako defekt estetyczny, jednak niektóre mogą być oznaką poważniejszej choroby, czego nie należy lekceważyć. W przypadku tych pierwszych niezastąpione wydają się ekstrakty pochodzenia roślinnego, które mogą zarówno ograniczyć proces melanogenezy, jak i wpłynąć na transport barwnika, a także ułatwić złuszczenie naskórka zawierającego nadmierne depozyty melaniny. Ponadto substancje aktywne uzyskiwane z roślin mogą ograniczyć dostęp promieniowania UV do komórek skóry oraz indukować repigmentację skóry, wspomagając podstawowe metody terapeutyczne. Wiele ekstraktów botanicznych wykazuje niezwyklej potencjał pielęgnacyjny w przypadku rozmaitych dermatoz, w tym również tych manifestujących się zaburzeniami pigmentacyjnymi.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest charakterystyka najczęściej spotykanych zaburzeń pigmentacyjnych skóry, a także przedstawienie wybranych składników pochodzenia roślinnego istotnie redukujących hiperpigmentacje, wspomagających repigmentację skóry, a także

¹ kmazurek@sum.edu.pl, Zakład Medycyny Estetycznej, Katedra Kosmetologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

² ewa.pierzchala@sum.edu.pl, Zakład Medycyny Estetycznej, Katedra Kosmetologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

działających fotoprotekcyjnie. Ponadto w pracy zawarto informacje na temat cytofizjologii komórek barwnikowych oraz funkcji melaniny. Praca powstała w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe.

3. Melanocyt, melanogeneza, melanina

Melanocyty powstają z komórek grzebienia nerwowego. Charakteryzują się zdolnością do produkcji barwnika – melaniny. Ich prekursorami są melanoblasty, które mniej więcej w połowie ciąży przekraczają granicę warstwy podstawnej naskórka i osiągają swoją docelową lokalizację. Komórki te stanowią około 1% wszystkich komórek naskórka [3, 4]. Melanocyty przede wszystkim kojarzone są ze skórą i mieszkami włosowymi. Należy jednak podkreślić, iż występują także m.in. w mózgu, sercu, oczach, uszach, płucach, błonach śluzowych [4].

Proces syntezy barwnika u ludzi odbywa się w melanocytach, komórkach dendrytycznych pochodzących z grzebienia nerwowego. Komórki te posiadają w obrębie swojej cytoplazmy melanosomy – wyspecjalizowane organelle odpowiedzialne za syntezę, magazynowanie i transport melaniny. Melanosomy mają postać pęcherzyków i zaliczane są do grupy organeli związanych z lizosomami. Wypełnione melaniną, dojrzałe melanosomy przemieszczają się z obszaru okołojądrowego do wypustek dendrytycznych melanocytów, poprzez które przekazywane są okolicznym keratynocytom. Wyróżnić można kilka rodzajów melaniny. Czarnobrazowa eumelanina wykazuje właściwości fotoochronne, a także przyczynia się do redukcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Feomelanina z kolei cechuje się żółtoczerwoną barwą. Badania wskazują, iż po pochłonięciu promieniowania UV ten rodzaj barwnika może generować ROS, a także wykazywać działanie fototoksyczne [2, 4]. Te informacje stały się podstawą sceptycznej oceny właściwości fotoochronnych barwników skóry [5]. Należy jednak podkreślić, iż melanina w ludzkim naskórku stanowi mieszaninę obu barwników, składa się bowiem z około 74% eumelaniny i 26% feomelaniny [6].

Melanosomy wykazują zróżnicowaną budowę podyktowaną rodzajem syntetyzowanego barwnika. W jednym melanocycie można zidentyfikować zarówno feomelanosomy, jak i eumelanosomy. Melanina koncentruje się wokół jądra komórkowego, osłaniając go tym samym [4]. Należy wspomnieć, iż w ludzkim organizmie poza feomelaniną i eumelaniną zidentyfikowano także neuromelaninę, która z jednej strony chroni neurony przed szkodliwym działaniem dopaminy i jej pochodnych, jednak z drugiej strony – zwraca się także uwagę na fakt, iż w niektórych sytuacjach może stać się toksyczna dla neuronów dopaminergicznych. Jest czynnikiem rozpatrywanym w etiopatogenezie choroby Parkinsona [5].

Synteza barwników jest wieloetapowym procesem, podczas którego przy udziale tyrozynazy dochodzi do przekształcenia L-tyrozyny w L-3,4 dihydroksyfenyloalaninę (DOPA), która następnie ulega utlenieniu do L-DOPAchiononu. Na etapie powstania L-DOPAchiononu szlak syntezy eumelaniny i feomelaniny ulega rozdzieleniu. W następstwie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji oraz reakcji utleniania L-DOPAchiononu powstaje DOPAchrom, który w wyniku dalszych przemian ulega finalnie przekształceniu do eumelaniny. Z kolei przyłączenie związków tiolowych do L-DOPAchiononu zapoczątkowuje szlak syntezy feomelaniny. Szacuje się, iż ponad 125 genów związanych jest z procesem pigmentacji [4, 7].

Proces melanogenezy może być aktywowany bądź hamowany przez wiele czynników. Przykładowo: leukotrien B₄, leukotrien D₄, adrenokortykotropina (ACTH, ang. *adrenocorticotrophic hormone*) czy też hormon alpha-melanotropowy (α -MSH, ang. *α -melanocyte-stimulating hormone*) stymulują melanogenezę, natomiast czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*) i transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor beta*) hamują proces syntezy barwnika [4].

4. Zaburzenia pigmentacji skóry

4.1. Hiperpigmentacje

Zaburzenia hiperpigmentacyjne są powszechne wśród populacji ludzkiej. Mogą pojawiać się w różnym wieku. W zależności od poziomu lokalizacji depozytów barwnika hiperpigmentacje można podzielić na naskórkowe, skórne lub skórno-naskórkowe. Badanie histologiczne jest niezwykle pomocne w ocenie rodzaju hiperpigmentacji – w przypadku zmian naskórkowych widoczny jest wzrost ilości melanocytów w naskórku bądź złogi barwnika w jego strukturach, natomiast w przypadku hiperpigmentacji skórnych obserwowane są depozyty barwnika bądź melanofagi na poziomie skóry właściwej [8].

Przykładem często spotykanych hiperpigmentacji są piegi (łac. *ephelides*). Ten rodzaj zmian ma podłoże genetyczne. Piegi dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący. Charakteryzują się zwiększoną aktywnością komórek barwnikowych przy zachowanej ich liczbie. Mają charakter licznych, drobnych brunatnych plam, których barwa ulega intensyfikacji w porze letniej. Klasycznie lokalizują się na twarzy, dekolcie, przedramionach. Piegi często są traktowane jako defekt estetyczny przez posiadające je osoby, więc poprzez odpowiednio dobraną pielęgnację starają się je zniwelować. Preparaty dermokosmetyczne zawierające składniki aktywne pochodzenia roślinnego mogą przyczynić się do ujednocnienia kolorytu skóry. Piegi nie stanowią zagrożenia dla zdrowia, nie wymagają leczenia [8, 9].

Innym rodzajem hiperpigmentacji, szczególnie często pojawiającym się na skórze pacjentów dojrzałych, przewlekle korzystających z kąpeli słonecznych, są plamy soczewicowate określane jako starcze (łac. *lentigo senilis*) lub posłoneczne (łac. *lentigo solaris*). Plamy soczewicowate są mniej liczne aniżeli piegi, ale zazwyczaj są od nich większe. Posiadają barwę od jasnobrązowej do ciemnobrązowej. W obrazie histologicznym można zaobserwować wydłużone sople naskórkowe, gdzie identyfikowane są liczne, ale prawidłowe melanocyty wykazujące wzmoczoną aktywność. Lokalizują się przede wszystkim na skórze przewlekle narażonej na działanie promieniowania UV – głównie w obrębie twarzy, dłoni, przedramion, dekoltu [9-11]. Należy podkreślić, iż klasyfikacja plam soczewicowatych jest rozbudowana, natomiast omówione powyżej rodzaje plam stanowią tylko wycinek tej grupy. Plamy soczewicowate mogą mieć charakter nie tylko nabyty, ale także wrodzony. Część plam posiada uwarunkowanie genetyczne. Niektóre mogą lokalizować się na błonach śluzowych i być powiązane z zespołem Peutz-Jeghersa. Istnieje także plama soczewicowata złośliwa, mogąca dać początek inwazyjnej postaci czerniaka złośliwego skóry [9, 12, 13]. Zatem każdy rodzaj zmiany o charakterze plamy soczewicowatej musi zostać zbadany przez dermatologa zanim zostaną podjęte jakiegokolwiek decyzje dotyczące procedur estetycznych.

Duży problem estetyczny stanowi melasma (ostuda) – hiperpigmentacja charakterystyczna dla kobiet, w etiopatogenezie której istotną rolę odgrywają hormony. Szacuje się, iż ten rodzaj przebarwienia dotyczy około 20-30% kobiet stosujących doustną

terapię estrogenową. Melasma identyfikowana jest przede wszystkim u osób o fototypie od III do VI w skali Fitzpatricka. Dodatkowym czynnikiem istotnie zwiększającym ryzyko jej wystąpienia jest nadmierna ekspozycja na promieniowanie UV, choroby tarczycy oraz ciąża [14, 15]. Klinicznie melasma to rodzaj ciemnych plam występujących głównie na czole, policzkach, nad górną wargą, rzadziej w innych lokalizacjach. W zależności od głębokości depozytów barwnika można wyróżnić postać naskórkową, skórą bądź naskórkowo-skórą melasmy. W badaniu histologicznym widoczne jest uszkodzenie błony podstawnej naskórka, zwiększone unaczynienie, elastoza posłoneczna, a także obecność licznych komórek tłuszczowych [16]. Melasma jest niezwykle uciążliwym, nawracającym, trudnym terapeutycznie rodzajem hiperpigmentacji, czego odzwierciedleniem jest obniżona jakość życia pacjentów zmagających się z tym rodzajem zaburzenia barwnikowego [15]. Nie stanowi zagrożenia dla zdrowia, jednak niewątpliwie jest znacznym defektem estetycznym. Niezwykle istotna, poza procedurami gabinetowymi, w terapii ostudy jest systematyczna pielęgnacja z wykorzystaniem odpowiednich dermokosmetyków, a także ochrona przeciwsłoneczna.

Hiperpigmentacje pozapalne (PIH, ang. *postinflammatory hyperpigmentation*) są konsekwencją dermatoz zapalnych bądź urazów skóry. Mają charakter nieregularnych, ciemnych plam zlokalizowanych w miejscu pierwotnie objętym stanem zapalnym. Ten rodzaj przebarwienia jest następstwem nadmiernej produkcji melaniny bądź też nieprawidłowego odkładania barwnika w naskórku lub skórze właściwej w konsekwencji stanu zapalnego. Podobnie jak w przypadku melasmy, ryzyko wystąpienia PIHs jest istotnie wyższe u osób o wyższym fototypie. Często identyfikowane są u pacjentów z trądzikiem popolitym [17]. Tego rodzaju hiperpigmentacje zaliczane są do działań niepożądanych po procedurach estetycznych, np. peelingach chemicznych czy też laseroterapii. Istotne znaczenie w powstaniu PIH ma interleukina 1 (IL-1, ang. *interleucine 1*). Cytokina ta zwiększa uwalnianie melanotropiny oraz adrenokortykotropiny stymulującej melanogenezę. Ponadto zwiększa ekspresję receptora dla MSH na komórkach barwnikowych. Istotne działanie stymulujące aktywność melanocytów wykazano także w stosunku do innych mediatorów stanu zapalnego, m.in. prostaglandyny E2 i D2, leukotrienów LT-C₄ i LT-D₄ czy też interleukiny 6 (IL-6) [18, 19]. Przebarwienia pozapalne należą do kluczowych zaburzeń pigmentacyjnych osób młodych, zmagających się z trądzikiem popolitym. Poprzez zastosowanie odpowiednich dermokosmetyków zawierających substancje czynne pochodzenia roślinnego można ograniczyć stan zapalny i tym samym zmniejszyć ryzyko PIH.

4.2. Bielactwo nabyte

Bielactwo nabyte (łac. *vittiligo*) cechuje się obecnością białych, pozbawionych cech zapalnych, plam na skórze i błonach śluzowych, będących konsekwencją uszkodzenia i zniszczenia melanocytów. Patogeneza *vittiligo* jest złożona i nie została w pełni zdefiniowana. Jednym z wiodących mechanizmów wyjaśniających degradację melanocytów jest zjawisko autoagresji, w przebiegu którego autoreaktywne cytotoksyczne limfocyty T CD8⁺ niszczą komórki barwnikowe. Zidentyfikowano kilka antygenów swoistych dla melanocytów, które mogą zostać rozpoznane przez autoreaktywne limfocyty, są to m.in. antygen Melan-A/MART-1, glikoproteina 100 (gp100), a także białka związane z tyrozinazą 1 (TRP-1, ang. *tyrosinase-related protein 1*) oraz tyrozinazą 2 (TRP-2) [20]. Dowodem na autoimmunologiczne podłoże bielactwa nabytego jest częste występowanie u pacjenta

innych chorób z tej grupy – cukrzyca insulinozależnej typu 1, choroby Hashimoto, Gravesa-Basedowa, tocznia rumieniowatego, łysienia plackowatego czy też atopowego zapalenia skóry.

Ważną kwestią w kontekście uszkodzenia melanocytów jest także stres oksydacyjny. Zaburzenie proporcji mechanizmów oksydacji i antyoksydacji, wzmożona produkcja oraz kumulacja ROS mogą także przyczynić się do uszkodzenia funkcji komórek barwnikowych. Obecnie bielactwo nabyte traktuje się w kategoriach chorób o wieloczynnikowym podłożu, z wyraźnym poligenowym wzorcem dziedziczenia. Udział czynników środowiskowych w rozwoju *vitiligo* szacuje się na około 20% [20, 21]. Bielactwo nabyte dotyczy około 0,1-2% populacji ludzkiej, zaś pierwsze objawy choroby rejestrowane są w przeważającej mierze (87% przypadków) przed 30. rokiem życia [20]. Niestety terapia jest niezwykle wymagająca, zaś uzyskanie repigmentacji trudne. Pielęgnacja skóry pacjentów z *vitiligo*, która jest oparta przede wszystkim na fotoprotekcji, wydaje się mieć kolosalne znaczenie.

5. Składniki aktywne pochodzenia roślinnego

5.1. Substancje aktywne o potencjale rozjaśniającym

Jedną z coraz częściej wymienianych roślin, której składniki aktywne wykorzystuje się z powodzeniem w rozjaśnianiu przebarwień, jest stokrotka pospolita (łac. *Bellis perennis*). Zawarte w niej polifenole, saponiny, a także polisacharydy nie tylko wykazują właściwości pielęgnacyjne, ale także działają hamująco na proces melanogenezy, w tym zmniejszają aktywność kluczowego dla procesu enzymu, jakim jest tyrozynaza. Opatentowany, znany pod nazwą Belides™, ekstrakt ze stokrotki można odnaleźć w dermokosmetykach przeznaczonych do pielęgnacji skóry z przebarwieniami różnego pochodzenia [22].

Dobrze poznanym składnikiem wykorzystywanym w walce z hiperpigmentacjami jest arbutyna, a dokładniej β -arbutyna, identyfikowana w liściach mącznicy lekarskiej (łac. *Arctostaphylos uva-ursi*) oraz borówki brusznicy (łac. *Vaccinium vitis-idaea*). Składnik ten zmniejsza ryzyko powstania dyschromii, analogicznie do ekstraktów ze stokrotki, blokując aktywność tyrozynazy. Ponadto warto podkreślić, iż działa również w innym mechanizmie, a mianowicie opóźnia dojrzewanie melanosomów. Stężenie β -arbutyny w kosmetykach nie przekracza 7%. Świat roślin obfituje w substancje aktywne, które z powodzeniem mogą być wykorzystywane w produktach wspomagających redukcję hiperpigmentacji. Kolejnym cennym i jednocześnie bezpiecznym dla skóry składnikiem blokującym syntezę melaniny jest identyfikowany w morwie białej (łac. *Morus alba*) oksyresweratrol [23].

Właściwości prozdrowotne izoflawonów sojowych są powszechnie znane. Przypisuje się im m.in. działanie przeciwwzapalne, przeciwnowotworowe, a także niwelujące negatywne objawy towarzyszące menopauzie. Najnowsze badania wskazują na duży potencjał ekstraktów sojowych także w dermatologii oraz kosmetologii. Wykazano, że izoflawony wyizolowane z pasty sojowej znacząco hamują aktywność tyrozynazy. Ponadto gliceoлина (zaliczana do fitoaleksyn), wytwarzana przez soję w warunkach stresowych, hamuje syntezę barwnika i aktywność tyrozynazy m.in. poprzez obniżenie ekspresji białek TRP1 i TRP2 w mysich komórkach czerniaka B16-F10 [24]. Najnowsze badania dotyczące ekstraktów pozyskiwanych z soi (łac. *Glycine max*) stały się inspiracją do tworzenia nowych receptur kosmetyków, a także nadzieją dla terapii zaburzeń barwnikowych skóry.

Niezwykle istotne w terapii hiperpigmentacji o różnej etiologii są produkty i zabiegi złuszczące, dzięki którym dochodzi do usunięcia określonej grubości warstwy naskórka i/lub skóry właściwej, w obrębie której znajdują się nagromadzone depozyty barwnika. Oczywiście wykorzystywane obecnie substancje złuszczące należące do α -hydroksykwasy czy β -hydroksykwasy uzyskiwane są syntetycznie, jednak należy podkreślić, iż kwas migdałowy w naturze znajduje się w gorzkich migdałach, a także identyfikowany jest w pestkach moreli oraz wiśni [25]. Kora wierzby z kolei jest naturalnym źródłem kwasu salicylowego. Syntezy tego związku dokonano dopiero w 1935 roku [26].

5.2. Substancje aktywne o potencjale przeciwzapalnym

Przebarwienia pozapalne zaliczane są do jednych z najczęściej rejestrowanych działań niepożądanych procedur estetycznych takich jak laseroterapia czy peelingi chemiczne. Rozwijają się także jako konsekwencja dermatoz zapalnych, szczególnie trądziku czy też atopowego zapalenia skóry (AZS). Niezwykle istotne u pacjentów predysponowanych do występowania PIH jest wdrożenie odpowiedniej pielęgnacji opartej na preparatach zawierających składniki, które ograniczają stan zapalny skóry. W preparatach dermokosmetycznych można obecnie odnaleźć składniki pochodzenia roślinnego cechujące się dużym profilem bezpieczeństwa i jednocześnie wykazujące potencjał przeciwzapalny. Należy do nich madekasozyd pozyskiwany z wąkroty azjatyckiej (łac. *Centella asiatica*). Ta wieloletnia roślina, występująca m.in. na Madagaskarze i w Chinach, zawiera pentacykliczne saponiny triterpenowe, do których poza madekasozydem zalicza się m.in. azjatykozyd, centellozyd, tankunizyd czy też kwas azjatykowy. Jest także źródłem monoterpenów, flawonoidów, magnezu oraz niektórych witamin (A, C, K, E) [27]. Ze względu na bogactwo składników aktywnych jest wykorzystywana w medycynie ajurwedyjskiej od blisko 2000 lat. Współczesne badania wykazały, iż madekasozyd istotnie redukuje stan zapalny w przebiegu trądziku poprzez hamowanie produkcji cytokin prozapalnych, w tym interleukiny 1 β (IL-1 β). Doskonale sprawdza się w gojeniu ran poprzez przyspieszenie migracji keratynocytów w miejsce zranienia. Wykazuje działanie przeciwutleniające. Najnowsze badania wskazują, iż może niwelować uszkodzenia oksydacyjne w melanocytach, co stanowi ważny aspekt w perspektywach terapii bielactwa. Stosowanie preparatów zawierających madekasozyd i azjatykozyd przyczyniło się do redukcji intensywności przebarwień. Ekstrakty z wąkroty azjatyckiej poprzez hamowanie aktywności cytokin prozapalnych zmniejszają intensywność objawów charakterystycznych dla AZS, ograniczając ryzyko wystąpienia PIH [28].

Kolejną, niezwykle cenną w kontekście zaburzeń pigmentacyjnych skóry, rośliną jest lukrecja gładka (łac. *Glycyrrhiza glabra*). Występujący w korzeniu lukrecji flawonoid (glabrydyna) zmniejsza aktywność tyrozynazy, a także chroni skórę przed promieniowaniem UVB [23]. W dermokosmetykach nowej generacji wykorzystywany jest także inny składnik pozyskiwany z lukrecji – kwas glicyretynowy, określany jako enoksolon, wykazujący działanie przeciwzapalne, immunomodulujące i przeciwutleniające. Działanie przeciwzapalne zostało przyrównane do działania glikokortykoidów. Kwas glicyretynowy jest inhibitorem dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 2, która odpowiada za utrzymanie prawidłowej równowagi kortyzolu i znacznie mniej aktywnego kortyzonu, co ma kluczowe znaczenie w rozwoju PIH [23, 29, 30].

5.3. Substancje aktywne o potencjale fotoprotekcyjnym i antyoksydacyjnym

Jedną z kluczowych strategii obronnych roślin przed promieniowaniem ultrafioletowym jest wytwarzanie rozmaitych metabolitów wtórnych, które coraz częściej wykorzystywane są w produkcji innowacyjnych kosmetyków dedykowanych skórom z dysfunkcjami pigmentacyjnymi. Nie tylko chronią przed bezpośrednim działaniem UV, ale także wygaszają powstałe w wyniku jego działania reaktywne formy tlenu. Biorąc pod uwagę fakt, iż badania naukowców z NASA (ang. *National Aeronautics and Space Administration*) wskazują, że rozmiar dziury ozonowej powróci do poziomu rejestrowanego przed 1980 rokiem dopiero około 2075 roku, substancje promieniochronne w codziennej pielęgnacji skóry, szczególnie skóry obarczonej dyschromiami, mają ogromne znaczenie [31]. Przewlekła ekspozycja na promieniowanie UV istotnie wpływa na powstawanie oraz intensyfikację hiperpigmentacji, ma również negatywny wpływ na skórę pacjentów z *vitiligo*, zwiększając ryzyko jej poparzenia. Przykładowo, promieniowanie UVB upośledza zarówno liczbę, jak i aktywność komórek Langerhansa w skórze, istotnie wpływa na wzrost poziomu cytokin prozapalnych, w tym IL-1 β , IL-6 i TNF- α , co zwiększa ryzyko wystąpienia PIH. Ponadto aktywuje ekspresję niektórych metaloproteinaz (MMPS, ang. *metalloproteinases*), co przyczynia się do intensyfikacji procesu starzenia, a także obniża poziom interleukiny 12 (IL-12) w hodowli mysich komórek nabłonka linii JB6, zwiększa ryzyko rozwoju raka podstawnokomórkowego, kolczysto-komórkowego, a także czerniaka [31].

Karotenoidy, coraz częściej znajdujące się w kosmetykach, wykazują zdolność pochłaniania światła w zakresie od 350 nm do 500 nm, ponadto przerywają łańcuchowe reakcje wolnorodnikowe, a także reagują z produktami peroksydacji lipidów. Bogatym źródłem karotenoidów poza znanym korzeniem marchwi (łac. *Daucus carota*) są także owoce dzikiej róży (łac. *Rosa canina*), owoce rokitnika zwyczajnego (łac. *Hippophae rhamnoides*) oraz owoce pomidora (łac. *Solanum lycopersicum*), zawierające likopen – przełomowy składnik nie tylko kosmetyków, ale przede wszystkim nutrikosmetyków [31, 32].

Niezwykle cenne w kosmetykach dedykowanych skórom z dyschromiami są poza karotenoidami także polifenole. Bogaty w te związki jest coraz bardziej popularny ekstrakt z paproci złocistej (łac. *Polypodium leucotomos*). Stosowany miejscowo redukuje intensywność reakcji fototoksycznych prowokowanych przez psoraleny. Wykazano także skuteczność w ochronie przed promieniowaniem słonecznym przy doustnym podaniu ekstraktu [35].

Zielona herbata (łac. *Camellia sinensis*) jest źródłem składników antyoksydacyjnych i fotoochronnych. Zidentyfikowano w jej składzie m.in. epikatechinę, epigallokatechinę i galusan epigallokatechiny – silne przeciwutleniacze. Stosowanie zielonej herbaty zarówno miejscowo, jak i przyjmowanie doustne ogranicza stany zapalne indukowane przez UV [22, 35].

Ciekawym składnikiem, którym zaczęła interesować się współczesna kosmetologia, jest *Hylocereus polyrhizus*, znany jako smoczy owoc. Skórka owocu jest bowiem obfita w związki bioaktywne. Wykazuje duży potencjał antyoksydacyjny dzięki zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów, a także działanie fotoochronne, zarówno w zakresie UVA, jak i UVB. Ekstrakty ze skórki smoczego owocu mogą stanowić alternatywę dla filtrów syntetycznych [36].

5.4. Substancje pochodzenia roślinnego stosowane w repigmentacji skóry

Duże nadzieje w odniesieniu do terapii i pielęgnacji skór z objawami dyschromii pokłada się obecnie w czarnuszce siewnej (łac. *Nigella sativa*). Hamując aktywność mieloperoksydazy, przyczynia się do redukcji ilości wolnych rodników. Ważne z punktu widzenia dermatologii są właściwości przeciwzapalne przypisywane czarnuszce, a także umiejętność rozpraszania melaniny, co zapobiega tworzeniu depozytów barwnika i tym samym zmniejsza ryzyko rozwoju hiperpigmentacji. Ponadto badania przeprowadzone przez Sarac i in. (2021) wykazały, iż stosowanie kremu z ekstraktem z czarnuszki siewnej 2 razy dziennie przez 6 miesięcy istotnie wpływa na repigmentację odbarwień w okolicy twarzy, narządów płciowych i dłoni u pacjentów z *vitiligo* [33, 34].

Wykazano także, iż korzystne dla repigmentacji skóry w przebiegu bielactwa nabytego jest zastosowanie wspomnianego wcześniej ekstraktu z paproci złocistej. Przyjmowany doustnie 2 razy dziennie ekstrakt połączony z fototerapią UVB (311 nm) stosowaną 2 razy w tygodniu poprawił repigmentację plam bielaczych zlokalizowanych na dłoniach oraz na szyi. Biorąc pod uwagę właściwości immunomodulujące oraz przeciwutleniające ekstraktu z *Ginkgo biloba*, można rozpatrywać jego zastosowanie u pacjentów z *vitiligo*. Zaobserwowano bowiem znaczącą repigmentację stosując *per os* u pacjentów ekstrakt z miłorzębu japońskiego 3 razy dziennie po 40 mg w ciągu pół roku [35].

Niestety nadal widoczna jest dysproporcja między ilością badań poświęconych wykorzystaniu składników roślinnych w terapii i pielęgnacji skóry z hiperpigmentacjami a terapii skóry z bielactwem nabytym. Przytoczone powyżej przykłady wskazują jednak, iż zainteresowanie składnikami botanicznymi w terapii *vitiligo* ma tendencję rosnącą. Oczywiście ten obiecujący kierunek w terapii bielactwa nabytego wymaga dalszych badań.

6. Podsumowanie

Wygląd naszej skóry stanowi niezwykle ważną komponentę wizerunku. Szczególne znaczenie wydają się mieć defekty zlokalizowane w obrębie twarzy. Zaburzenia pigmentacji skóry, zarówno hiperpigmentacje, jak i odbarwienia w przebiegu *vitiligo*, istotnie obniżają jakość życia pacjentów. Dyschromie mogą znacząco zniekształcać tzw. *body image*, czyli obraz ciała, który tworzymy we własnych umysłach. Negatywne postrzeganie samych siebie niesie za sobą daleko idące skutki w postaci braku poczucia własnej wartości, pogorszenia relacji społecznych, poczucia stygmatyzacji i osamotnienia [37-39]. Dyschromie stanowią zatem duże wyzwanie zarówno dla współczesnej dermatologii, medycyny estetycznej, jak i kosmetologii.

Oprócz laseroterapii, peelingów chemicznych czy też fototerapii niezwykle istotna w przebiegu zaburzeń pigmentacyjnych skóry jest prawidłowa pielęgnacja oparta na ochronie przeciwśłonecznej. Należy podkreślić, iż wybrane składniki pochodzenia roślinnego doskonale zabezpieczają skórę w tym zakresie, spełniają bowiem kryteria produktów fotoochronnych, cechują się wysoką fotostabilnością, a także wykazują właściwości antyoksydacyjne. Wiele naturalnych związków, takich jak flawonoidy, karotenoidy, garbniki, olejki eteryczne, jest coraz częściej wykorzystywanych w dermokosmetykach, w tym także w produktach do pielęgnacji skóry z dyschromiami.

Systematyczne stosowanie substancji rozjaśniających, blokujących syntezę i transport melaniny, istotnie wspomaga redukcję hiperpigmentacji. Również w tym zakresie substancje aktywne pochodzenia roślinnego zyskały dużą popularność, przede wszystkim

ze względu na bezpieczne i efektywne działanie. Obiecujące są także najnowsze badania dotyczące zastosowania ekstraktów roślinnych w repigmentacji skóry.

Obecnie oczekiwania konsumentów dotyczące produktów do pielęgnacji skóry znacznie wzrosły, zmieniły się preferencje. Coraz częściej zwracamy uwagę na pochodzenie składników, a także na długofalowy profil bezpieczeństwa w odniesieniu do ich stosowania. Wyciągi roślinne były od stuleci z powodzeniem stosowane w medycynie, jednak nie potrafiono wyjaśnić mechanizmów ich działania. Dostępne aktualnie techniki badania surowców roślinnych, a także reakcji skóry na rozmaite bodźce otworzyły nowy etap produkcji dermokosmetyków, oparty na gruntownym zrozumieniu fizjologii i potrzeb skóry, a także wyselekcjonowaniu skutecznych i bezpiecznych składników aktywnych z otaczających nas, niezmiernie bogatych w składniki dobroczynne dla naszej skóry, surowców roślinnych.

Literatura

1. Li H., Hou L., *Regulation of melanocyte stem cell behavior by the niche microenvironment*, Pigment Cell & Melanoma Research, 5, 2018, s. 556-569.
2. Rok J., Otręba M., Buszman E., Wrześniok D., *Melanina – z melanocyta do keratynocyta, czyli jak przebiega transport melaniny w skórze*, Annales Academiae Medicae Silesiensis, 1, 2012, s. 60-66.
3. Bertrand J.U., Steingrimsson E., Jouenne F., Bressac-de Paillerets B., Larue L., *Melanoma risk and melanocyte biology*, Acta Dermato-Venereologica, 11, 2020, s. 272-283.
4. Rzepka Z., Buszman E., Beberok A., Wrześniok D., *Od tyrozyny do melaniny: ścieżki sygnalizacyjne i czynniki regulujące melanogenezę*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 70, 2016, s.695-708.
5. Chrabąszcz M., Czuwara J., Rudnicka L., *Odd correlation: Parkinson's disease and melanoma. What is the possible link?* Oncology in Clinical Practice, 1, 2019, s. 62-70.
6. Ito S., Wakamatsu K., Sarna T., *Photodegradation of eumelanin and pheomelanin and its pathophysiological implications*, Photochemistry and Photobiology, 3, 2018, s. 409-420.
7. Ikeda Y., Wada A., Hasegawa T., Yokota M., Koike M., Ikeda S., *Melanocyte progenitor cells reside in human subcutaneous adipose tissue*, PLoS One, 8, 2021, e0256622.
8. Wang R.F., Ko D., Friedman B.J., Lim H.W., Mohammad T.F., *Disorders of hyperpigmentation. Part I. Pathogenesis and clinical features of common pigmentary disorders*, Journal of the American Academy of Dermatology, 2, 2023, s. 271-288.
9. Engler-Jastrzębska M., Kamm A., *Molekularne podstawy pigmentacji skóry. Etiologia I profilaktyka hiperpigmentacji*, Kosmetologia Estetyczna, 3, 2019, s. 275-284.
10. Choi W., Yin L., Smuda C., Batzer J., Hearing V.J., Kolbe L., *Molecular and histological characterization of age spots*, Experimental Dermatology, 3, 2017, s. 242-248.
11. Takekawa C., Fukumoto T., Haraoka G., Terashi H., *Combination treatment algorithm for pigmentary disorders of the face: A prospective observational study in Asian patients*, Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2, 2021, s. 370-376.
12. Kamińska-Winciorek G., Lange D., Witkowski A., *Diagnostyka obrazowa złośliwej plamy soczewicowatej (lentigo maligna) w obrębie wolnego płata małżowiny usznej*, Forum Dermatologicum, 2, 2018, s. 81-83.
13. Tacheci I., Kopacova M., Bures J., *Peutz-Jeghers syndrome*, Current Opinion in Gastroenterology, 3, 2021, s. 245-254.
14. Pietrzak B., Właźlak E., Zwierzyńska E., *Estrogeny stosowane długotrwale: korzyści czy ryzyko*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 69, 2015, s. 285-293.
15. Kagma K., Fabi S., Goldman M.P., *Melasma's impact on quality of life*, Journal of Drugs in Dermatology, 2, 2020, s.184-187.

16. Neagu N., Conforti C., Agozzino M., Marangi G.F., Morariu S.H., Pellacani G., Persichetti P., Piccolo D., Segreto F., Zalaudek I., Dianzani C., *Melasma treatment: a systematic review*, Journal of Dermatological Treatment, 4, 2022, s. 1816-1837.
17. Lawrence E., Al Aboud K.M., *Postinflammatory hyperpigmentation*, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing [Internet], Floryda 2022, PMID: 32644576.
18. Davis E.C., Callender V.D., *Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color*, The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology, 7, 2010, s. 20-31.
19. Maghfour J., Olayinka J., Hamzavi I.H., Mohammad T.F., *A Focused review on the pathophysiology of post-inflammatory hyperpigmentation*, Pigment Cell & Melanoma Research, 3, 2022, s. 320-327.
20. Bergqvist C., Ezzedine K., *Vitiligo: A focus on pathogenesis and its therapeutic implications*, The Journal of Dermatology, 3, 2021, s. 252-270.
21. Marchioro H.Z., Silva de Castro C.C., Fava V.M., Sakiyama P.H., Dellatorre G., Miot H.A., *Update on the pathogenesis of vitiligo*, Anais Brasileiros de Dermatologia, 4, 2022, s. 478-490.
22. Zasada M., *Substancje biologicznie czynne stosowane w rozjaśnianiu hiperpigmentacji skóry*, Kosmetologia Estetyczna, 5, 2016, s. 467-473.
23. Sadowska A., Kamm A., *Sposoby zapobiegania i niwelowania hiperpigmentacji skóry twarzy w gabinecie kosmologicznym. Ocena aktualnego stanu wiedzy społeczeństwa*, Aesthetic Cosmetology and Medicine, 4, 2020, s. 363-382.
24. Bodurlar Y., Caliskan M., *Inhibitory activity of soybean (Glycine max L. Merr.) cell culture extract on tyrosinase activity and melanin formation in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced B16-F10 melanoma cells*, Molecular Biology Reports, 8, 2022, s. 7827-7836.
25. Jankowiak W., Imielski W., Janeba-Bartoszewicz E., *Zastosowanie kwasu migdałowego w peelingu kosmetycznym*, Kosmetologia Estetyczna, 1, 2016, s. 57-60.
26. Zielonka A., Loniewski I., Samochowiec L., Juźwiak S., *Właściwości farmakologiczne standaryzowanego wyciągu z kory wierzby (Cortex salicis)*, Postępy Fitoterapii, 2, 2000, s. 23-30.
27. Król D., *Wąkrota azjatycka (Centella asiatica L.) – właściwości lecznicze*, Postępy Fitoterapii, 2, 2010, s. 101-105.
28. Bhandopadhyay S., Mandal S., Ghorai M., Jha N.K., Kumar M., Radha, Ghosh A., Proćków J., Pérez de la Lastra J.M., Dey A., *Therapeutic properties and pharmacological activities of asiaticoside and madecassoside: A review*, Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2023, s. 593-608, doi: 10.1111/jcmm.17635.
29. Pastorino G., Cornara L., Soares S., Rodrigues F., Oliveira M.B.P.P., *Liquorice (Glycyrrhiza glabra): A phytochemical and pharmacological review*, Phytotherapy Research, 12, 2018, s. 2323-2339.
30. Langer D., Stryczyński Ł., Szturo A., Tykarska E., *Nadciśnienie tętnicze indukowane przez lukrecję*, Nadciśnienie Tętnicze, 3, 2014, s. 121-126.
31. Takshak S., Agrawal S.B., *Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 193, 2019, s. 51-88.
32. Igielska-Kalwat J., Wawrzyńczak A., Nowak I., *Karotenoidy i ich zastosowanie w przemyśle kosmetycznym na przykładzie beta-karotenu*, Chemik, 2, 2012, s. 140-144.
33. Hwang J.R., Cartron A.M., Khachemoune A., *A review of Nigella sativa plant-based therapy in dermatology*, International Journal of Dermatology, 12, 2021, s. 493-499.
34. Sarac G., Kapicioglu Y., Sener S., Mantar I., Yoluglu S., Dundar C., Turkoglu M., Pekmezci E., *Effectiveness of topical Nigella sativa for vitiligo treatment*, Dermatologic Therapy, 4, 2019, s. 12949.

35. Reuter J., Wölfle U., Korting H.Ch., Schempp Ch., *Which plant for which skin disease? Part 2: Dermatophytes, chronic venous insufficiency, photoprotection, actinic keratoses, vitiligo, hair loss, cosmetic indications*, Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 11, 2010, s. 866-873.
36. Vijayakumar R., Abd Gani S.S., Zaidan U.H., Halmi M.I.E., Karunakaran T., Hamdan M.R., *Exploring the potential use of Hylocereus polyrhizus peels as a source of cosmeceutical sunscreen agent for its antioxidant and photoprotective properties*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 4, 2020, 7520736.
37. Gupta V., Yadav D., Satapathy S., Upadhyay A., Mahajan S., Ramam M., Sharma V.K., *Psychosocial burden of lichen planus pigmentosus is similar to vitiligo, but greater than melasma: A cross-sectional study from a tertiary-care center in north India*, Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology, 3, 2021, s. 341-347.
38. Sarkar R., Bansal A., Ailawadi P., *Future therapies in melasma: What lies ahead?* Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology, 1, 2020, s. 8-17.
39. Tomas-Aragones L., Marron S.E., *Body image and body dysmorphic concerns*, Acta Dermato-Venereologica, 217, 2016, s. 47-50.

Wybrane składniki pochodzenia roślinnego w terapii i pielęgnacji skóry z zaburzeniami pigmentacyjnymi

Streszczenie

Wygląd naszej skóry stanowi niezwykle ważną komponentę wizerunku. Jednym z wiodących problemów współczesnej dermatologii, medycyny estetycznej, a także kosmetologii są dyschromie. Zaburzenia pigmentacji skóry, zarówno hiperpigmentacje, jak i odbarwienia w przebiegu bielactwa nabytego (*vitiligo*), istotnie obniżają jakość życia pacjentów. Odpowiednia pielęgnacja, oparta na składnikach skutecznych i jednocześnie cechujących się dużym profilem bezpieczeństwa, wydaje się odgrywać kluczową rolę w całościowej terapii skóry z dysfunkcjami barwnikowymi.

Celem niniejszej pracy jest charakterystyka najczęściej spotykanych zaburzeń pigmentacyjnych skóry, a także przedstawienie wybranych składników pochodzenia roślinnego istotnie redukujących hiperpigmentację, wspomagających repigmentację skóry, a także działających fotoprotekcyjnie. Ponadto w pracy zawarto informacje na temat cytofizjologii komórek barwnikowych oraz funkcji melaniny.

Przykładem często identyfikowanej hiperpigmentacji jest melasma – dyschromia charakterystyczna dla kobiet, w etiopatogenezie której istotną rolę odgrywają hormony. Przebarwienia pozapalne z kolei są konsekwencją dermatoz zapalnych bądź urazów skóry. Istotne działania stymulujące aktywność melanocytów wykazano w stosunku do mediatorów stanu zapalnego, m.in. interleukiny 1 i 6, prostaglandyny E2 i D2, leukotrienów C4 i D4. Na skórze pacjentów dojrzałych, przewlekle korzystających z kąpieli słonecznych widoczne są plamy soczewicowate określane jako starcze lub posłoneczne. Bielactwo nabyte z kolei cechuje się obecnością białych i pozbawionych cech zapalnych plam na skórze oraz błonach śluzowych, będących konsekwencją uszkodzenia i zniszczenia melanocytów.

Świat roślin obfituje w substancje aktywne, które z powodzeniem mogą być wykorzystywane w produktach wspomagających redukcję hiperpigmentacji. Do składników blokujących syntezę melaniny zaliczają się m.in. opatentowany i znany pod nazwą Belides™ ekstrakt ze stokrotki, β-arbutyna, oksyresweratrol, a także izoflawony wyizolowane z pasty sojowej. W preparatach dermokosmetycznych zawarte są także innowacyjne składniki pochodzenia roślinnego wykazujące potencjał przeciwapalny (madekasozyd, kwas glicyretynowy), co jest niezwykle istotne w minimalizowaniu ryzyka rozwoju przebarwień pozapalnych. Bogaty w polifenole ekstrakt z paproci złocistej czy też karotenoidy wykazują doskonałe właściwości fotoprotekcyjne i mogą stanowić alternatywę dla filtrów chemicznych. Niezwykle istotne w ochronie skóry są również składniki wykazujące potencjał antyoksydacyjny, do których zaliczyć można m.in. zieloną herbatę czy też innowacyjny ekstrakt ze skórki *Hylocereus polyrhizus*, znanego jako smoczy owoc. Dużym wyzwaniem jest pielęgnacja skóry pacjentów z bielactwem nabytym. Obiecujące wydają się wyniki badań dotyczące ekstraktu z czarnuszki siewnej, która wspomaga repigmentację skóry. Podobne działanie wykazują przyjmowane doustnie ekstrakty z paproci złocistej czy też miłorzębu dwuklapowego.

Wiele naturalnych związków pochodzących z roślin wykazuje niezwykle duży potencjał pielęgnacyjny w przypadku rozmaitych dermatoz, w tym również tych manifestujących się zaburzeniami pigmentacyjnymi.

Słowa kluczowe: dyschromia, hiperpigmentacja, bielactwo nabyte, ekstrakty roślinne

Selected ingredients of plant origin in the treatment and care of skin with pigmentation disorders

Abstract

The appearance of our skin is an extremely important component of our image. Dyschromia is one of the leading problems of modern dermatology, aesthetic medicine and cosmetology. Skin pigmentation disorders, both hyperpigmentation and discoloration in the course of vitiligo, significantly reduce the quality of life for patients. Appropriate care, based on effective and characterized by a large safety profile ingredients seems to play a key role in the overall therapy of skin with pigmentation dysfunctions.

The aim of this paper is to characterize the most common skin pigmentation disorders and to present selected plant-derived ingredients that significantly reduce hyperpigmentation, support skin repigmentation, and have photoprotective properties. In addition, the paper contains information on the cytophysiology of pigment cells and the function of melanin.

An example of frequently identified hyperpigmentation is melasma – dyschromia characteristic of women, in the etiopathogenesis of which hormones play an important role. Post-inflammatory hyperpigmentation, in turn, is a consequence of inflammatory dermatoses or skin injuries. A significant stimulating effect on the activity of melanocytes has been demonstrated in relation to inflammatory mediators, e.g. interleukins 1 and 6, prostaglandins E2 and D2, leukotrienes C4 and D4. On the skin of mature patients, chronically sunbathing, senile lentigines or solar lentigines are visible. Vitiligo, in turn, is characterized by the presence of white, non-inflammatory spots on the skin and mucous membranes, which are the consequence of damage and destruction of melanocytes.

The world of plants abounds in active substances that can be successfully used in products supporting the reduction of hyperpigmentation. The ingredients that block the synthesis of melanin include, among others, the patented and known under the name Belides™ daisy extract, β-arbutin, oxyresveratrol, as well as iso-flavones isolated from soybean paste. The dermocosmetic preparations also contain innovative ingredients of plant origin, showing anti-inflammatory potential (madecassoside, glycyrrhetic acid), which is extremely important in minimizing the risk of post-inflammatory hyperpigmentation.

Rich in polyphenols, the *Polypodium leucotomos* extract or carotenoids show excellent photoprotective properties and can be an alternative to chemical filters. Extremely important in skin protection are also ingredients with antioxidant potential, which include e.g. green tea or the innovative *Hylocereus polyrhizus* (pitaya or more commonly known as dragon fruit) peel extract. A big challenge is taking care of the skin of patients with vitiligo. A big challenge is taking care of the skin of patients with vitiligo. There is some promising research on the results of research on the *Nigella sativa* extract, which supports skin repigmentation. Orally taken golden serpent fern extract or ginkgo extract have a similar effect.

Many natural compounds derived from plants show extraordinary care potential in the case of various dermatoses, including those manifested by pigmentation disorders.

Keywords: dyschromia, hyperpigmentations, melasma, vitiligo, plant extracts

Wpływ składu surowca roślinnego na oddziaływania z wolnymi rodnikami naparów z czystka szarego, róży dzikiej, ketmii szczawiowej oraz pokrzywy zwyczajnej – badania metodą EPR

1. Wstęp

Wolne rodniki to charakteryzujące się wysoką reaktywnością cząsteczki, które posiadają jeden lub więcej niesparowanych elektronów [1]. Metodą pozwalającą na badanie właściwości wolnych rodników oraz oddziaływań wolnych rodników z antyoksydantami jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [2].

W ochronie organizmu przed wolnymi rodnikami istotną rolę odgrywają antyoksydanty. Są to substancje, które opóźniają lub hamują utlenienie substancji [1, 3]. Biorąc pod uwagę źródło pochodzenia, antyoksydanty możemy podzielić na syntetyczne i naturalne. Antyoksydanty naturalne to przede wszystkim zawarte w roślinach oraz ich przetworach substancje biologicznie czynne (polifenole, karotenoidy, tokoferole, kwas askorbinowy) [3].

W ostatnich latach coraz większe znaczenie odgrywają antyoksydanty naturalne, które charakteryzują się większą stabilnością niż syntetyczne, bezpieczeństwem stosowania oraz skutecznością działania [3-5]. Roślinami o cennych właściwościach leczniczych, będącymi bogatym źródłem antyoksydantów, są czystek szary, róża dzika, ketmia szczawiowa oraz pokrzywa zwyczajna [5-9].

Czystek szary (*Cistus incanus* L.) to roślina o delikatnych, różowych kwiatach, powszechnie znana jako skalna róża [6, 10]. Surowcem zielarskim są liście oraz ziele czystka, które zawierają kwasy fenolowe (galusowy, chlorogenowy, elagowy), flawonoidy, w tym flawonole (kwercetyna, kemferol) i ich glikozydy (kwercytryna, mirycytryna), a także terpeny [10, 11]. Ekstrakty wodne oraz wodno-alkoholowe z czystka wykazują działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwrzodowe i przeciwnowotworowe [6, 10-12].

Róża dzika (*Rosa canina* L.) to krzew, którego surowcem zielarskim są dojrzałe owoce o czerwonym zabarwieniu [7, 13]. Owoce dzikiej róży wyróżnia duża zawartość witaminy C. Ponadto są one bogatym źródłem karotenoidów (likopen, zeaksantyna, β -karoten), polifenoli (katechina, kwercetyna, kemferol, resweratrol), tokoferoli, pektyn, olejków eterycznych, witamin A, K, B₁, B₂ oraz minerałów – wapnia, potasu i fosforu [7, 13-15]. Ze względu na bogactwo związków biologicznie czynnych dzika róża wykazuje działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciw-

¹ mzdylbel@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

² bpilawa@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

³ s74880@365.sum.edu.pl, absolwentka Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

bólowe, przeciwwrzodowe, kardioprotekcyjne, gastroprotekcyjne, przeciwcukrzycowe oraz pozytywnie wpływa na wygląd skóry [13, 14].

Surowcem zielarskim ketmii szczawiowej (*Hibiscus sabdariffa* L.) są intensywnie czerwone kielichy i kieliszki rośliny [8, 16, 17]. Ekstrakt z kwiatów hibiskusa jest bogaty w kwasy organiczne (jabłkowy, hibiskusowy, cytrynowy), antocyjany (hibiscyna), flawanole (katechina, galusan epigallokatechiny) oraz kwasy fenolowe (kwas kawowy i protokatechowy) [8, 18]. Wśród właściwości leczniczych należy wymienić działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, hipotensyjne, hipolipidemiczne, hepatoprotekcyjne i przeciwnowotworowe [8, 17, 18].

Pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.) to roślina szeroko stosowana w medycynie, farmacji, przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym [19, 20]. Surowcem zielarskim są ziele, liście, korzenie oraz nasiona. Ziele pokrzywy zwyczajnej stanowi cenne źródło substancji biologicznie czynnych: karotenoidów (karoten, ksantofil), flawonoidów (m.in. kwercetyna, kemferol, rutyna), kwasów fenolowych (m.in. kwas kawowy, kumarowy), witamin C, B₅, garbników (taniny) oraz składników mineralnych (m.in. żelazo, mangan, miedź, cynk, glin, krzem, magnez, selen) [9, 19, 21]. Karotenoidy występują również w liściach pokrzywy [9]. Flawonoidy, kwasy fenolowe, witaminy i substancje mineralne występują w liściach, korzeniach i nasionach pokrzywy zwyczajnej [9]. Dzięki bogatej zawartości substancji bioaktywnych ekstrakty z pokrzywy wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwhistaminowe, diuretyczne, hipolipidemiczne, hipoglikemiczne oraz przeciwnowotworowe [9, 21].

2. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) wpływu składu surowca roślinnego na oddziaływania z wolnymi rodnikami naparów z mieszaniny czystka szarego, róży dzikiej, ketmii szczawiowej oraz pokrzywy zwyczajnej.

Wyznaczono oraz porównano wielkości i kinetyki oddziaływania z wolnymi rodnikami naparów uzyskanych z badanych surowców roślinnych różniących się udziałem wagowym poszczególnych składników.

3. Materiały i metody

3.1. Charakterystyka i otrzymywanie badanych naparów

Do sporządzenia naparów użyto ziela czystka, owoców róży, kwiatów hibiskusa oraz liści pokrzywy (rys. 1), które zakupiono w sklepie zielarskim. Na wadze analitycznej Sartorius (Niemcy) odważono badane surowce roślinne w następujących proporcjach:

- 1 : 1 : 1 : 1 – 0,6 g ziela czystka, 0,6 g owoców róży, 0,6 g kwiatów hibiskusa, 0,6 g liści pokrzywy;
- 2 : 1 : 1 : 1 – 0,96 g ziela czystka, 0,48 g owoców róży, 0,48 g kwiatów hibiskusa, 0,48 g liści pokrzywy;
- 1 : 2 : 1 : 1 – 0,48 g ziela czystka, 0,96 g owoców róży, 0,48 g kwiatów hibiskusa, 0,48 g liści pokrzywy;
- 1 : 1 : 2 : 1 – 0,48 g ziela czystka, 0,48 g owoców róży, 0,96 g kwiatów hibiskusa, 0,48 g liści pokrzywy;
- 1 : 1 : 1 : 2 – 0,48 g ziela czystka, 0,48 g owoców róży, 0,48 g kwiatów hibiskusa, 0,96 g liści pokrzywy.



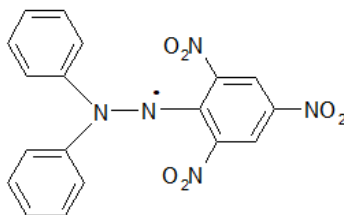
Rysunek 1. Ziele czystka (a), owoce róży (b), kwiaty hibiskusa (c) oraz liście pokrzywy (d) [opracowanie własne]

W celu otrzymania naparów odpowiednio odważone surowce roślinne umieszczono w zlewkach, a następnie zalano do objętości 250 ml wodą o temperaturze 90°C. Zlewki przykryto szalkami Petriego. Po upływie 15 minut wszystkie próbki przesączono przez jałową gazę do wcześniej przygotowanych zlewek. Sporządzone napary pozostawiono do ostygnięcia, a następnie poddano badaniom za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Badania powtórzono 3-krotnie, a wyniki uśredniono.

3.2. Pomiary z zastosowaniem spektroskopii EPR

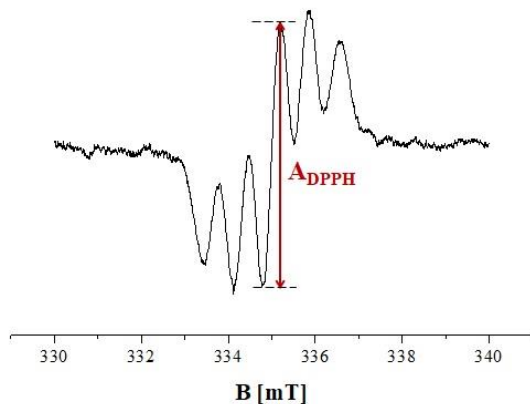
Do badania oddziaływań z wolnymi rodnikami naparów wykorzystano spektrometr elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9,3 GHz) firmy Radiopan (Poznań) z modulacją pola magnetycznego równą 100 kHz oraz współpracujący ze spektrometrem system numerycznej akwizycji danych Rapid Scan Unit firmy Jagmar (Kraków). Widma EPR w postaci pierwszej pochodnej absorpcji rejestrowano przy tłumieniu wynoszącym 15 dB co 5 minut przez okres 70 minut. Analizę widm przeprowadzono przy wykorzystaniu specjalistycznych programów spektroskopowych firmy Jagmar (Kraków), LabVIEW 8.5 firmy National Instruments (USA) oraz Origin 2016 firmy OriginLab (USA).

W badaniach EPR wykorzystano modelowe wolne rodniki DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) posiadające niesparowany elektron na atomie azotu (rys. 2) [22]. W wyniku oddziaływań wolnych rodników DPPH z substancją o właściwościach antyoksydacyjnych paramagnetyczne cząsteczki DPPH ulegają redukcji i powstaje ich diamagnetyczna forma pozbawiona niesparowanego elektronu [23, 24]. Oddziaływanie antyoksydantów z wolnymi rodnikami prowadzi do obniżenia amplitudy linii EPR wolnych rodników DPPH [22, 25-27].



Rysunek 2. Struktura chemiczna DPPH [22]

W badaniach rejestrowano widma EPR wolnych rodników DPPH we wzorcowym roztworze etanolemym oraz widma EPR DPPH w kontakcie z testowanymi naparami. Na rysunku 3 przedstawiono widmo EPR wolnych rodników DPPH w roztworze wzorcowym wraz z zaznaczoną amplitudą (A_{DPPH}), którą analizowano w pracy. Podczas pomiarów próbki umieszczano we wnęce rezonansowej spektrometru EPR w kapilarach szklanych o średnicy 1 mm.



Rysunek 3. Widmo EPR DPPH w roztworze etanolemym

B – indukcja pola magnetycznego, A_{DPPH} – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH w roztworze wzorcowym [opracowanie własne]

W pracy wyznaczono względne amplitudy (A/A_{DPPH}) linii EPR wolnych rodników DPPH oddziałujących z naparami jako stosunki amplitudy (A) linii EPR DPPH (będącego w kontakcie z badanym naparem) do amplitudy (A_{DPPH}) wzorcowego roztworu DPPH. Dla roztworu wzorcowego względna amplituda (A/A_{DPPH}) wynosiła 1. Otrzymane wyniki pozwoliły na wyznaczenie kinetyki interakcji wolnych rodników DPPH z badanymi naparami.

W celu potwierdzenia działania antyoksydacyjnego badanych naparów otrzymanych przy różnych stosunkach wagowych surowców roślinnych wyznaczono procent inhibicji wolnych rodników DPPH przez otrzymane napary, korzystając z następującego wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = \left(\frac{A_{\text{DPPH}} - A}{A_{\text{DPPH}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

gdzie: A_{DPPH} – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH w roztworze wzorcowym, A – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanym naparem

Wysoka wartość procentu inhibicji świadczy o dużej aktywności przeciwutleniającej badanych naparów.

4. Wyniki i dyskusja

Wykonane w pracy badania za pomocą spektroskopii EPR naparów uzyskanych z czystka szarego, róży dzikiej, ketmii szczawiowej oraz pokrzywy zwyczajnej wykazały, że testowane napary roślinne posiadają zdolność neutralizowania wolnych rodników. Widma EPR wolnych rodników DPPH oddziałujących z naparami o stosunkach wagowych surowców roślinnych wynoszących odpowiednio 1 : 1 : 1 : 1, 2 : 1 : 1 : 1, 1 : 2 : 1 : 1, 1

: 1 : 2 : 1 oraz 1 : 1 : 1 : 2 zarejestrowane w 5., 35. i 70. minucie oddziaływania przedstawiono na rysunku 4. Wszystkie badane napary po dodaniu do roztworu DPPH powodowały wygaszenie linii EPR wolnych rodników DPPH, co świadczy o ich właściwościach antyoksydacyjnych. Zarejestrowano obniżenie amplitudy linii EPR DPPH. Wraz ze wzrostem czasu oddziaływania wolnych rodników DPPH z badanymi naparami wygaszanie linii EPR było coraz większe (rys. 4).

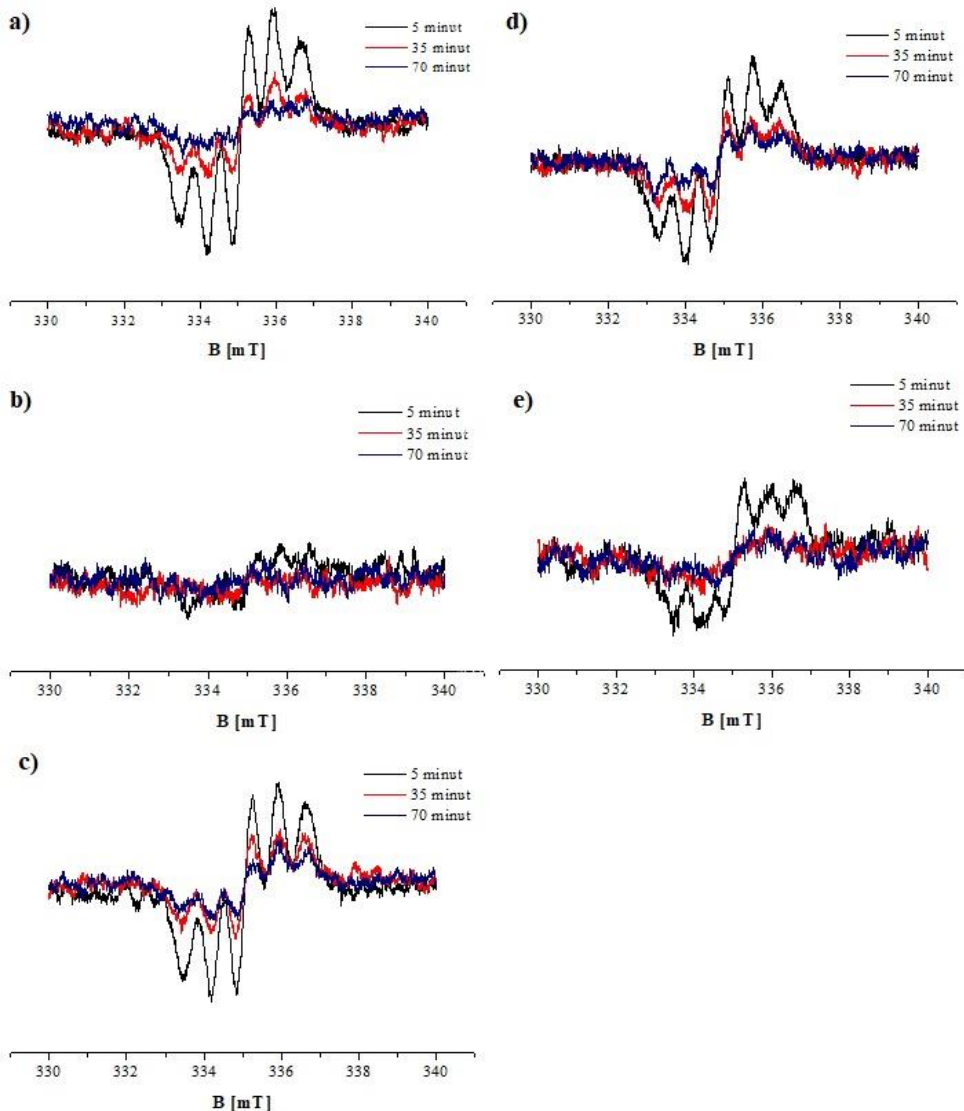
Wykazane w pracy zdolności do neutralizowania wolnych rodników przez badane napary wynikają najprawdopodobniej z obecności w stosowanych surowcach (zielu czystka, owocach róży, kwiatach hibiskusa oraz liściach pokrzywy) licznych związków aktywnych o właściwościach przeciwutleniających. Potwierdzają to między innymi badania prowadzone przez Szeremeta [28], który wykazał wysoki potencjał antyoksydacyjny 12 próbek handlowych czystka szarego, różniących się pochodzeniem (Albania, Grecja, Turcja). Zawartość wyekstrahowanych przez niego substancji fenolowych była powiązana ze zdolnością do wygaszania wolnych rodników DPPH. Czystek szary uznawany jest bowiem za bogate źródło polifenoli, które poprzez zdolność neutralizowania wolnych rodników oraz chelatowanie metali przejściowych wpływają na zmniejszenie peroksydacji lipidów oraz ochronę białek i DNA [6, 28-30]. Na ich zawartość w roślinie, a tym samym zdolność przeciwutleniającą ekstraktów z czystka, wpływ ma wiele czynników, między innymi miejsce pochodzenia rośliny, okres zbioru, część rośliny wykorzystana do przygotowania wyciągów (nasiona, pąki, łodygi i liście) [6, 31].

Właściwości antyoksydacyjne wykazują również ekstrakty z owoców dzikiej róży, które są bogatym źródłem przeciwutleniaczy (witaminy C, tokoferoli, karotenoidów) [32]. Zawierają one również znaczną ilość polifenoli, przy czym ich zawartość oraz aktywność przeciwutleniająca zależy od gatunku rośliny [7, 32]. Telichowska i wsp. [7], badając 4 gatunki owoców dzikiej róży (*Rosa canina* L., *Rosa gallica* L., *Rosa rugosa* L. i *Rosa spinosissima* L.) wykazali, że ekstrakty z owoców *Rosa gallica* L. posiadają najwyższy potencjał przeciwutleniający. Z kolei Kruszewski i wsp. [33] wykazali, że nie tylko gatunek róży, ale również część morfologiczna rośliny oraz technika przetworzenia surowca roślinnego wpływają na jego właściwości antyoksydacyjne. W przypadku róży owocowej najwyższą zdolność do wygaszania wolnych rodników wykazywał sok z owoców, następnie ekstrakt z owoców, syrop z płatków oraz syrop z owoców [33].

Aktywność przeciwutleniającą wykazuje również wodny ekstrakt z kwiatów hibiskusa, co przypisuje się substancjom aktywnym zawartym w jego kwiatach [8, 34]. Zaobserwowano zmniejszenie stresu oksydacyjnego u szczurów poddanych działaniu glutamianu sodu [34].

Podobnie jak w przypadku czystka szarego, róży dzikiej, ketmii szczawiowej, liczne badania ekstraktów z pokrzywy zwyczajnej wskazują, że jest to roślina o silnym działaniu antyoksydacyjnym [5, 9, 35-37]. Działanie to jest prawdopodobnie wynikiem wysokiej zawartości substancji biologicznie czynnych w surowcach roślinnych pozyskanych z pokrzywy. Z jednej strony są to związki fenolowe, które odgrywają istotną rolę w neutralizacji wolnych rodników, z drugiej zaś strony miedź, selen oraz cynk zawarte w pokrzywie są kofaktorami enzymów antyoksydacyjnych [9]. Badanie przeprowadzone na grupie 50 pacjentów z cukrzycą typu 2, którym przez 8 tygodni podawano wodno-alkoholowy ekstrakt z pokrzywy 100 mg/kg/dzień, wykazało wzrost zawartości dysmutazy ponadtlenkowej oraz całkowitej pojemności antyoksydacyjnej [35]. Ekstrakt wodny oraz alkoholowy z owocostanów pokrzywy zwyczajnej powodował również wzrost aktywności

przeciwutleniającej katalazy w komórkach ludzkiej linii monocytarnej nowotworowej (białaczki) [5]. Właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z pokrzywy zwyczajnej wykazano również w przypadku hepatocytów linii komórkowej HepG2 traktowanych fluorkiem sodu [36] oraz u szczurów leczonych czterochlorkiem węgla [37].

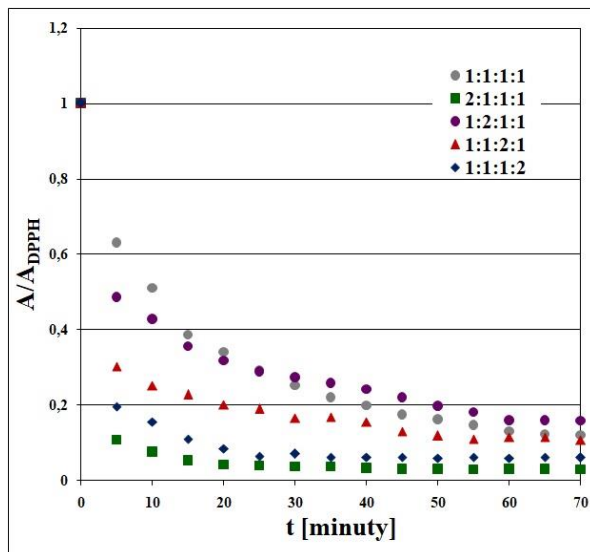


Rysunek 4. Widma EPR wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanymi naparami otrzymanymi z surowców roślinnych o stosunku wagowym 1 : 1 : 1 : 1 (a), 2 : 1 : 1 : 1 (b), 1 : 2 : 1 : 1 (c), 1 : 1 : 2 : 1 (d) oraz 1 : 1 : 1 : 2 (e) zarejestrowane w 5., 35 i 70. minucie oddziaływania [opracowanie własne]

Badane napary są ekstraktami wieloskładnikowymi, w których na właściwości lecznicze wpływ może mieć synergistyczne działanie poszczególnych surowców roślinnych wykorzystanych do otrzymania naparów.

Na rysunku 5 zamieszczono kinetykę oddziaływań wolnorodnikowych naparów otrzymanych przy różnych stosunkach wagowych surowców roślinnych jako zależność

względnej amplitudy (A/A_{DPPH}) linii EPR wolnych rodników DPPH od czasu ich oddziaływania z ekstraktami. W przypadku wszystkich badanych naparów względne amplitudy maleją z czasem oddziaływania, a następnie po stabilizacji oddziaływań pozostają stałe. Oddziaływania z wolnymi rodnikami DPPH uległy najszybszej stabilizacji dla naparów sporządzonych z zieleń czystka, owoców róży, kwiatów hibiskusa oraz liści pokrzywy o stosunku wagowym wynoszącym odpowiednio 2 : 1 : 1 : 1 oraz 1 : 1 : 1 : 2.

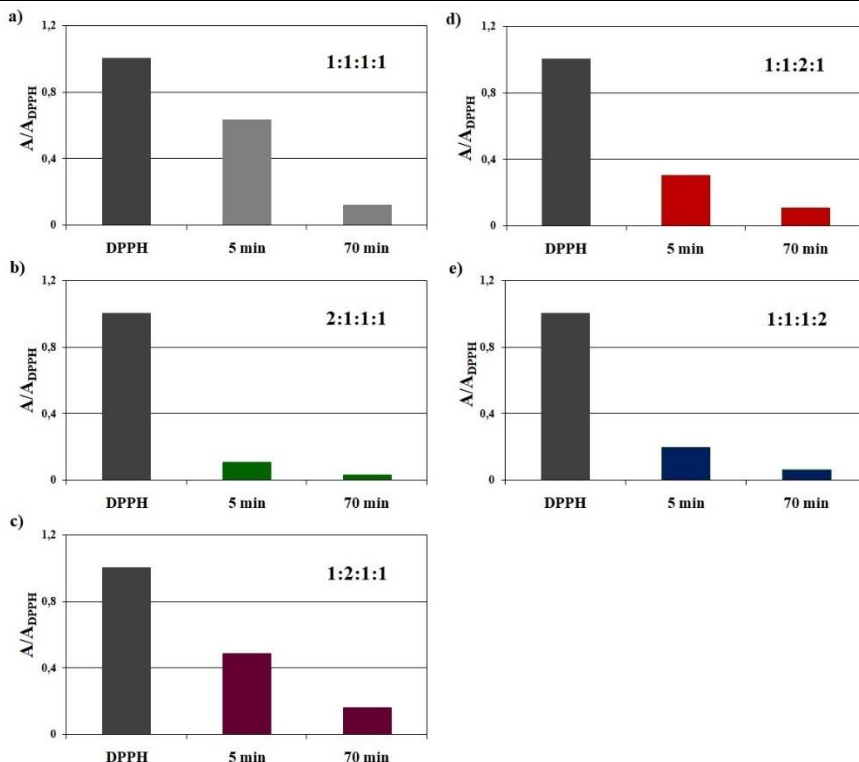


Rysunek 5. Porównanie zmian względnej amplitudy (A/A_{DPPH}) linii EPR wolnych rodników DPPH ze wzrostem czasu (t) oddziaływania z badanymi naparami

A – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH oddziaływających z badanym naparem, A_{DPPH} – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH w roztworze wzorcowym [opracowanie własne]

Dodatkowo w celu lepszego zobrazowania zmian amplitudy widm EPR wolnych rodników DPPH ze wzrostem czasu oddziaływania z naparami na rysunku 6 przedstawiono względne amplitudy (A/A_{DPPH}) wyznaczone w 5. i 70. minucie pomiaru. Względne amplitudy linii EPR wolnych rodników DPPH w 70. minucie oddziaływania wszystkich badanych naparów z DPPH są mniejsze od wartości uzyskanych w 5. minucie ich oddziaływania.

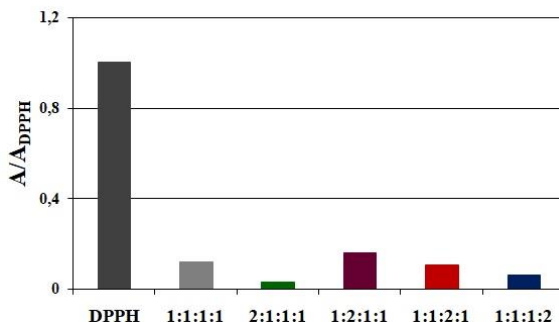
Stosunek wagowy poszczególnych surowców roślinnych wykorzystanych do przygotowania naparów miał wpływ na właściwości przeciwutleniające otrzymanych ekstraktów. Największą zdolność do wygaszania wolnych rodników DPPH posiadał napar przygotowany z zieleń czystka, owoców róży, kwiatów hibiskusa oraz liści pokrzywy w stosunku wagowym 2 : 1 : 1 : 1, dla którego odnotowano najmniejszą wartość minimalnej względnej amplitudy linii EPR wolnych rodników (rys. 7). Do przygotowania powyższego naparu wykorzystano większą ilość (w porównaniu do pozostałych naparów) czystka szarego (0,96 g), który rekomendowany jest przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności jako naturalny środek o działaniu przeciwutleniającym oraz bogate źródło polifenoli [6]. Potencjał antyoksydacyjny metanolowego ekstraktu z czystka jest wysoki ($IC_{50} = 17,75 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$) i porównywalny do kwasu askorbinowego ($IC_{50} = 15,35 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$) [30].



Rysunek 6. Względne amplitudy (A/A_{DPPH}) linii EPR wolnych rodników DPPH w 5. i 70. minucie oddziaływania z badanymi naparami otrzymanymi z surowców roślinnych o stosunku wagowym 1 : 1 : 1 : 1 (a), 2 : 1 : 1 : 1 (b), 1 : 2 : 1 : 1 (c), 1 : 1 : 2 : 1 (d) oraz 1 : 1 : 1 : 2 (e). Dla roztworu wzorcowego względna amplituda wynosi 1

A – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanym naparem, A_{DPPH} – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH w roztworze wzorcowym [opracowanie własne]

Najsłabiej z wolnymi rodnikami oddziaływał napar sporządzony z ziela czystka, owoców róży, kwiatów hibiskusa oraz liści pokrzywy o stosunku wagowym 1 : 2 : 1 : 1, o czym świadczy uzyskana największa wartość minimalnej względnej amplitudy linii EPR wolnych rodników DPPH (rys. 7).

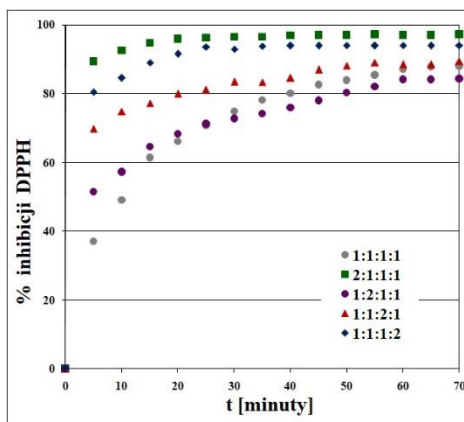


Rysunek 7. Porównanie minimalnych względnych amplitud (A/A_{DPPH}) linii EPR wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanymi naparami. Dla roztworu wzorcowego względna amplituda wynosi 1
A – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanym naparem, A_{DPPH} – amplituda linii EPR wolnych rodników DPPH w roztworze wzorcowym [opracowanie własne]

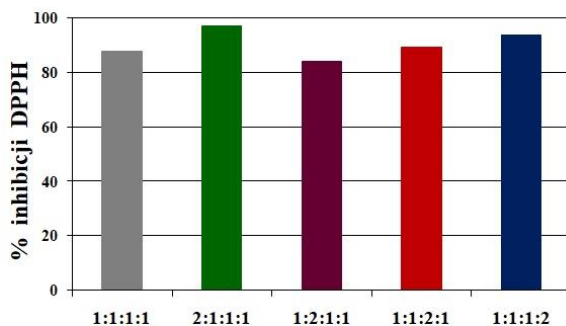
W pracy porównano zależności inhibicji wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanymi naparami roślinnymi od czasu oddziaływania (rys. 8). Inhibicja wolnych rodników DPPH rośnie ze wzrostem czasu oddziaływania z badanymi naparami, a następnie ulega stabilizacji.

Największą wartość maksymalnej inhibicji wolnych rodników DPPH uzyskano dla naparu sporządzonego z mieszaniny ziela czystka, owoców róży, kwiatów hibiskusa i liści pokrzywy o stosunku wagowym składników wynoszącym 2 : 1 : 1 : 1, a najmniejszą wartość w przypadku naparu sporządzonego z surowców roślinnych o stosunku wagowym składników 1 : 2 : 1 : 1 (rys. 9). Wysoka wartość inhibicji świadczy o dużej aktywności przeciwutleniającej badanych naparów.

Ilość poszczególnych surowców roślinnych użytych do przygotowania naparu ma zatem wpływ na aktywność antyoksydacyjną otrzymanych ekstraktów. Potwierdzają to badania prowadzone przez Łomankiewicza i wsp. [38], którzy za pomocą spektrofotometrii UV-Vis i spektroskopii EPR badali oddziaływanie z wolnymi rodnikami naparów uzyskanych ze złożonego surowca roślinnego zawierającego mniszek lekarski, pokrzywę zwyczajną i skrzyp polny w stosunkach wagowych 1 : 1 : 1, 2 : 1 : 1 oraz 1 : 1 : 2. Wykazali oni zależność wielkości efektu wygaszania widma UV-Vis i widma EPR DPPH od składu surowca roślinnego, z którego sporządzono napar. Zdolność ta kształtowała się następująco: 1 : 1 : 1 > 2 : 1 : 1 > 1 : 1 : 2.



Rysunek 8. Porównanie zmian inhibicji [%] wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanymi naparami ze wzrostem czasu (t) oddziaływania [opracowanie własne]



Rysunek 9. Porównanie maksymalnych inhibicji [%] wolnych rodników DPPH oddziałujących z badanymi naparami [opracowanie własne]

Czynnikami, które oprócz składu mieszaniny mogą również wywierać wpływ na oddziaływania ekstraktów z wolnymi rodnikami, są: sposób przygotowania wyciągów, rodzaj użytego rozpuszczalnika, czas parzenia oraz temperatura wytrawiania surowców roślinnych [39-41].

5. Wnioski

Przeprowadzone za pomocą spektroskopii EPR badania wpływu składu surowca roślinnego na oddziaływania z wolnymi rodnikami naparów z czystka szarego, róży dzikiej, ketmii szczawiowej oraz pokrzywy zwyczajnej wykazały, że:

1. Wszystkie badane napary wygaszają linie EPR wolnych rodników DPPH, co świadczy o ich właściwościach przeciwutleniających.
2. Proporcje surowców w mieszaninie wykorzystanej do otrzymania naparu mają wpływ na jego oddziaływania z wolnymi rodnikami DPPH.
3. Napary otrzymane z ziela czystka, owoców róży, kwiatów hibiskusa oraz liści pokrzywy w stosunku wagowym 2 : 1 : 1 : 1 wykazują najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne, a napary uzyskane z surowców roślinnych w stosunku wagowym 1 : 2 : 1 : 1 wykazują najsłabsze właściwości antyoksydacyjne.
4. Otrzymane wyniki mogą być wykorzystane przy ustalaniu składu mieszaniny stosowanej do sporządzenia ekstraktów o silnym działaniu przeciwutleniającym.
5. Spektroskopia EPR może być stosowana do badania wpływu składu surowca roślinnego wykorzystanego do otrzymania naparów na jego oddziaływania z wolnymi rodnikami.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, umowa nr PCN-1-008/N/2/F.

Literatura

1. Bartosz G., *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2021.
2. Stankowski J., Hilczer W., *Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
3. Gączkowska K., *Przydatność wybranych naturalnych antyoksydantów do przedłużenia trwałości masła przechowywanego w warunkach chłodniczych*, praca doktorska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Szczecin 2018, s. 17-27.
4. Czerwiecki L., *Współczesne poglądy na rolę przeciwutleniaczy roślinnych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych*, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 60(3), 2009, s. 201-206.
5. Wolska J., Janda K., Szkyrpan S., Gutowska I., *Wpływ ekstraktów z pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica* L.) na aktywność katalazy w monocytach/makrofagach THP1*, Pomeranian Journal of Life Sciences, 61(3), 2015, s. 315-318.
6. Starzec A., Włodarczyk M., Urbanowicz I., Fecka I., *Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny *Cistus × incanus**, Farmacja Polska, 76(11), 2020, s. 647-664.
7. Telichowska A., Kobus-Cisowska J., Szulc P., Mikołajczak J., Byczkiewicz S., *Zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniająca owoców wybranych gatunków dzikiej róży*, Technika Rolnicza Ogrodnicza Leśna, 6, 2019, s. 18-20.
8. Znajdek-Awiżeń P., Matławska I., *Właściwości lecznicze ketmii szczawiowej – *Hibiscus sabdariffa* L.*, Postępy Fitoterapii, 3, 2011, s. 197-201.
9. Jakubczyk K., Janda K., Szkyrpan S., Gutowska I., Wolska J., *Pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.) – charakterystyka botaniczna, biochemiczna i właściwości prozdrowotne*, Pomeranian Journal of Life Sciences, 61(2), 2015, s. 191-198.

10. Bernacka K., Bednarska K., Starzec A., Mazurek S., Fecka I., *Antioxidant and antiglycation effects of Cistus × incanus water infusion, its phenolic components, and respective metabolites*, *Molecules*, 27(8), 2022, s. 1-22.
11. Pielorz S., Fecka I., Bernacka K., Mazurek S., *Quantitative determination of polyphenols and flavonoids in Cistus × incanus on the basis of IR, NIR and Raman spectra*, *Molecules*, 28(1), 2023, s. 1-12.
12. Saifulazmi N.F., Rohani E.R., Harun S., Bunawan H., Hamezah H.S., Nor Muhammad N.A., Azizan K.A., Ahmed Q.U., Fakurazi S., Mediani A., Sarian M.N., *A review with updated perspectives on the antiviral potentials of traditional medicinal plants and their prospects in antiviral therapy*, *Life*, 12(8), 2022, s. 1-38.
13. Teodorescu A.A., Milea Ș.A., Păcularu-Burada B., Nistor O.V., Andronoiu D.G., Râpeanu G., Stănciuc N., *Customized technological designs to improve the traditional use of Rosa canina fruits in foods and ingredients*, *Plants*, 12(4), 2023, s. 1-16.
14. Tabaszewska M., Najgebauer-Lejko D., *The content of selected phytochemicals and in vitro antioxidant properties of rose hip (Rosa canina L.) tinctures*, *NFS Journal*, 21, 2020, s. 50-56.
15. Igual M., García-Herrera P., Cámara R., Martínez-Monzó J., García-Segovia P., Cámara M., *Bioactive compounds in rosehip (Rosa canina) powder with encapsulating agents*, *Molecules*, 27(15), 2022, s. 1-13.
16. Rizkiyah D.N., Putra N.R., Yunus M.A.C., Veza I., Irianto I., Aziz A.H.A., Rahayuningsih S., Yuniarti E., Ikhwan I., *Insight into green extraction for Roselle as a source of natural red pigments: a review*, *Molecules*, 28(3), 2023, s. 1-15.
17. Rodríguez-Romero J.J., Arce-Reynoso A., Parra-Torres C.G., Zamora-Gasga V.M., Mendivil E.J., Sáyago-Ayerdi S.G., *In vitro gastrointestinal digestion affects the bioaccessibility of bioactive compounds in Hibiscus sabdariffa beverages*, *Molecules*, 28(4), 2023, s. 1-14.
18. Mostafa H.S., *Production of low-tannin Hibiscus sabdariffa tea through D-optimal design optimization of the preparation conditions and the catalytic action of new tannase*, *Food Chemistry X*, 7(17), 2023, s. 1-10.
19. Đurović S., Micić D., Šorgić S., Popov S., Gašić U., Tosti T., Kostić M., Smyatskaya Y.A., Blagojević S., Zeković Z., *Recovery of polyphenolic compounds and vitamins from the stinging nettle leaves: thermal and behavior and biological activity of obtained extracts*, *Molecules*, 28(5), 2023, s. 1-11.
20. Zare M., Esmaeili N., Paolacci S., Stejskal V., *Nettle (Urtica dioica) additive as a growth promoter and immune stimulator in fish*, *Aquaculture Nutrition*, 5, 2023, s. 1-21.
21. Đurović S., Pezo L., Gašić U., Gorjanović S., Pastor F., Bazarnova J., Smyatskaya Y., Zeković Z., *Recovery of biologically active compounds from stinging nettle leaves, part II: Processing of exhausted plant material after supercritical fluid extraction*, *Foods*, 12(4), 2023, s. 1-14.
22. Tirzitis G., Bartosz G., *Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights*, *Acta Biochimica Polonica*, 57(2), 2010, s. 139-142.
23. Zych I., Krzepiłko A., *Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH*, *Chemia, Dydaktyka, Ekologia, Metrologia*, 15, 2010, s. 51-54.
24. Piszcz P., Obrycka J., Głód B., *Badanie właściwości antyoksydacyjnych za pomocą DPPH stosując chromatograficzne rozdzielanie różnych jego form*, *Camera Separatoria*, 10, 2018, s. 5-16.
25. Pilawa B., Ramos P., *Spektroskopia EPR. Ćwiczenia dla studentów analityki medycznej i medycyny*, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice 2017.
26. Zdybel M., Pilawa B., Chodurek E., *Effect of temperature and ultraviolet irradiation on free radical scavenging activity of simvastatin*, *Spectroscopy Letters*, 55(1), 2022, s. 35-43.

27. Jarco S., Pilawa B., Ramos P., *Free radical scavenging activity of infusions of different medicinal plants for use in obstetrics*, *Plants*, 10(10), 2021, s. 1-18.
28. Szeremeta D., *Skład chemiczny rośliny leczniczej Cistus incanus L. (czystek szary) a jej wybrane właściwości biologiczne*, praca doktorska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Katowice 2019.
29. Viapiana A., Konopacka A., Waleron K., Wesolowski M., *Cistus incanus L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet*, *Industrial Crops and Products*, 107, 2017, s. 297-304.
30. Alsabri S.G., Zetrini A.E., Ermeli N.B., Mohamed S.B., Bensaber S.M., Hermann A., Gbaj A., *Study of eight medicinal plants for antioxidant activities*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(8), 2012, s. 4028-4031.
31. Dimcheva V., Karsheva M., *Cistus incanus from Strandja mountain as a source of bioactive antioxidants*, *Plants*, 7(1), 2018, s. 1-14.
32. Rutkowska J., Adamska A., Pielat M., Białek M., *Porównanie składu i właściwości owoców dzikiej róży (Rosa rugosa) utrwalanych metodami liofilizacji i suszenia konwencjonalnego*, *Żywność: Nauka – Technologia – Jakość*, 4(83), 2012, s. 32-43.
33. Kruszewski B., Szymanowski A., Obiedziński M., *Właściwości prozdrowotne produktów z róży owocowej*, [w:] *I Konferencja Naukowa: Róże owocowe w uprawie, przetwórstwie, żywieniu i ochronie zdrowia*, Warszawa 2011, s. 11-12.
34. Gad F., Farouk S., Emam M., *Antiapoptotic and antioxidant capacity of phytochemicals from Roselle (Hibiscus sabdariffa) and their potential effects on monosodium glutamate-induced testicular damage in rat*, *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(2), 2021, s. 2379-2390.
35. Namazi N., Esfanjani A.T., Heshmati J., Bahrami A., Nazemiyeh H., *A systematic review about effects of aerial portions of Urtica dioica (nettle) on some cardiovascular risk factors in diabetes mellitus*, *International Journal of Pharmacology*, 8(5), 2012, s. 306-313.
36. Gutowska I., Jakubczyk K., Dec K., Baranowska-Bosiacka I., Drozd A., Janda K., Wolska J., Lukomska A., Debia K., Chlubek D., *Effect of the extract from nettle (Urtica dioica L.) fruit luster on the synthesis of pro-inflammatory agents in hepatocytes treated with fluoride*, *Fluoride*, 47(2), 2014, s. 109-118.
37. Kanter M., Coskun O., Budancamanak M., *Hepatoprotective effects of Nigella sativa L and Urtica dioica L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats*, *World Journal of Gastroenterology*, 11(42), 2005, s. 6684-6688.
38. Łomankiewicz D., Chwałowska M., Zdybel M., Pilawa B., Chodurek E., *Oddziaływania z wolnymi rodnikami naparów uzyskanych ze złożonego surowca roślinnego zawierającego mniszek lekarski, pokrzywę zwyczajną i skrzyp polny – badania z wykorzystaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego*, [w:] Korpysa J., Niedźwiedzka-Rystwej P., Łabuz A., Bełtowska P. (red.), *Młodzi Naukowcy 2.0*, t. 2, Fundacja Centrum Badań Socjologicznych, Szczecin 2022, s. 133-143.
39. Kłódka D., Bońkowski M., Telesiński A., *Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat rozdrobnionych (Dust i Jannings) w zależności od czasu parzenia*, *Żywność: Nauka – Technologia – Jakość*, 1(56), 2008, s. 103-113.
40. Nowak A., Maciejewska A., Duchnik W., Florkowska K., Klimowicz A., *Wpływ rozpuszczalnika na właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z zielonej herbaty (Camellia sinensis L.)*, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 99(3), 2018, s. 245-251.
41. Krochmal-Marczak B., Kiełtyka-Dadasiewicz A., *Wpływ temperatury wody i czasu parzenia na właściwości antyoksydacyjne naparów z nagietka lekarskiego (Calendula officinalis L.)*, *Herbalism*, 1(4), 2018, s. 43-51.

Wpływ składu surowca roślinnego na oddziaływanie z wolnymi rodnikami naparów z czystka szarego, róży dzikiej, ketmii szczawiowej oraz pokrzywy zwyczajnej – badania metodą EPR

Streszczenie

Czystek szary (*Cistus incanus* L.), róża dzika (*Rosa canina* L.), ketmia szczawiowa (*Hibiscus sabdariffa* L.) oraz pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.) to rośliny powszechnie wykorzystywane w medycynie i kosmologii. Substancje biologicznie czynne zawarte w badanych roślinach wpływają na ich właściwości lecznicze, obejmujące m.in. działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, cytotoksyczne.

Celem pracy jest wyznaczenie oraz porównanie wielkości i kinetyki oddziaływania z wolnymi rodnikami naparów roślinnych uzyskanych z surowców różniących się udziałem wagowym poszczególnych składników. Stosunki wagowe surowców roślinnych wykorzystanych do otrzymania naparów, tj. ziela czystka, owoców róży, kwiatów hibiskusa, liści pokrzywy, wynosiły odpowiednio 1 : 1 : 1 : 1, 2 : 1 : 1 : 1, 1 : 2 : 1 : 1, 1 : 1 : 2 : 1 oraz 1 : 1 : 1 : 2. Zbadano wpływ sposobu preparatyki naparu ze złożonego surowca roślinnego na jego oddziaływanie z modelowymi wolnymi rodnikami DPPH. Badania przeprowadzono za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

Wykazano, że wszystkie badane napary wygaszają linie EPR, co wskazuje na ich antyoksydacyjny charakter. Stosunek wagowy badanych surowców roślinnych wykorzystanych do otrzymania naparów ma wpływ na jego oddziaływanie z wolnymi rodnikami DPPH.

Słowa kluczowe: spektroskopia EPR, wolne rodniki, napar, surowce roślinne

The influence of the composition of the plant material on the interaction with free radicals of infusions of cistus, rose hip, roselle, and stinging nettle – EPR studies

Abstract

Cistus (*Cistus incanus* L.), rose hip (*Rosa canina* L.), roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), and stinging nettle (*Urtica dioica* L.), are the plants commonly used in medicine and cosmetology. Active biological substances containing in the examined plants influence their healing properties, among others: antioxidative, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and cytotoxic interactions.

The aim of this work is to determine and to compare the magnitude and kinetics of interactions with free radicals for the plant infusions obtained from the materials differing in the weight share of individual components. The weight share of the plant materials used to prepare of the infusions, i.e. cistus herb, rose hip fruits, hibiscus flowers, nettle leaves, were 1 : 1 : 1 : 1, 2 : 1 : 1 : 1, 1 : 2 : 1 : 1, 1 : 1 : 2 : 1, and 1 : 1 : 1 : 2, respectively. The effect of the method of preparation of the infusion of complex plant material on its interactions with the model DPPH free radicals was investigated. The examination was performed by the use of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy.

It was stated that the tested infusions quench EPR lines, what indicates their antioxidative character. The weight share of the plant materials used to prepare of the infusions effects their interactions with DPPH free radicals.

Keywords: EPR spectroscopy, free radicals, infusion, plant raw materials

Modyfikacja biomateriałów opatrunkowych związkami pochodzenia roślinnego w celu nadania im właściwości przeciwbakteryjnych

1. Wprowadzenie

Zakażenia bakteryjne ran stanowią poważny problem natury medycznej. Nadmierna kolonizacja bakteryjna rany opóźnia lub całkowicie hamuje proces gojenia, prowadząc do powstania ran przewlekłych. Zasobne w substancje odżywcze środowisko rany stanowi idealne warunki dla rozwoju bakterii, najczęściej *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* czy *Pseudomonas aeruginosa*. Aby ograniczyć rozwój bakterii, coraz częściej stosuje się nowoczesne biomateriały opatrunkowe, które wzbogacone są w substancje o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Ze względu na stale rosnącą antybiotykoodporność drobnoustrojów coraz częściej poszukuje się alternatywnych rozwiązań w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Wiedza o przeciwbakteryjnym działaniu roślin oraz o ich dobroczynnym wpływie na proces gojenia się ran znana jest od starożytności. Wraz z rozwojem medycyny rozwijały się także metody leczenia ran, niemniej jednak substancje pochodzenia naturalnego nadal odgrywają ogromną rolę w tym procesie. Właściwości przeciwbakteryjne roślin wynikają z obecności w nich substancji takich jak surowce śluzowe, garbnikowe, olejki eteryczne czy glikozydy saponinowe. Praca ma na celu przedstawienie biomateriałów opatrunkowych wzbogaconych związkami pochodzenia roślinnego w celu nadania im właściwości przeciwbakteryjnych.

2. Fizjologia procesu gojenia się ran

Skóra jest największym organem ludzkiego ciała, której podstawową funkcją jest zapewnienie ochrony znajdującym się pod nią tkankom. Mikrobiom stanowi naturalną barierę ochronną skóry. Obejmuje bakterie, wirusy, grzyby oraz roztocza, z których większość nie jest szkodliwa, a co więcej – wpływa korzystnie na organizm gospodarza. Mikrobiom wspiera układ immunologiczny, stanowiąc pierwszą linię obrony przed patogenami, które mogą uszkodzić skórę, wywołując różnego rodzaju choroby. Siedlisko skóry jest zmienne, do czego przyczyniają się między innymi gęstość mieszków włosowych oraz morfologia gruczołów potowych czy łojowych. Wpływ mają także czynniki takie jak płeć, wiek czy wykonywany zawód, a także klimat oraz higiena osobista. Mikrobiom skóry charakteryzuje się dużą różnorodnością filogenetyczną, a ponadto wykazuje zmienność wraz z wiekiem gospodarza. *Propionibacterium* spp. izolowane są najczęściej z obszarów łojowych, między innymi gruczołów łojowych, z kolei *Corynebacterium* oraz *Staphylococcus* spp. przeważają w wilgotnych obszarach takich jak nos oraz gardło. Największą różnorodność bakteryjną wykazują natomiast obszary suche skóry. Ich

¹ monikanawara1998@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biotechnologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

² aleksandranurzynska@umlub.pl, Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii, Collegium Universum, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

kolonizację przez mikroflorę moduluje układ odpornościowy. Wiele zaburzeń skórnych, między innymi atopowe zapalenie skóry, trądzik czy rany przewlekłe, powstaje częściowo ze względu na zaburzoną mikroflorę. Zdrowa skóra uczestniczy w utrzymaniu homeostazy, każde jej uszkodzenie powoduje utratę naturalnej równowagi [1].

Proces gojenia rozpoczyna się natychmiast po urazie i składa się z 3 etapów: zapalenia, proliferacji i przebudowy. Podczas fazy zapalenia rana oczyszczana jest z drobnoustrojów. Ma ona miejsce między 1. a 5. dniem od zranienia, a głównymi komórkami biorącymi w niej udział są neutrofile i makrofagi. W fazie proliferacji, która ma miejsce pomiędzy 5. a 21. dniem, tworzone są nowe naczynia krwionośne, macierz pozakomórkowa oraz komórki naskórka. Następuje rozrost tkanki ziarninowej, która wypełnia ubytek. Faza przebudowy rozpoczyna się około 3. tygodnia po urazie i charakteryzuje się przebudową włókien kolagenowych. Powstaje tkanka bliznowata, która jest twardsza i bledsza od otaczającej ją skóry. Faza ta może trwać nawet do 2 lat po urazie [2].

2.1. Zaburzenia procesu gojenia się ran i problem antybiotykooporności

Wilgotne, zasobne w substancje odżywcze środowisko rany stanowi idealne warunki dla rozwoju bakterii, co przyczynia się do spowolnienia lub nawet zahamowania procesu gojenia. A. Gristina w 1987 roku w swojej publikacji zastosowała zwrot „wyścig o powierzchnię” w celu opisanego współzawodnictwa o kolonizację, które ma miejsce na powierzchni skóry, pomiędzy komórkami somatycznymi a komórkami bakteryjnymi [3]. We wspomnianym wyścigu to bakterie mają przewagę, ponieważ są zdolne do kolonizowania biotycznych oraz abiotycznych powierzchni. Rany w dużej mierze są zakażone kilkoma rodzajami patogenów, które przedostają się do łożyska rany z mikrobiomu pacjenta oraz ze środowiska zewnętrznego. Spośród bakterii tlenowych ranę najczęściej zasiedlają: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* oraz *Escherichia coli*. Z kolei do bakterii beztlenowych najczęściej zasiedlających ranę zalicza się *Bacteroides* spp. oraz *Clostridium* spp. Do grzybów najczęściej izolowanych ze środowiska ran należą te z rodziny *Candida* (głównie *C. albicans*) oraz pleśnie (*Aspergillus* spp.). Obecność drobnoustrojów wydłuża czas gojenia. Ponadto obszar rany pozostaje znacznie dłuższej niż fizjologicznie w fazie stanu zapalnego. Do czynników, które podwyższają ryzyko wystąpienia zakażenia, należą skrajne grupy wiekowe, choroby przewlekłe, nowotwory czy zaburzenia odporności [4].

Nadmierna ilość drobnoustrojów w ranie może prowadzić do opóźnienia lub całkowitego zahamowania procesu regeneracji uszkodzonej tkanki. *S. aureus* jest odpowiedzialny za najwyższy odsetek zakażeń szpitalnych [5]. Po raz pierwszy oporność na metycylinę *S. aureus* opisano w połowie XX wieku. Oporność ta jest uwarunkowana mutacją genu *mecA* kodującego białko wiążące penicylinę. Przyczyną narastania lekooporności jest nieprawidłowe stosowanie antybiotyków, a także ich nadużywanie. Zdolność do nabywania oporności na antybiotyki zależy od możliwości bakterii do dostosowania się do presji selekcyjnej i wykształcania coraz to nowych mechanizmów oporności, np. pomp efluksowych umożliwiających wypompowywanie antybiotyku z komórki czy zmiany w składzie oraz funkcji błon komórkowych, które zmieniają swoją przepuszczalność, czy wreszcie inaktywacja antybiotyku przy udziale enzymów. Szacuje się, że *S. aureus* to bakteria kolonizująca około 20-30% populacji ludzkiej, natomiast *S. aureus* oporny na metycylinę kolonizuje około 1,5% ludności, przy czym ryzyko kolonizacji zwiększa się u pacjentów przebywających w szpitalach oraz dializowanych, a także zakażonych

wirusem HIV. Znaczny odsetek zakażeń szpitalnych jest powodowany także przez enterokoki odporne na wankomycynę i bakterie Gram-ujemne odporne na antybiotyki β -laktamowe. W 2011 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organisation*) rozpoczęła program pt. „Przeciwno lekooporności: brak działań dzisiaj, brak leków jutro”. Z racji problemu na światową skalę, jakim jest antybiotykooporność, konieczne jest poszukiwanie nowych związków przeciwdrobnoustrojowych, które mogą stanowić alternatywę względem antybiotyków. Co więcej, w przypadku leczenia ran stosowanie antybiotyków może dodatkowo powodować utrudniony odpływ wydzieliny, hamowanie procesu ziarninowania, mutacje i selekcję szczepów opornych. Zgodnie z raportem WHO z 2019 roku antybiotykooporność stanowi 1 z 10 największych zagrożeń dla zdrowia. Do 2016 roku około 700 tysięcy zgonów rocznie na świecie było spowodowanych infekcjami mikroorganizmami odpornymi na leczenie. Jeśli problem antybiotykooporności nie zostanie rozwiązany, do 2050 roku liczba ta może osiągnąć nawet 10 milionów zgonów w skali roku [6]. Aby ograniczyć rozwój bakterii, coraz częściej stosuje się nowoczesne biomateriały opatrunkowe, które wzbogacone są w substancje o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [7].

3. Przełom w leczeniu ran

Historia materiałów opatrunkowych sięga 2600 lat p.n.e., kiedy to Egipcjanie wykorzystywali miód oraz włókna roślinne do opatrywania ran. Starożytni Grecy zalecali przemywanie ran przegotowaną wodą oraz kwasem octowym i winem. Z kolei Hipokrates wskazywał na potrzebę utrzymywania suchego środowiska rany, co miało działać dobroczynnie na proces gojenia. Zalecana przez niego technika stosowana była aż do XIX wieku [8].

Przełom w leczeniu ran nastąpił poprzez wprowadzenie antyseptyków oraz antybiotyków, co znacząco zmniejszyło śmiertelność wśród pacjentów. Krokiem milowym były również badania mikrobiologiczne, prowadzone między innymi przez Jamesa Younga Simpsona, a także Louisa Pasteura. Georg Winter w połowie XX wieku wykazał, że wilgotne środowisko sprzyja szybszemu procesowi gojenia się rany, co stało się paradigmatem leczenia ran. W ten sposób zmieniło się również podejście do opatrunków oraz sposobu ich projektowania [9].

Obecnie wymagane jest, aby materiały opatrunkowe usuwały nadmiar wysięku i zatrzymywały go w swojej strukturze (ograniczając tym samym możliwość reinfekcji), jednocześnie zapewniając wilgotne środowisko oraz wymianę gazową. Opatrunki nie mogą przywierać do rany, a ich usuwanie nie może powodować maceracji zregenerowanej tkanki, ponadto powinny być one biokompatybilne z tkankami. Wymagana jest także elastyczność opatrunku, komfortowa aplikacja oraz bezpieczny i komfortowy sposób usuwania [10].

3.1. Opatrunki modyfikowane substancjami pochodzenia naturalnego

Wiedza o przeciwbakteryjnym działaniu roślin oraz o ich dobroczynnym wpływie na proces gojenia się ran znana jest od wieków. Indianie stosowali na rany okłady z liści agawy czy tytoniu. Wraz z rozwojem medycyny rozwijały się także metody leczenia ran, ale substancje pochodzenia naturalnego nadal odgrywają ogromną rolę w tym procesie. Właściwości przeciwbakteryjne roślin wynikają z obecności w nich substancji takich jak surowce śluzowe, garbnikowe, olejki eteryczne, kumaryny czy glikozydy saponinowe [11].

3.2. Garbniki

Garbniki to substancje roślinne, które występują między innymi w herbacie, gorzkiej czekoladzie, a także w winach. Już w starożytności znane były ich korzystne właściwości. Egipcjanie używali substancji roślinnych zawierających garbniki do mumifikacji, a z kolei w średniowieczu zaczęto wykorzystywać je do garbowania skór zwierzęcych. Wraz z postępem nauki odkryto, że mają one wiele innych, korzystnych właściwości, między innymi w aspekcie regeneracji leczenia ran. Garbniki wykazują działanie antybakteryjne ze względu na zdolność denaturacji białek powierzchniowych bakterii i innych drobnoustrojów. Dodatkowo wykazują działanie ściągające, co zabezpiecza tkanki przed zakażeniem, a także usprawniają proces odbudowy i regeneracji w przypadku zranień. Co istotne, garbniki wykazują aktywność przeciwwzapalną ze względu na zdolność inaktywacji histaminy i enzymów, które są odpowiedzialne za rozwój wysięków i obrzęków [12].

Rhus chinensis, czyli sumak chiński, to krzew lub małe drzewo liściaste, rozpowszechnione głównie w Chinach oraz Azji Wschodniej. Pozyskiwany jest z niego galas, który stanowi ważny surowiec w tradycyjnej medycynie chińskiej ze względu na to, że zawiera od 50% do 70% garbników, które ulegają hydrolizie. Głównymi składnikami aktywnymi galasu są kwas elagowy, taninowy oraz kwas galusowy. Galas stosowany jest do leczenia biegunek, stanów zapalnych oraz krwotoków ze względu na właściwości ściągające garbników. Wykazuje również cechy bakteriobójcze, denaturując białka powierzchniowe drobnoustrojów [13]. Xiaoying Zhu i wsp. wytworzyli opatrunek na rany z włókna chitozanowego, wzbogacony o garbniki pozyskane z naturalnych ekstraktów garbników galasowych pochodzących z *Rhus chinensis*. Opatrunek otrzymano poprzez połączenie chitozanu i garbników z wodnym roztworem kwasu octowego. W porównaniu z czystym włóknem chitozanowym włókno wzbogacone o garbniki wykazywało niższą hydrofilowość oraz wyższą wytrzymałość na rozerwanie na sucho i na mokro o ponad 40% dzięki jonowemu usieciowaniu chitozanu i garbników. Zahamowanie wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* wynosiło 99,7% w stosunku do materiału kontrolnego (niezawierającego garbników). Co więcej, wykazano także, iż modyfikacja garbnikami powodowała zahamowanie wzrostu *C. albicans* na poziomie 35%. Włókna wzbogacone o garbniki charakteryzowały się gładszą powierzchnią o mniejszej ilości bruzd, co miało wpływ na wytrzymałość mechaniczną opatrunku. Dodatek kwasu garbnikowego zwiększył również stabilność termiczną włókien kompozytowych [14].

Kwas garbnikowy jest polifenolem ekstrahowanym z owoców rośliny *Galla chinensis*. Wykazuje działanie ściągające oraz hemostatyczne i przeciwdrobnoustrojowe. Włączenie kwasu garbnikowego do biomateriałów znacznie poprawia ich efekty terapeutyczne [15]. Na Xu i wsp. [16] wytworzyli wielofunkcyjny kriożel wspomagający gojenie ran, który składał się z kompozytowego rusztowania z chitozanu, żelatyny i kwasu garbnikowego oraz nanocząstek srebra. Grupy hydroksylowe kwasu garbnikowego posiadają zdolność do redukcji jonów srebra i na tej drodze powstają nanocząstki srebra. Z tego względu w opisywanym badaniu posłużono się kwasem garbnikowym, który stanowił naturalny środek redukujący, zastępując tym samym toksyczne reduktory chemiczne. Grupy katecholowe kwasu garbnikowego wykazały ponadto zdolność do łączenia się z nanocząstkami srebra, tworząc wiązania koordynacyjne, jednocześnie zapewniając warstwę ochronną, która opóźniała uwalnianie jonów srebra z opatrunku oraz uniemożliwiała bezpośredni kontakt nanocząstek srebra z komórkami gospodarza. Badania nad kwasem garbnikowym potwierdziły także jego biokompatybilność oraz wysoką bioaktywność, co sprzyjało pro-

liferacji komórek, prowadząc do przyspieszenia procesu gojenia się ran. Czysty kriożel nie wykazywał właściwości antybakteryjnych. Po wprowadzeniu kwasu garbnikowego kriożel zyskał jedynie niewielką zdolność antybakteryjną. Natomiast dodanie nanocząstek srebra spowodowało, że kriożel wykazywał działanie przeciwbakteryjne wobec ponad 99,9% bakterii, zarówno przeciwko *E. coli*, jak i *S. aureus*. W grupie leczonej czystym kriożelem stwierdzono wysoki poziom TNF- α , co wskazywało na obecność stanu zapalnego. W porównaniu z grupą leczoną czystym kriożelem zarówno grupy leczone kriożelem z kwasem garbnikowym, jak i grupy leczone kriożelem z kwasem garbnikowym i nanocząstkami srebra wykazywały niższą ekspresję TNF- α , a także IL-6 oraz IL-1 β , co potwierdza przeciwzapalne działanie kwasu garbnikowego [17].

Jia Xu i wsp. [18] również wykorzystali 15% kwas garbnikowy, w połączeniu z kwasem polisjalowym, do wytworzenia opatrunku hydrożelowego stosowanego do leczenia ran po cięciu cesarskim. Działanie przeciwbakteryjne hydrożelu wobec bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*) i Gram-ujemnych (*E. coli*) potwierdziło, że opatrunek wzbogacony o kwas garbnikowy wykazywał efekt bakteriobójczy wobec 92% bakterii (zarówno *E. coli*, jak i *S. aureus*). Ponadto w trakcie badań zaobserwowano, że wytworzony opatrunek miał bardzo dobrą biokompatybilność. Dodatkowo zaobserwowano, że opatrunek zawierający 15% kwas garbnikowy i kwas polisjalowy przyspieszał proces tworzenia nowych, małych naczyń krwionośnych i mieszków włosowych. Opatrunek przyspieszał proces gojenia ran w odniesieniu do kontroli od 7. dnia po operacji. Już po 21 dniach stosowania opatrunku z dodatkiem kwasu garbnikowego zaobserwowano pełną regenerację skóry na modelu mysim, co potwierdzało dobroczynny wpływ kwasu garbnikowego na proces gojenia się ran, a tym samym zasadność jego użycia w tego rodzaju opatrunkach.

Z kolei Yuqing Guo i wsp. [19] z wykorzystaniem alkoholu poliwinylowego, kwasu garbnikowego oraz nanowłókien aramidowych wytworzyli hydrożel o wysokiej wytrzymałości na rozciąganie oraz właściwościach przeciwbakteryjnych. Kwas garbnikowy nie wykazuje cytotoksyczności względem prawidłowych komórek, ma działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, a także antyoksydacyjne oraz przeciwmutagenne. Ze względu na zdolność tworzenia wiązań wodorowych wykazuje on działanie sieciujące w kompozytach. Badania wykazały, że kwas garbnikowy może tworzyć silne wiązania wodorowe z alkoholem poliwinylowym. Badanie FTIR potwierdziło, że pomiędzy alkoholem poliwinylowym, kwasem garbnikowym i nanowłóknami aramidowymi powstało wiele wiązań wodorowych, które znacznie zwiększyły wytrzymałość hydrożelu na rozciąganie oraz elongacje. Wytrzymałość hydrożelu na rozciąganie wyniosła 2,06 MPa i był on w stanie zwiększyć swoją długość aż o 950%. Co więcej, hydrożel miał zdolność do zapamiętywania kształtu, przez co mógł wracać do swojej pierwotnej struktury oraz długości po namoczeniu go przez 10 sekund w wodzie dejonizowanej o temperaturze 60°C. Zawartość wody w hydrożelu wynosiła ponad 80%, natomiast jego zdolność do pęcznienia wynosiła 300%. Minimalne stężenie hamujące przeciwko *S. aureus* wynosiło 4 mg/ml, natomiast minimalne stężenie bakteriobójcze wobec tego szczepu określono na 12 mg/ml. Dla szczepu *E. coli* stężenia te wynosiły odpowiednio: 2 mg/ml i 8 mg/ml, natomiast dla *P. aeruginosa*: 2 mg/ml i 8 mg/ml. Odmierna wrażliwość na hydrożel wynikała prawdopodobnie z różnic w budowie ścian komórkowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Dong i wsp. [20] wykazali, że kwas garbnikowy hamuje namnażanie się bakterii *S. aureus* oraz tworzenie biofilmu przez niszczenie peptydo-

glikanu i tłumienie ekspresji genów. Aby zbadać cytokompatybilność hydrożelu, badano jego wpływ na żywotność komórek L292 (fibroblasty mysie) przy stężeniu 12 mg/ml za pomocą testu CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*). Stwierdzono, że hydrożel wykazywał bardzo niską cytotoksyczność względem komórek zarówno w 1., 2., jak i 4. dniu, a żywotność komórek przez cały okres trwania badania była wyższa niż 92%. Hydrożel nie wykazywał cytotoksyczności wobec komórek prawidłowych, co stanowiło potwierdzenie jego potencjalnego zastosowania jako opatrunku na rany przewlekłe.

3.3. Olejki eteryczne

Ze względu na dużą różnorodność składu olejki eteryczne wykazują szeroki wachlarz właściwości farmakologicznych. Działają drażniąco na skórę, co wiąże się z obecnością w nich substancji takich jak między innymi limonen, kamfora czy pinen. Ponadto wykazują działanie moczopędne poprzez drażnienie kanalików nerkowych, a także działanie wykrztuśne, wpływając drażniąco na błonę śluzową oskrzeli, co wiąże się z produkcją zwiększonej ilości śluzu. Co więcej, działają przeciwzapalnie, za co odpowiadają azuleny obecne w niektórych olejkach. Olejki eteryczne wykazują także działanie przeciwrabacze, spazmolityczne i antyseptyczne, ponadto wykazują efekt bakteriobójczy poprzez zdolność do hamowania powstawania biofilmu, blokowania biosyntezy bakteryjnych białek i kwasów nukleinowych, a także blokowanie biosyntezy ich ściany komórkowej [21].

Lu Wang i wsp. [22] wykorzystali bezkomórkową macierz skórną wzbogaconą o kwercetynę oraz olejek z drzewa herbacianego do wytworzenia nowoczesnego opatrunku na rany. Bezkomórkowa macierz skórną przyspieszała proces gojenia się ran, lecz nie wykazywała działania antibakteryjnego. Ponadto charakteryzowała się bardzo słabą wytrzymałością mechaniczną. Po wzbogaceniu matrycy o kwercetynę oraz olejek z drzewa herbacianego wykazywała lepszą stabilność termiczną i mechaniczną oraz silne właściwości przeciwbakteryjne, powodując zahamowanie wzrostu do 80% bakterii *E. coli* oraz *S. aureus* w badaniu *in vitro*. Badanie *in vivo* potwierdziło, że opatrunek ten znacznie przyspieszał proces gojenia się ran. Już po tygodniu rana leczona opatrunkiem zawierającym kwercetynę i olejek eteryczny z drzewa herbacianego zmniejszyła się o 65%, w przypadku grupy kontrolnej proces ten zachodził znacznie wolniej. Po 2 tygodniach niezagojona powierzchnia skóry stanowiła tylko 23% rany początkowej, natomiast w grupie kontrolnej obszar ten przekraczał 50%. Po 3 tygodniach leczenia opatrunkiem zawierającym olejek eteryczny rana uległa niemal całkowitemu zagojeniu. Opatrunek zawierający bezkomórkową macierz skórną wzbogaconą o kwercetynę oraz olejek z drzewa herbacianego był biokompatybilny i wykazywał pozytywny wpływ na gojenie się rany. Ekspresja czynnika wzrostu w grupie, którą leczono opatrunkiem zawierającym kwercetynę oraz olejek herbaciany, była znacznie wyższa niż w grupie leczonej opatrunkiem zawierającym jedynie bezkomórkową macierz skórną. W trakcie badań *in vivo* na modelu mysim już po 1 tygodniu stosowania opatrunku światło rany zmniejszyło się o 50%. Po 2 tygodniach stosowania opatrunku wzbogaconego o olejek eteryczny z oregano rana stanowiła jedynie 23% swojej początkowej powierzchni. Natomiast po 3 tygodniach rana uległa niemal całkowitemu zagojeniu. Wyniki opisywanych badań potwierdziły, że opatrunek na bazie bezkomórkowej macierzy skórnej zawierający olejek eteryczny oraz kwercetynę miał dobre właściwości przeciwbakteryjne, biokompatybilność oraz zdolność do sprężenia zwrotnego, a także regulowania wzrostu komórek

i tkanek, więc z powodzeniem może być w przyszłości wykorzystywany do produkcji materiałów przyspieszających gojenie się ran.

Olejek eteryczny z oregano, którego głównym składnikiem jest karwakrol, jest obiecującym naturalnym związkiem o działaniu przeciwbakteryjnym, antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym. Jednakże miejscowe podawanie tego olejku na skórę może powodować podrażnienia i wiązać się z mniejszą skutecznością terapeutyczną. Ponadto jest to związek lotny, co warunkuje jego niestabilność [23]. Z tego powodu Atta ur Rehman Khan i wsp. [24] zakapsułkowali olejek z oregano w membranie z nanowłókien poli(L-laktydu-ko-kaprolaktanu) (PLCL) fibroiny jedwabiu. Badania wykazały, że tak zakapsułkowany olejek eteryczny jest wysoce aktywny zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Wykazano, że olejek eteryczny z oregano o stężeniu 5% jest zdolny do całkowitego zahamowania wzrostu bakterii. Przeprowadzone badania potwierdziły, że membrana zawierająca olejek eteryczny z oregano jest w stanie nie tylko przyspieszyć obkurczanie się rany, ale także poprawić jakość gojenia, co potwierdzono analizą histologiczną. Działanie bakteriobójcze membrany przy 5% stężeniu olejku eterycznego z oregano wynosiła odpowiednio 100% i 98,02% dla *S. aureus* i *E. coli* w porównaniu do nanowłókna, które nie zawierało olejku eterycznego i które nie wykazywało żadnego działania przeciwbakteryjnego (próbę kontrolną). Fakt ten potwierdza, że aktywność przeciwbakteryjna była indukowana tylko przez olejek eteryczny z oregano. W trakcie badania *in vivo* na modelu mysim w ciągu pierwszych 10 dni w grupie leczonej opatrunkiem zawierającym olejek eteryczny rana uległa zmniejszeniu o 91% w stosunku do swojej pierwotnej wielkości. Wzbogacenie opatrunku o olejek eteryczny z oregano przyniosło następujące korzyści: nastąpiło szybsze tworzenie się ziarniny, ponadto zaobserwowano szybszą reepitelializację oraz sprawniejszy proces angiogenezy, a także bardziej uporządkowane w stosunku do grupy kontrolnej odkładanie się kolagenu. Ze względu na swą biokompatybilność, biodegradowalność, brak cytotoksyczności, a przede wszystkim pozytywny wpływ na proces gojenia się ran i właściwości bakteriobójcze – olejek z oregano może być stosowany w produkcji materiałów opatrunkowych na trudno gojące się rany.

Zingiber officinale, znany powszechnie jako imbir, od lat stosowany jest w medycynie tradycyjnej ze względu na właściwości antyoksydacyjne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne oraz przeciwzapalne. Imbir jest bogaty między innymi w celulozę, skrobię oraz hemicelulozę, a także gingerole, zingiberen i shogaole. Olejek eteryczny z imbiru, który składa się głównie z geranialu, również wykazuje znaczące działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybiczne [25]. Squinka i wsp. [26] wykorzystali pozostałości imbiru z produkcji soków jako surowiec do przygotowania nanowłókien wzbogacających hydrożel o wielofunkcyjnych właściwościach do stosowania na rany. Jedną z najważniejszych właściwości hydrożeli będących opatrunkami na rany jest zdolność do wchłaniania wody, ponieważ wilgotne środowisko umożliwia migrację komórek nabłonka oraz leukocytów, a także dystrybucję do łożyska rany czynników wzrostu, ułatwiając i przyspieszając w ten sposób proces gojenia. Hydrożel wzbogacony o włókna imbiru wykazywał zdolność wchłaniania wody wynoszącą 62-krotność swojej suchej masy, przez co można go porównać do superchłonnego hydrożelu. Warto wspomnieć, że hydrożel ten został przygotowany wyłącznie z naturalnego polimeru, bez użycia środka sieciującego czy spęczniającego. Zatem wysoka absorpcja wody była związana z naturalnym składem imbiru, bogatego między innymi w hemicelulozę. Wykazano również, że

hemiceluloza przyczynia się do zwiększenia wytrzymałości i sztywności kompozytów. Wytrzymałość i właściwości rozciągające są ważne w przypadku opatrunków na rany, materiał opatrunkowy nie powinien pękać w trakcie nakładania, noszenia czy zdejmowania. Włókna imbirowe zostały poddane obróbce alkalicznej, przez co znacznie zwiększyła się ich zdolność absorpcji płynów, a także poprawiły się właściwości mechaniczne. Wytrzymałość na rozciąganie osiągnęła $2,1 \text{ MPa} \pm 0,2 \text{ MPa}$, natomiast moduł sprężystości wyniósł $15,3 \text{ MPa} \pm 0,3 \text{ MPa}$. Nanowłókna zostały poddane utlenianiu za pośrednictwem rodnika 2,2,6,6-tetrametylopiperidyno-1-oksyłowego. Ocena cytokompatybilności opatrunku nie wykazała znaczącego wpływu na proliferację ludzkich fibroblastów w badaniu *in vitro*. W celu zapewnienia działania przeciwbakteryjnego opatrunek został wzbogacony o olejek eteryczny z imbiru. Aktywność przeciwdrobnoustrojową nanowłókien imbirowych badano wobec *S. aureus* i *E. coli* na agarze (Mueller Hinton Agar). Funkcjonalizacja włókien przy użyciu olejku eterycznego z imbiru poprawiła działanie przeciwdrobnoustrojowe, a brak wzrostu bakterii sugerował, że hydrożel wykazywał efekt bakterio-bójczy. Co więcej, również Abrial i wsp. [27] w prowadzonych badaniach nad folią wzbogaconą o nanowłókna z imbiru odnotowali w trakcie badania *in vitro* dobre działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko różnym gatunkom bakterii, a także grzybów. Folia z nanowłókna imbirowego była skuteczna zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, a także grzybów, ze strefami zahamowania wzrostu odpowiednio od $5,01 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$ do $10,1 \text{ mm} \pm 0,9 \text{ mm}$.

3.4. Saponiny

Saponiny to związki należące do glikozydów, występujące w ponad 500 gatunkach roślin. Można je znaleźć m.in. w mydlnicy lekarskiej, lukrecji, nagietku czy aloesie. W tradycyjnej medycynie chińskiej saponiny odgrywają szczególną rolę, są bowiem kluczowymi składnikami w wielu lekach pochodzenia roślinnego. Szerokie spektrum zastosowania saponin związane jest z obecnością w ich budowie chemicznej aglikonowego szkieletu, który może ulegać licznym modyfikacjom. Saponiny mają zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego, pieniąc się w wodzie podobnie jak mydło, od którego pochodzi ich nazwa (z łac. *sapo* – mydło). Saponiny wykazują szereg właściwości farmakologicznych i biologicznych, w tym działanie immunomodelujące, hemolityczne, wykrztuśne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i przeciwgrzybicze. Ponadto saponiny mają zdolność do wiązania się z ergosterolem ścian komórkowych bakterii, wykazując działanie bakteriobójcze. Raul Barbosa i wsp. [28] wytworzyli opatrunek na rany zawierający kompozytowe nanowłókna na bazie ekstraktu z aloesu. Opatrunek został wykonany metodą *forcespinning* z biodegradowalnych materiałów, takich jak ekstrakt z *Aloe vera*, którego sok w 3% składa się właśnie z saponin oraz pullulanu, chitozanu i kwasu cytrynowego. Kwas cytrynowy został dodany w celu usieciowania cząsteczek polimeru i wzmocnienia stabilności, dzięki czemu opatrunek nie ulegał rozpuczeniu w środowisku wodnym. Zaobserwowano również, że wzrost stężenia ekstraktu z aloesu powodował wzrost średnicy nanowłókien, co dodatkowo wzmocniało ich wytrzymałość mechaniczną. Porowata struktura opatrunku umożliwiała wchłanianie nadmiaru krwi i wysięków, a także zapewniała ochronę przed infekcjami. W trakcie badań *in vitro* wobec szczepów *E. coli* nanowłókna, zawierające ekstrakt z aloesu o stężeniu odpowiednio: 20%, 60% i 100%, wykazały działanie przeciwbakteryjne, dając strefy zahamowania wzrostu: 1 mm, 2 mm i 2,5 mm. Wyniki te ilustrują, że właściwości antybakteryjne

włóknin kompozytowych rosną wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu z aloesu, potwierdzając jednocześnie jego przeciwbakteryjne właściwości.

Oana Maria Ionescu i wsp. [29] zastosowali naturalne składniki aktywne, takie jak propolis, miód manuka, insulinę, L-argininę i napar z nagietka lekarskiego, włączając je do membran z elektroprzędzonych nanowłókien na bazie kwasu hialuronowego/poli(tlenku etylenu) w celu stworzenia innowacyjnych biomateriałów do opatrywania ran. Badanie *in vitro* wykazało, że membrany z nanowłókien z propolisem i nagietkiem lekarskim charakteryzowały się najlepszą aktywnością antyoksydacyjną, cytokompatybilnością, a także miały najsilniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwko *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa*. Strefy zahamowania wzrostu wynosiły odpowiednio: 12 mm, 15 mm i 10 mm, co stanowiło połowę strefy inhibicji powodowanej działaniem ciprofloksacyny, stosowanej jako kontrola. Jeśli chodzi o ocenę działania przeciwgrzybiczego, żadna z badanych prób nie wykazała efektu bójczego. Co więcej, zaobserwowano, że nanowłókna zawierające ekstrakt z nagietka stymulowały proliferację prawidłowych fibroblastów o 21% przy stężeniu 250 µg/ml i o 37% przy stężeniu 500 µg/ml. Wzbogacenie opatrunku o ekstrakt z nagietka nadało mu silną aktywność antyoksydacyjną oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe, a ponadto zapewniło cytokompatybilność. Porowata struktura biomateriału umożliwiła wchłanianie nadmiaru krwi i wysięków oraz zapewniała ochronę przed infekcją oraz dobrą stabilność termiczną.

3.5. Kumaryny

Kumaryny to wtórne metabolity roślin z rodzin takich jak np. *Rutaceae* i *Umbelliferae*. Pod względem chemicznym należą do klasy benzo- α -pironów. Kumaryny podzielić można na 6 klas: furanokumaryny, dihydrofuranokumaryny, fenylokumaryny, piranokumaryny, kumaryny podstawione pironem oraz bikumaryny. Kumaryny wykazują aktywność przeciwzapalną, przeciwbakteryjną, przeciwgruźliczą i przeciwwirusową. Ponadto działają antyoksydacyjnie i przeciwzakrzepowo. Stosowane są jako środki przeciwbólowe i uspokajające. Kumaryny badane są również pod kątem potencjalnego działania przeciwnowotworowego. W przyszłości mogą stanowić środki używane w celu łagodzenia objawów choroby Alzheimera ze względu na zdolność do hamowania metabolizmu acetylocholinoesterazy (przyczyniając się tym samym do zwiększania jej poziomu) [30].

Nostrzyk żółty (*Melilotus officinalis*) to roślina należąca do rodziny bobowatych, zawierająca składniki antyoksydacyjne, takie jak 7-hydroksykumaryna, flawonoidy oraz glukuronid oleananu. Ponadto wyciągi z ziela nostrzyka, ze względu na znaczną zawartość alantoiny, stymulują proces ziarninowania, przez co wpływają na regenerację uszkodzonej skóry, a w konsekwencji na szybsze gojenie ran. Zawarta w ziele nostrzyka melilotigenina działa przeciwzapalnie, a także zwiększa napięcie ścian naczyń żylnych. Ze względu na opisane właściwości ziele nostrzyka może być stosowane w celu zmniejszania stanu zapalnego, regulacji układu odpornościowego oraz poprawy stanu unaczynienia skóry. Mohammad Shahrusvand i wsp. [31] wytworzyli metodą elektroprzędzenia opatrunek na bazie polikaprolaktonu oraz chitozanu, wzbogacony o ekstrakt z ziela nostrzyka *Melilotus officinalis*. Dodatek wyciągu z nostrzyka do matrycy elektroprzędzonej przyczynił się do zwiększenia jej wytrzymałości na rozciąganie, która wyniosła 29,23 MPa \pm 0,19 MPa, a także znacznie zwiększył sprężystość opatrunku oraz jego właściwości hydrofilowe. Opatrunek wzbogacony o ekstrakt z nostrzyka wykazywał aktywność przeciwbakteryjną

przeciw bakteriom Gram-dodatnim *Bacillus* i Gram-ujemnym *Shigella*. W trakcie badań *in vitro* potwierdzono, że opatrunek wzbogacony o ekstrakt z nostrzyka żółtego nie powodował cytotoksyczności wobec prawidłowych komórek, co więcej – zwiększał ich liczbę. Opisany opatrunek spełnia wszelkie wymagania ku temu, aby być odpowiednim kandydatem do testów *in vivo* do zastosowań w medycynie regeneracyjnej, zwłaszcza do produkcji opatrunków na rany.

Centella asiatica (wąkrota azjatycka) jest stosowana w tradycyjnej medycynie chińskiej do leczenia skóry ze względu na właściwości przeciwzapalne oraz przeciwbakteryjne. Głównymi związkami odpowiedzialnymi za jej korzystne właściwości są triterpenoidy, między innymi azjatykozzyd, kwas azjatycki oraz kwas madekasowy [32]. Badanie prowadzone przez Yao Chun-Hsu i wsp. [33] wykazało, że ekstrakt z wąkroty hamuje rozwój drobnoustrojów, takich jak *S. aureus*, *E. coli* oraz *P. aeruginosa*, które stanowią patogeny najczęściej zasiedlające środowisko ran. Testy *in vitro*, które prowadzili Huwaida Abdul Azis i wsp. [34], z użyciem ludzkich fibroblastów oraz keratynocytów wykazały, że ekstrakt z *Centella asiatica* przyspiesza tempo migracji komórek, tym samym przyspieszając proces gojenia się ran. Rina Afiani Rebia i wsp. [35] wykorzystali substancje pochodzenia roślinnego o działaniu przeciwbakteryjnym, takie jak ekstrakt z *Centella asiatica*, propolis oraz hinokitiol do produkcji nowoczesnego opatrunku na rany, włączając je do polimeru poli[(R)-3-hydroksymaślanu-ko-(R)-3-hydroksyheksanianu], z zastosowaniem procesu elektroprzędzenia. Propolis, inaczej kit pszczeli, jest to brunatna substancja, która powstaje przez zmieszanie żywicy zebranej z pąków i kory drzew z wydzielinami gruczołów pszczół miodnych oraz z woskiem pszczelim. Głównymi związkami chemicznymi zawartymi w propolisie są kwasy aromatyczne oraz związki fenolowe, zwłaszcza kwas fenolowy i flawonoidy. Propolis wykazuje bardzo duży potencjał do usprawniania procesu gojenia się ran. Ma także właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne oraz przeciwzapalne [36]. Hinokitiol jest naturalnym składnikiem, który jest izolowany z cyprysu japońskiego oraz czerwonego cyprysu zachodniego. Jest znany z działania hamującego wzrost bakterii, grzybów i owadów [37]. Badania nad hinokitiolem, prowadzone przez Shih Yin-Hua i wsp. [38] pod kątem zastosowania go jako potencjalnego leku do kanałowego leczenia zębów, udowodniły jego silne działanie przeciwbakteryjne wobec *S. aureus*. Badanie *in vitro* wykazało, że nanowłókna kompozytowe zawierające naturalne produkty o działaniu antybakteryjnym były inhibitorami wzrostu dla bakterii *E. coli* oraz *S. aureus*. Badania wykazały również, że hinokitiol i propolis charakteryzują się najwyższym efektem bakteriobójczym, natomiast ekstrakt z wąkroty azjatyckiej i hinokitiol znacznie szybciej uwalniają się z nanowłókien w porównaniu z propolisem. Aktywność przeciwbakteryjną czystych nanowłókien, nanowłókien kompozytowych z wąkrotą azjatycką, propolisem, a także hinokilem oceniano metodą strefy zahamowania wzrostu wobec bakterii *S. aureus* i *E. coli*. Działanie przeciwdrobnoustrojowe nanowłókien oceniano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Nanowłókna wzbogacone o ekstrakt z wąkroty azjatyckiej wykazywały dosyć niską aktywność bakteriobójczą wobec *S. aureus*, dla którego strefa zahamowania wzrostu wyniosła 7,7 mm, nie wykazywały natomiast działania przeciwbakteryjnego wobec *E. coli*. Średnica strefy zahamowania nanowłókien wzbogaconych o propolis wynosiła 18,3 mm dla *S. aureus* i 17,3 mm dla *E. coli*. Zeighampour i wsp. [39] w trakcie prowadzonych badań dowiedli, że ekstrakt propolisu wykazuje lepszy efekt przeciwbakteryjny wobec

bakterii Gram-ujemnych niż wobec bakterii Gram-dodatnich ze względu na inną budowę ściany komórkowej bakterii. Nanowłókna kompozytowe wzbogacone o hinokitiol wykazały dużą strefę zahamowania wzrostu, która dla *S. aureus* wyniosła 25,7 mm, natomiast dla *E. coli* – 29,7 mm. Ponadto w trakcie prowadzonego badania wykazano, że dodatek 7% propolisu oraz wyciągu z wąkroty azjatyckiej zwiększył wytrzymałość na rozciąganie czystych nanowłókien z 8,00 MPa \pm 0,71 MPa do 16,35 \pm 1,78 MPa.

4. Podsumowanie

Opatrunki stosowane w leczeniu trudno gojących się ran przewlekłych w dalszym ciągu stanowią przedmiot intensywnych badań naukowych. Wzbogacanie ich o naturalne substancje wykazujące działanie przeciwdrobnoustrojowe stanowi rozwiązanie w zwalczaniu mikroorganizmów zasiedlających łożysko rany, ograniczając tym samym używanie syntetycznych związków przeciwdrobnoustrojowych, w tym antybiotyków. Inkorporacja związków pochodzenia roślinnego do biomateriałów opatrunkowych niesie ze sobą wachlarz korzyści – wybierane są te, które charakteryzują się biokompatybilnością i biodegradowalnością, nie wykazujące cytotoksyczności względem prawidłowych komórek, a dodatkowo posiadające liczne właściwości prozdrowotne: bakteriobójcze, przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne. Właściwości te czynią związki pochodzenia roślinnego skutecznymi i bezpiecznymi kandydatami na środki wzbogacające materiały opatrunkowe na rany.

Literatura

1. Sorg H., Tilkorn D.J., Hager S., Hauser J., Mirastschijski U., *Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts*, Eur Surg Res., 2017.
2. Karpiński R., Górniak B., Maksymiuk J., *Biomedyczne zastosowania polimerów – materiały opatrunkowe*, Olszówka M., Maciąg K. (red.), *Nowoczesne trendy w medycynie*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2015, s. 18-32.
3. Gristina A., *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*, Science, 1987, s. 1588-1595.
4. Stanisław Dąbrowiecki, *Fizjologia i patofizjologia procesu gojenia ran*, Polska Medycyna Paliatywna, 2(4), 2003.
5. Alharbi N.S., *Screening of antibiotic-resistant staphylococci in the nasal cavity of patients and healthy individuals*, Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, s. 100-105.
6. Jatoi A.W., Ogasawara H., Kim I.S., Ni Q.Q., *Polyvinyl alcohol nanofiber based three phase wound dressings for sustained wound healing applications*, Materials Letters, 2019, s. 168-171.
7. Mouès C.M., Heule F., Legerstee R., Hovius S.E.R., *Five Millennia of Wound Care Products. What is New? A Literature Review*, Wound Management & Prevention, 2009, s. 16-18.
8. Vowden K., Vowden P., *Wound dressings: principles and practice*, Surgery 2017, s. 489-494.
9. Hu S., Cai X., Qu X., Yu B., Yan C., Yang J., Li F., Zheng Y., Shi X., *Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers*, International Journal of Biological Macromolecules, 2019, s. 1320-1330.
10. Archana H., Geetha Bose V., *Evaluation of phytoconstituents from selected medicinal plants and its synergistic antimicrobial activity*, Chemosphere, 2022.
11. Shindo H., Takahagi S., Mihara S., Tanaka T., Ishii K., Hide M., Suzuki S., Kanatani H., Yano S., *Efficacy of sweat-antigen-inactivating skin care products on itching of patients with atopic dermatitis*, Arerugi, 2011, s. 33-42.

12. Kaczmarek B., Wekwejt M., Nadolna K., Owczarek A., Mazur O., Pałubicka A., *The mechanical properties and bactericidal degradation effectiveness of tannic acid-based thin films for wound care*, J Mech Behav Biomed Mater, 2020, s. 103916.
13. O'Neill J., *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*, Review on Antimicrobial Resistance, 2019, s. 4-8.
14. Kaczmarek B., Wekwejt M., Nadolna K., Owczarek A., Mazur O., Pałubicka A., *The mechanical properties and bactericidal degradation effectiveness of tannic acid-based thin films for wound care*, J Mech Behav Biomed Mater, 2020.
15. Zhu X., Hou X., Ma B., Xu H., Yang Y., *Chitosan/gallnut tannins composite fiber with improved tensile, antibacterial and fluorescence properties*, Carbohydr Polym, 2019, s. 115311.
16. Yeo J., Lee J., Yoon S., Kim W.J., *Tannic acid-based nanogel as an efficient anti-inflammatory agent*, Biomater Sci, 2020 s. 1148-1159.
17. Xu N., Yuan Y., Ding L., Li J., Jia J., Li Z., He D., Yu Y., *Multifunctional chitosan/gelatin and tannic acid cryogels decorated with in situ reduced silver nanoparticles for wound healing*, Burns Trauma, 2022.
18. Xu J., Li Y., Chen Y., Wang L., Liao M., *Preparation and characterization of a novel polysialic acid/gelatin composite hydrogels cross-linked by tannic acid to improve wound healing after cesarean section dressing*, J Biomater Sci Polym Ed, 2021, s. 1927-1943.
19. Guo Y., An X., Fan Z., *Aramid nanofibers reinforced polyvinyl alcohol/tannic acid hydrogel with improved mechanical and antibacterial properties for potential application as wound dressing*, J Mech Behav Biomed Mater, 2021, s. 104452.
20. Dong G., Liu H., Yu X., Zhang X., Lu H., Zhou T., Cao J., *Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against Staphylococcus aureus*, Natural Product Research, 2018, s. 2225-2228.
21. Nurzyńska-Wierdak R., *Terapeutyczne właściwości olejków eterycznych*, Annales Horticulturae, 25(1), 2015.
22. Wang L., Gong J., Dan Y., Huang Y., Dan N., Dan W., *Preparation and characterization of antibacterial porcine acellular dermal matrices with high performance*, ACS Omega, 2020, s. 20238-20249.
23. Khan A.U.R., Huang K., Jinzhong Z., Zhu T., Morsi Y., Aldalbahi A., El-Newehy M., Yan X., Mo X., *PLCL/Silk fibroin based antibacterial nano wound dressing encapsulating oregano essential oil: Fabrication, characterization and biological evaluation*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2020.
24. Khan A.U.R., Huang K., Jinzhong Z., Zhu T., Morsi Y., Aldalbahi A., El-Newehy M., Yan X., Mo X., *PLCL Silk fibroin based antibacterial nano wound dressing encapsulating oregano essential oil: Fabrication, characterization and biological evaluation*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020.
25. Wang X., Shen Y., Thakur K., Han J., Zhang J.G., Hu F., Wei Z.J., *Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus*, Molecules, 2020.
26. Squinca P., Berglund L., Hanna K., Rakar J., Junker J., Khalaf H., Farinas C.S., Oksman K., *Multifunctional ginger nanofiber hydrogels with tunable absorption: the potential for advanced wound dressing applications*, Biomacromolecules, 2021, s. 3202–3215.
27. Abrial H., Arikxa J., Mahardika M., Handayani D., Aminah I., Sandrawati N., Sugiarti E., Muslimin A.N., Rosanti S.D., *Effect of heat treatment on thermal resistance, transparency and antimicrobial activity of sonicated ginger cellulose film*, Carbohydr Polym, 2020.
28. Barbosa R., Villarreal A., Rodriguez C., De Leon H., Gilkerson R., Lozano K., *Aloe vera extract-based composite nanofibers for wound dressing applications*, Mater Sci Eng C, 2021.
29. Ionescu O.M., Mignon A., Iacob A.T., Simionescu N., Confederat L.G., Tuchilus C., Profire L., *New hyaluronic acid/polyethylene oxide-based electrospun nanofibers: design, characterization and in vitro biological evaluation*, Polymers, 2021.

30. Malinowska M., Bielawska K., Cyuńczyk M., *Wpływ kumaryny na organizm człowieka*, Bromat. Chem. Toksykol, 2014.
31. Shahrusvand M., Haddadi-Asl V., Shahrusvand M., *Step-by-step design of poly (ϵ -caprolactone) /chitosan/Melilotus officinalis extract electrospun nanofibers for wound dressing applications*, Int J Biol Macromol, 2021.
32. Gohil K.J., Patel J.A., Gajjar A.K., *Pharmacological review on Centella asiatica: A Pharmacological Review on Centella asiatica: A Potential Herbal Cure-all*, Indian J Pharm Sci, 2010.
33. Yao C.H., Yeh J.Y., Chen Y.S., Li M.H., Huang C.H., *Wound-healing effect of electrospun gelatin nanofibres containing Centella asiatica extract in a rat model*, J. Tissue Eng, 2017.
34. Azis H.A., Taher M., Ahmed A.S., Sulaiman W.M.A.W., Susanti D., Chowdhury S.R., Zakaria Z.A., *In vitro and in vivo wound healing studies of methanolic fraction of Centella asiatica extract*, S. Afr. J. Bot., 2017.
35. Rebia R.A., Binti Sadon N.S., Tanaka T., *Natural antibacterial reagents (Centella, propolis, and hinokitiol) loaded into poly[(r)-3-hydroxybutyrate-co-(r)-3-hydroxyhexanoate] composite nanofibers for biomedical applications*, Nanomaterials, 2019.
36. Woźniak M., Kwiatkowska A., Holderna-Kędzie E., *Aktywność biologiczna ekstraktów z propolisu*, Post Fitoter, 2021.
37. Selim S.A., Adam M.E., Hassan S.M., Albalawi A.R., *Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (Cupressus sempervirens L.)*, BMC Complement Altern Med., 2014.
38. Shih Y.H., Lin D.J., Chang K.W., Hsia S.M., Ko S.Y., Lee S.Y., Hsue S.S., Wang T.H., Chen Y.L., Shieh T.M., *Evaluation physical characteristics and comparison antimicrobial and anti-inflammation potentials of dental root canal sealers containing hinokitiol in vitro*, PLoS ONE, 2014.
39. Zeighampour F., Alihosseini F., Morshed M., Rahimi A.A., *Comparison of prolonged antibacterial activity and release profile of propolis-incorporated PVA nanofibrous mat, microfibrillar mat, and film*, J. Appl. Polym. Sci., 2018.

Modyfikacja biomateriałów opatrunkowych związkami pochodzenia roślinnego w celu nadania im właściwości przeciwbakteryjnych

Streszczenie

Gojenie się ran jest skoordynowaną sekwencją zdarzeń, która następuje w wyniku przerwania ciągłości skóry. W konsekwencji proces ten powinien prowadzić do całkowitej regeneracji skóry w odpowiednim czasie. Po początkowym urazie rany, które nie przejdą przez kolejne etapy gojenia w ciągu 3 miesięcy są uznawane za rany przewlekłe. Rany te charakteryzują się przedłużoną i utrzymującą się fazą zapalną, wielobakteryjnym zakażeniem, a także w wielu przypadkach nadmiernym poziomem cytokin prozapalnych, proteaz, reaktywnych form tlenu oraz niedoborem funkcjonalnych komórek macierzystych. Rany przewlekłe wykazują zróżnicowaną etiologię na poziomie molekularnym i fizjologicznym, co utrudnia opracowanie uniwersalnego środka terapeutycznego. Pomimo intensywnego rozwoju sektora biomateriałów leczenie ran w dalszym ciągu jest wielkim wyzwaniem. Z uwagi na dobroczynne działanie roślin, to właśnie one stanowią źródło wielu substancji o potencjalnym działaniu wspomagającym gojenie się ran, w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zastosowaniem tego typu substnacji w projektowaniu biomateriałów opatrunkowych. Z uwagi na właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwzapalne dużym zainteresowaniem badaczy cieszą się między innymi garbniki, olejki eteryczne czy kumaryny. Związki te stanowią alternatywę dla substancji syntetycznych, w tym antybiotyków, co ma ogromne znaczenie z uwagi na rozwijającą się antybiotykooporność. Niniejsza praca stanowi przegląd biomateriałów opatrunkowych, które wzbogacone zostały o substancje roślinne wywołujące działanie przeciwbakteryjne.

Słowa kluczowe: biomateriały, medycyna regeneracyjna, rany przewlekłe, związki roślinne, zakażenia bakteryjne

Modification of dressing biomaterials with plant-derived compounds to confer antimicrobial properties

Abstract

Wound healing is a coordinated sequence of events that occurs as a result of a break in skin continuity. Consequently, this process should lead to complete skin regeneration in a timely manner. After the initial injury, wounds that do not progress through the stages of healing within three months are considered chronic wounds. These wounds are characterised by a prolonged and persistent inflammatory phase, multi-bacterial infection and, in many cases, excessive levels of pro-inflammatory cytokines, proteases, reactive oxygen species and a deficiency of functional stem cells. Chronic wounds show a diverse aetiology at the molecular and physiological level, making it difficult to develop a universal therapeutic agent. Despite the intensive development of the biomaterials sector, wound treatment continues to be a great challenge. Due to the beneficial effects of plants, they are the source of many substances with the potential to promote wound healing. In recent years, there has been a growing interest in the use of such substances in the design of dressing biomaterials. Due to their antimicrobial and anti-inflammatory properties, such substances as tannins, essential oils and coumarins, among others, are of great interest to researchers. These compounds are an alternative to synthetic substances, including antibiotics, which is of great importance in view of the developing antibiotic resistance. This paper provides an overview of dressing biomaterials that are enriched with antimicrobial plant substances.

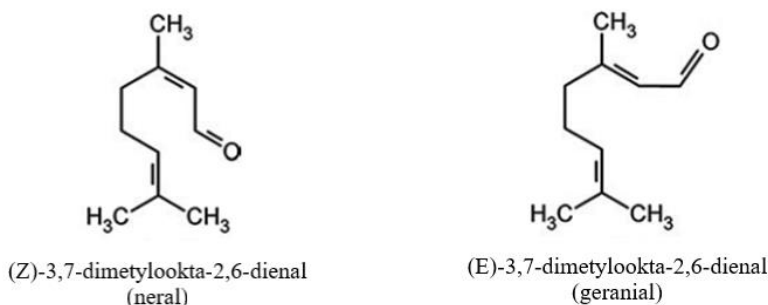
Keywords: biomaterials, regenerative medicine, chronic wounds, plant-derived compounds, bacterial infections

Cytral – związek pochodzenia naturalnego o wielu zastosowaniach w medycynie – przegląd literaturowy

1. Wprowadzenie

Monoterpeny to związki bardzo rozpowszechnione w świecie roślinnym. Już w czasach starożytnych wykorzystywano zarówno ich lecznicze, jak i zapachowe właściwości. Świadczą o tym choćby najstarsze informacje o stosowaniu ziół i zawartych w nich olejków eterycznych na przykład podczas ataków hysterii, w stanach przygnębienia bądź przy anemicznym wygładzie. Współcześnie składniki wielu olejków eterycznych wykorzystywane są w medycynie do leczenia schorzeń górnych dróg oddechowych, gdyż działają wykrztuśnie, przeciwbakteryjnie i przeciwwirusowo. W przypadku schorzeń gastrycznych działają jako środki żółciopędne i spazmolityczne. Ponadto wiele z nich działa dezynfekująco i aseptycznie na skórę, pobudzając tym samym jej ukrwienie, łagodząc bóle mięśniowe oraz działając pobudzająco lub uspokajająco. Niektóre terpeny lub ich pochodne wykorzystywane są również w terapiach antynowotworowych (karweol, limonen czy alkohol perylowy) [1].

Cytral, znany również jako 3,7-dimetylo-2,6-oktadienal, jest monoterpenowym związkiem chemicznym, w naturze występującym w postaci 2 odmian izomerycznych (rys. 1): geranial (forma trans lub inaczej cytral a) i neral (forma cis lub inaczej cytral b). Stosunek izomerów cytralu zależy przede wszystkim od surowca roślinnego, od którego pochodzi olejek [1].



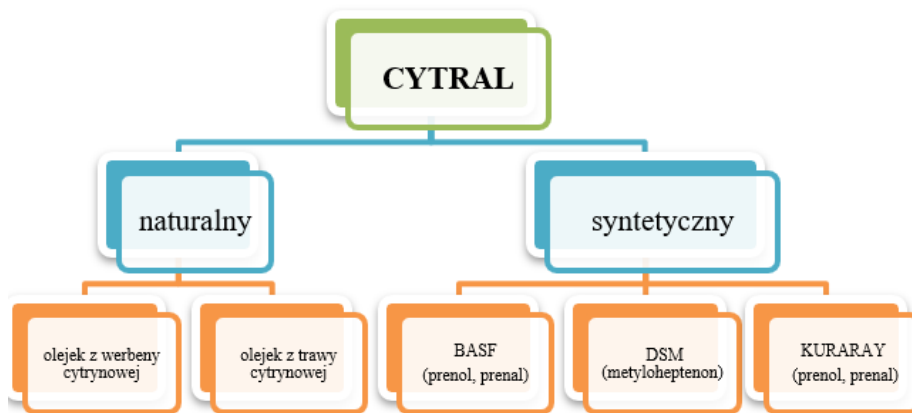
Rysunek 1. Wzory strukturalne izomerów cytralu (opracowanie na podstawie [1])

Najcenniejszym źródłem cytralu jest olejek z mirtu cytrynowego (*Backhousia citriodora*, od 90 % do 98%), werbeny egzotycznej (*Litsea cubeba*, od 70% do 85%) oraz olejek z trawy cytrynowej (*Cymbopogon citratus*, od 65% do 85%). Ponadto obecność cytralu stwierdzono w wielu owocach cytrusowych [1].

¹ abieda@ajp.edu.pl, Zakład Energetyki i Bezpieczeństwa Technicznego, Wydział Techniczny, Akademia im. Jakuba z Paradyża w Gorzowie Wielkopolskim, www.ajp.edu.pl.

² awroblewska@zut.edu.pl, Katedra Inżynierii Materiałów Katalitycznych i Sorpcyjnych, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Techniczny w Szczecinie, www.zut.edu.pl.

Obecnie na skalę przemysłową cytral otrzymywany jest metodami syntetycznymi, natomiast tylko niewielkie jego ilości otrzymywane są poprzez destylację olejku z trawy cytrynowej czy też werbeny egzotycznej. Jako producentów cytralu, zarówno syntetycznego, jak i naturalnego, należy wymienić przede wszystkim firmy: BASF (Niemcy), Givaudan (Szwajcaria), Mane (Francja), Kuraray (Japonia) i DSM (Holandia) (rys. 2) [2].



Rysunek 2. Wybrane naturalne oraz przemysłowe metody otrzymywania cytralu (opracowanie na podstawie [2])

Technika otrzymywania cytralu, opracowana przez firmę BASF, bazuje na prenolu i prenalu jako surowcach do syntezy. Technologia ta jest przyjazna dla środowiska naturalnego, ponieważ woda jest jej jedynym produktem ubocznym. W metodzie tej można wyróżnić kilka etapów:

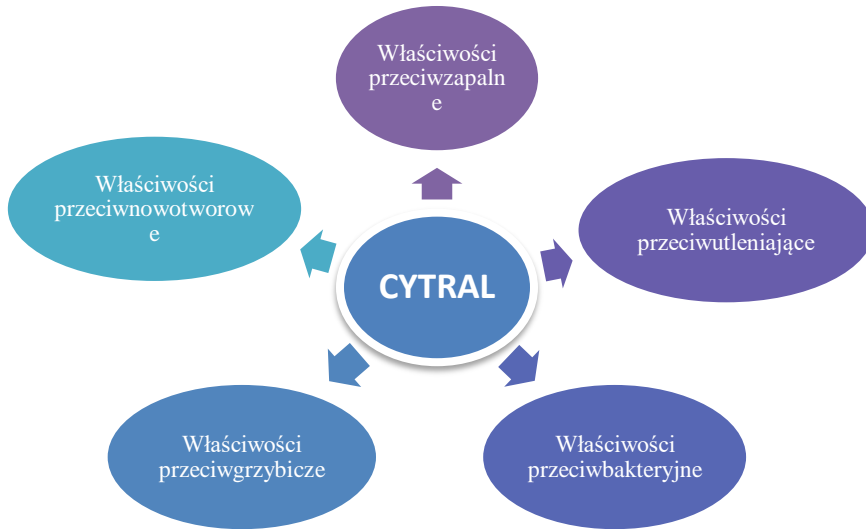
- synteza acetalu z 2 cząsteczek prenolu i 1 prenalu;
- eliminacja jednej cząsteczki prenolu z acetalu;
- przegrupowanie Claisena;
- przegrupowanie Cope'a [2].

Technologia ta umożliwia uzyskanie cytralu charakteryzującego się bardzo wysoką czystością, który można stosować jako związek zapachowy w wyrobach perfumeryjnych, czy jako aromat w przemyśle spożywczym. Ponadto cytral może być surowcem w syntezie mentolu.

Kolejnym ważnym producentem syntetycznego cytralu jest koncern DSM. Związkiem wyjściowym w metodzie wdrożonej przez ten koncern jest 6-metylohept-5-en-2-on (metyloheptenon) [3]. W pierwszym etapie w wyniku reakcji acetonu i acetyleny powstaje nienasycony alkohol, 2-metylobut-3-yn-2-ol [4], następnie 2-metylobut-3-yn-2-ol poddawany jest procesowi łagodnej redukcji, w wyniku którego wiązanie potrójne przekształca się w podwójne. Proces prowadzony jest w obecności katalizatora Lindlara [5]. Ostatnim etapem jest reakcja pomiędzy 2-metylobut-3-en-2-olem i eterem izopropenylometylowym w obecności katalizatora fosforowego (chelate kwasu metafosforowego). Proces prowadzony jest w sposób ciągły, w temperaturze 150°C, w roztworze metanolewym i pod ciśnieniem około 10 barów. Końcowym etapem jest przegrupowanie dehydrolinalolu do cytralu, katalizowane przez katalizator molibdenowy. Następnie z mieszaniny poreakcyjnej wydzielany jest cytral, który w dalszej kolejności jest oczyszczany. Wydajność cytralu w tym procesie wynosi około 90% [6].

Ostatnia technologia otrzymywania cytralu została opracowana przez firmę Kuraray z Japonii. Metoda ta przypomina metodę wdrożoną przez koncern BASF. Podobieństwo wynika z tworzenia acetalu z prenolu i prenalu, jego dalszego rozkładu oraz przegrupowania Claisena i Cope'a, zaś różnica występuje na etapie otrzymywania prenolu i prenalu [6].

Wysoka zawartość cytralu w olejkach eterycznych spowodowała, że jest on ważnym składnikiem w wielu preparatach o działaniu terapeutycznym (rys. 3). Dodatkowo cytral stosowany był jako naturalny środek konserwujący do żywności i napojów, głównie ze względu na jego silny smak i aromat cytrynowy [7]. Ponadto cytral wykazuje silne właściwości elektrofilowe dzięki obecności α , β -nienasyconych związków karbonylowych [8, 9].



Rysunek 3. Biologiczna aktywność cytralu (opracowanie na podstawie [8])

Celem niniejszej pracy było przedstawienie najnowszych badań dotyczących aktywności biologicznej cytralu i jego zastosowań w medycynie. We wstępie do tego opracowania przedstawiono również budowę chemiczną cytralu i jego najważniejsze źródła pochodzenia roślinnego. Ponadto opisano najważniejsze przemysłowe metody syntezy cytralu (przemysłowe metody syntezy chemicznej są obecnie głównym źródłem tego związku).

2. Właściwości biologiczne cytralu

2.1. Właściwości przeciwzapalne

Dla organizmu ludzkiego poważnym problemem zdrowotnym jest stan zapalny tkanek, który może być spowodowany przez różne czynniki stresu zarówno fizycznego, jak i chemicznego, takie jak np. lipopolisacharydy. Inne czynniki, które przyczyniają się do stanu zapalnego tkanek, to m.in. fluktuacje czynnika jądrowego komórki kappa-B (NF- κ B), czynnik martwicy nowotworu-TNF- α , interleukiny, reaktywne formy tlenu (ROS) i cytokiny. W badaniach naukowych wykazano, że cytral posiada silne właściwości przeciwzapalne. Dodatkowo metabolity wtórne obecne w trawie cytrynowej, w tym cytral, wykazują działanie przeciwzapalne w przypadku obrzęku łap i zapalenia otrzewnej wywołanych przez karageninę w modelu szczura. Badania wykazały, że zastosowanie cytralu

pomagało zmniejszyć obrzęk łap poprzez obniżenie przemieszczenia leukocytów do jamy otrzewnej. Ponadto cytral wykazuje potencjał w łagodzeniu stanów zapalnych tkanek poprzez zmniejszanie ekspresji białek zapalnych oraz regulację przemieszczania leukocytów. Jednakże potrzebne są dalsze badania, aby dokładniej zrozumieć mechanizmy działania cytralu i potwierdzić jego skuteczność w przypadku stanów zapalnych u ludzi [10].

Olejki eteryczne to kompleksowe mieszaniny różnych lotnych składników pochodzących z roślin. Są one pozyskiwane z określonych organów roślinnych, takich jak liście czy skórki, i wykazują różnorodne działania farmakologiczne. W jednym z badań wykazano, że cytral wykazuje silne hamujące działanie na produkcję tlenku azotu (NO) indukowaną przez lipopolisacharydy (LPS) w komórkach RAW264.7, jednocześnie nie wykazując przy tym żadnego efektu cytotoksycznego. Stwierdzono, że hamowanie to było związane z tłumieniem ekspresji i aktywności transkrypcyjnej indukowanej NO syntazy (iNOS). Wykazano również, że ekspresja iNOS w makrofagach mysich jest związana z aktywnością czynnika jądrowego komórki kappa-B (NF-κB). Dowiedziono, że cytral może wpływać na aktywację NF-κB. Okazało się, że cytral łagodził aktywność transkrypcyjną NF-κB indukowaną przez LPS oraz wiązanie DNA w sposób zależny od stężenia. Wyniki tych badań wskazują na to, że hamowanie ekspresji iNOS przez cytral prawdopodobnie wynikało z tłumienia aktywacji NF-κB. NF-κB składa się głównie z dwóch białek, p50 i p65. W nieaktywnym stanie NF-κB jest obecny w cytozolu i związany z inhibitorem IκB. Po indukcji NF-κB przez różne czynniki, takie jak LPS lub tkankowy aktywator plazminogenu, IκB ulega fosforylacji, co prowadzi do jego proteolitycznej degradacji przez proteasom. Następnie NF-κB zostaje uwolniony z IκB, fosforylowany i przenoszony do jądra, gdzie wiąże się z miejscami wiązania κB na promotorach genów docelowych. Elementy odpowiedzi NF-κB znajdują się na promotorach genów iNOS. Wnioskiem z tych wyników jest to, że cytral hamuje produkcję tlenku azotu poprzez tłumienie ekspresji iNOS wskutek hamowania aktywacji NF-κB. Sugeruje to, że cytral może być potencjalnie stosowany jako środek przeciwzapalny [11-13].

Zielińska i wsp. [14] przebadali cytral i geraniol pod kątem ich działania przeciwzapalnego w linii komórkowej RAW 264,7, udowadniając, że cytral wykazuje zwiększoną zdolność do hamowania wytwarzania NO (ok. 84% dla cytralu i 52% dla geraniolu w najniższym badanym stężeniu 5 µg/ml). Ponieważ cytral wykazywał wyższą aktywność hamującą NO niż geraniol, aby zmierzyć poziom cytotoksyczności cytralu wykonano test redukcji AlamarBlue, który przeprowadzono na 2 modelach komórkowych (nienowotworowy HaCaT i nowotworowy A431) [13, 14].

Lipia trójlistna (*Aloysia triphylla*) jest stosowana w leczeniu tzw. kolki menstruacyjnej, określanej jako pierwotne bolesne miesiączkowanie. Pierwotne bolesne miesiączkowanie jest bardzo częstym schorzeniem ginekologicznym występującym u kobiet miesiączkujących, dotyczącym od 30% do 60% z nich. Zwykle to schorzenie jest leczone niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ). Jednak, pomimo iż ich działanie jest szybkie, wykazują one wiele skutków ubocznych. Wpływ ekstraktu heksanowego z *A. triphylla* i cytralu na skurcze macicy oceniano *in vitro*, a także oceniano ich właściwości przeciwzapalne i zdolność do gojenia rany żołądka *in vivo*. Hamujący wpływ na skurcze analizowano przy użyciu izolowanych pasków macicy od szczurów napełnionych estrogenem. Skurcze były indukowane przez KCl 60 mM, oksytocynę 10 mIU/ml, charbacol 10 µM i PGF2α 5 µM. Działanie przeciwzapalne oceniano na modelu obrzęku tylnej łapy szczura wywołanego karageniną. Stężenie hamujące -50 (IC₅₀) ekstraktu heksano-

wego *A. triphylla* po każdej odpowiedzi skurczowej wynosiło dla KCl 44,73 $\mu\text{g/ml}$ $\pm 2,48$ $\mu\text{g/ml}$, dla oksytocyny 42,16 $\mu\text{g/ml}$ $\pm 3,81$ $\mu\text{g/ml}$, dla charbakolu 41,87 $\mu\text{g/ml}$ $\pm 1,73$ $\mu\text{g/ml}$ i dla PGF2 α 28,70 $\mu\text{g/ml}$ $\pm 2,40$ $\mu\text{g/ml}$. Ekstrakt z *A. triphylla* wywierał znaczący wpływ hamujący na skurcze wywołane przez PGF2 α . Cytral wykazywał taki sam wpływ hamujący na skurcz indukowany przez PGF2 α . Doustne podawanie ekstraktu (od 100 mg/kg do 800 mg/kg) i cytralu (od 100 mg/kg do 800 mg/kg) wywoływało działanie przeciwzapalne; ponadto zastosowana maksymalna dawka nie powodowała uszkodzenia żołądka [15].

2.2. Właściwości przeciwutleniające

Cytral wykazuje właściwości przeciwutleniające. Wykazano, że związek ten posiada zdolność do neutralizacji lub hamowania działania reaktywnych form tlenu (ROS) i wolnych rodników, które są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za uszkodzenia komórek i tkanek w procesach oksydacyjnych. Poprzez swoje właściwości przeciwutleniające cytral może na przykład zapobiegać peroksydacji lipidów czy uszkodzeniom DNA i przyczyniać się do ogólnego zdrowia komórek oraz tkanek, a także chronić układ odpornościowy i wspierać jego prawidłowe funkcjonowanie.

Cytralne chemotypy *Cinnamomum camphora* (*C. camphora*) i *Cinnamomum bodinieri* (*C. bodinieri*) są obiecującymi roślinami przemysłowymi, które zawierają obfite ilości cytralu. W celu bardziej dogłębnego zbadania ich znaczącego efektu biologicznego w badaniu określono skład chemiczny i zdolność przeciwutleniającą olejków eterycznych bogatych w cytral chemotypów *C. camphora* i *C. bodinieri* (EOCC). Wydajność EOCC, uzyskana w wyniku hydrodestylacji i analizowana za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS), wahała się od 1,45% do 2,64%. Zidentyfikowano 40 składników o zawartości powyżej 0,1%, były to głównie: neral (od 28,6% do 39,2%), geranial (od 31,8% do 54,1%), Z-izokitral (od 1,8% do 3,2%), E-izokitral (od 3,2% do 4,7%), geraniol (od 1,3% do 2,6%) i kariofilen (od 0,6% do 2,4%). Właściwości przeciwutleniające EOCC oceniano metodami DPPH, ABTS i FRAP. Jak wykazały wyniki, aktywność przeciwutleniająca była istotnie skorelowana z utlenionymi monoterpenami. Odmiana *C. bodinieri* (N7) wykazywała najlepszy profil antyoksydacyjny, biorąc pod uwagę najwyższą inhibicję rodnika DPPH ($\text{IC}_{50} = 6,887$ mg/ml $\pm 0,151$ mg/ml) i aktywność zmiatania rodnika ABTS ($\text{IC}_{50} = 19,08$ mg/ml $\pm 0,02$ mg/ml). Biorąc pod uwagę wysoką wydajność olejku eterycznego, bogatą zawartość cytralu i wysoką aktywność przeciwutleniającą, odmiana N7 może być obiecującym kandydatem do opracowania ulepszonej odmiany farmaceutycznej i kosmetycznej [16].

Wolne rodniki, anion ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru to główne reaktywne formy tlenu (ROS), powstają w wyniku reakcji utleniania zachodzącej w tkance. ROS są bardzo reaktywne i mogą uszkodzić składniki komórkowe oraz biomolekuły, takie jak DNA, białka, lipidy komórkowe i błony komórkowe [17]. Ponadto ROS mogą wywoływać problemy zdrowotne, takie jak zniszczenie mięśni, reumatoidalne zapalenie stawów i miażdżyca. Organizm posiada przeciwutleniacze, które są w stanie zwalczać ROS i mogą zapewnić ochronę przed utleniającym działaniem wolnych rodników [18, 19]. Test z udziałem DPPH wykazał potencjał antyoksydacyjny oleju z trawy cytrynowej. Z danych dostępnych w literaturze wynika, że ekstrakty, zarówno z liści, jak i z łodyg, zawierające cytral wykazują potencjał antyoksydacyjny, który był zależny od dawki [20].

Bouzenna i wsp. [21] zbadali działanie przeciwutleniające i działanie ochronne cytralu wobec toksyczności indukowanej przez aspirynę w warunkach *in vitro*. W badaniach użyto komórek IEC-6 (komórki nabłonka jelita cienkiego szczura). Aktywność antyoksydacyjną określono za pomocą 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH), β -karotenu/kwasu linolowego i analizy z odczynnikiem FRAP. Dodatkowo cytotoksyczność oceniano na podstawie żywotności komórek, aktywności enzymów antyoksydacyjnych, produkcji dialdehydu malonowego (MDA) oraz ekspresji szlaków MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*). Zgodnie z uzyskanymi wynikami cytral wykazał istotną aktywność antyoksydacyjną. Hamował on utlenianie kwasu linolowego. Ponadto stwierdzono umiarkowane działanie DPPH. Cytral wykazywał redukujący potencjał antyoksydacyjny z wartością EC_{50} wynoszącą $125 \mu\text{g/mL} \pm 28,86 \mu\text{g/mL}$. Następnie współtraktowanie aspiryny cytralem znacznie zmniejszyło indukowaną śmierć komórek oraz poziom MDA. Również aktywacja MAPK była osłabiona przez cytral. Wyniki te sugerują, że cytral może chronić komórki IEC-6 przed stresem oksydacyjnym wywołanym aspiryną.

Owoce, warzywa oraz zioła lecznicze są bogatym źródłem naturalnych przeciwutleniaczy, które wpływają na właściwości terapeutyczne roślin. Przeprowadzono między innymi badania mające na celu przybliżenie potencjalnego działania ochronnego cytralu przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wywołanymi przez nadtlenek wodoru (H_2O_2) w komórkach śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC) u ludzi. Wyniki badań określiły, że cytral wykazuje działanie cytoprotekcyjne oraz przeciwutleniające wobec stresu oksydacyjnego spowodowanego przez H_2O_2 w HUVEC. Cytral chronił komórki przed śmiercią w wyniku stresu oksydacyjnego przy stężeniach 5 i 10 $\mu\text{g/ml}$. Ponadto cytral obniżał poziomy nadtlenu wodoru i zwiększał wartość FRAP zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki przy różnych stężeniach. Nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest stabilnym reaktywnym tlenowym związkiem, który łatwo przenika przez błonę komórkową i odgrywa istotną rolę w sygnalizacji w komórkach naczyniowych, takiej jak: proliferacja, apoptoza i stan zapalny. W badaniu ekspozycja HUVEC na H_2O_2 spowodowało znaczne zmniejszenie żywotności komórek oraz wartości FRAP. Wykazano, że cytral może również posiadać właściwości hamujące wzrost komórek przy wyższych stężeniach. Niniejsze wyniki potwierdziły cytoprotekcyjne działanie cytralu przy stężeniach poniżej 20 $\mu\text{g/ml}$. Ponadto cytral wykazywał działanie przeciwutleniające poprzez zmniejszenie poziomów nadtlenu wodoru oraz zwiększenie wartości FRAP zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki [22].

2.3. Właściwości przeciwbakteryjne

Cytral wykazuje również silne właściwości przeciwbakteryjne. W wyniku badań stwierdzono, że związek ten może hamować wzrost i rozwój zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Cytral wykazuje działanie przeciwbakteryjne poprzez różne mechanizmy. Przede wszystkim jest on zdolny do niszczenia błon komórkowych bakterii, co prowadzi do ich rozpadu i śmierci bakterii. Ponadto cytral może wpływać na enzymy niezbędne dla metabolizmu bakteryjnego, powodując zaburzenia w ich funkcjonowaniu i prowadząc do osłabienia bakterii lub ich zniszczenia. Badania *in vitro* wykazały, że cytral może być skuteczny w zwalczaniu różnych patogennych bakterii, takich jak: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* i inne. Wykazano również, że cytral może działać synergistycznie z innymi substancjami przeciwbakteryjnymi, zwiększając ich skuteczność przeciwko bakteriom.

Cytral może mieć także potencjalne zastosowanie w terapii antybiotykoopornej, ponieważ niektóre badania sugerują, że może on działać skutecznie wobec bakterii opornych na tradycyjne antybiotyki. Jednak konieczne są dalsze badania w tym kierunku, aby lepiej zrozumieć mechanizmy działania cytralu i ocenić jego potencjał terapeutyczny w walce z bakteriami opornymi.

Espina i wsp. [23] zbadali wpływ karwakrolu i cytralu na bakterie *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* (SC-01) i *E. coli* (MG1655). Okazało się, że zarówno cytral, jak i karwakrol powodowały spadek ilości komórek bakterii. Wyniki powyższego badania wykazały potencjał cytralu do niszczenia biofilmu patogenów przenoszonych przez żywność. α -Cytral, jak i β -cytral wykazywały działanie przeciwbakteryjne zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Ponadto olejek eteryczny zawierający cytral wykazał pozytywne działanie w terapii chorób zakaźnych wywołanych przez *S. aureus* [24].

Bakteria *Stenotrophomonas maltophilia* ma zarówno potencjał patogenny, jak i zdolność do powodowania psucia się żywności i charakteryzuje się opornością na wiele antybiotyków. Do oceny działania przeciwbakteryjnego przeciwko psuciu się żywności wywołanej przez *S. maltophilia* zostało wybranych 7 typów olejków eterycznych. Badania prowadzono za pomocą metody dyfuzyjno-krążkowej, metody rozcieńczania bulionu i zabiegu fumigacji. Skład chemiczny olejków eterycznych został przeanalizowany za pomocą chromatografii gazowej – spektrometrii mas z wtryskiem zarówno gazu, jak i cieczy. Wyniki wykazały, że olejek *Litsea cubeba* (LCO) wykazywał silne działanie hamujące przy wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) 0,125% (v/v), a tylko LCO wykazywał działanie bakteriostatyczne w zabiegu fumigacji w badanym zakresie. Jego kluczowy składnik aktywny, cytral, odpowiadał za właściwości przeciwbakteryjne poprzez powodowanie uszkodzeń i pęknięć błony komórkowej, co określono za pomocą barwników fluorescencyjnych i skaningowego mikroskopu elektronowego z emisją polową. Minimalne stężenie hamujące i MBC cytralu przeciwko *S. maltophilia*: 0,25% (v/v) i 0,5% (v/v). Badanie to pokazuje wysoką skuteczność olejków eterycznych w hamowaniu rozwoju bakterii i stanowi alternatywę dla redukcji opornych bakterii [25].

Yersinia enterocolitica jest wszechobecnym patogenem związanym z zakażeniami przenoszonymi przez żywność. Cytral jest certyfikowanym przez FDA składnikiem bezpieczeństwa żywności pozyskiwanym z roślin, ponieważ ma właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe. Badanie to przeprowadzono w celu oceny przeciwbakteryjnego działania cytralu na *Y. enterocolitica*. Minimalne stężenia hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) cytralu przeciwko *Y. enterocolitica* ATCC 23715 wynosiły odpowiednio: 0,2 mg/ml i 0,4 mg/ml. *Y. enterocolitica* poddana działaniu cytralu wykazywała wyraźne zmniejszenie tempa wzrostu w porównaniu z nieleczonymi próbkami kontrolnymi. Stwierdzono również, że cytral zwiększa poziom reaktywnych form tlenu w komórkach bakteryjnych, indukuje zmiany morfologiczne w komórkach i powoduje dysfunkcję błony komórkowej, o czym świadczy hiperpolaryzacja błony komórkowej, zmniejszona integralność błony komórkowej i wewnętrzkomórkowe stężenie ATP. Analiza elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z dodecylsiarczanem sodu (SDS-PAGE) potwierdziła wpływ cytralu na syntezę białek przez *Y. enterocolitica*, podczas gdy PCR w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) wskazał, że transkrypcja wielu genów została zmniejszona przez cytral. Ponadto cytral skutecznie dezaktywował *Y. enterocolitica* w PBS, bulionie

LB i świeżym soku warzywnym. Badania te sugerują, że cytral może być stosowany jako naturalny środek przeciwdrobnoustrojowy do zwalczania *Y. enterocolitica* w warzywach i innych obszarach łańcucha dostaw żywności, zmniejszając w ten sposób ryzyko zakażenia *Y. enterocolitica* [26].

Bambus, naturalny materiał pochodzenia roślinnego, znalazł szerokie zastosowanie w architekturze i meblarstwie. Bambus jednak pleśniej i traci tym samym na wartości użytkowej. Zbadano mechanizm hamowania i działanie przeciwbakteryjne cytralu – naturalnego środka przeciwbakteryjnego – na pleśnienie bambusa. Wyniki wykazały, że cytral może zmieniać kształt grzybni, niszczyć integralność struktury grzybni, ściany komórkowej i struktury błony komórkowej, powodując w ten sposób wyciek kwasów nukleinowych, białek i innych substancji w komórce. Dodatkowo cytral może niszczyć równowagę pH komórek zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki, aby zahamować lub zabić pleśń [27].

2.4. Właściwości przeciugrzybicze

Badania wykazały, że cytral może hamować wzrost i rozwój różnych grzybów, w tym zarówno grzybów drożdżopodobnych, jak i grzybów pleśniowych. Mechanizm przeciugrzybiczego działania cytralu polega na zakłócaniu struktury i funkcji błon komórkowych grzybów. Cytral może wnikać do wnętrza komórek grzybów, powodując uszkodzenia błon, co prowadzi do ich rozpadu i zahamowania wzrostu grzybów. Ponadto cytral może wpływać na procesy metaboliczne grzybów, zakłócając ich funkcjonowanie i prowadząc do ich osłabienia lub zniszczenia. Badania laboratoryjne wykazały, że cytral może wykazywać aktywność przeciwko różnym patogennym grzybom, takim jak: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* i inne. Wykazano również, że cytral może działać synergistycznie z innymi przeciugrzybiczymi substancjami, zwiększając ich skuteczność w zwalczaniu grzybów.

Powierzchnowe grzybice skóry należą do najczęstszych infekcji dermatologicznych. Leczenie tych infekcji jest ograniczone z wielu powodów i konieczne są nowe leki do leczenia tych zmian. Wiele olejków eterycznych zostało przetestowanych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* w kierunku działania przeciugrzybiczego. Oceniono między innymi przeciugrzybicze działanie olejku z trawy cytrynowej i cytralu na drożdżaki z gatunku *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* i *Candida tropicalis*). Badanie to dowiodło, że olejek z trawy cytrynowej i cytral wykazują *in vitro* silne działanie przeciwko *Candida spp.* Działanie przeciugrzybicze olejku z trawy cytrynowej zostało przetestowane przeciwko niektórym gatunkom, które wywołały infekcje u ludzi, w tym były to gatunki dermatofitów i *C. albicans*. Olejek z trawy cytrynowej (100 µg/mL) i cytral (od 25 µg/mL do 200 µg/mL) hamowały wzrost grzybni *C. albicans*. Dodatkowo były prowadzone badania przedkliniczne na zwierzętach z wykorzystaniem odpowiednio przygotowanych maści zawierających olejki eteryczne, w tym olejek z trawy cytrynowej. Zwierzęta zostały zakażone grzybami (*Trichophyton rubrum* i *Microsporum gypseum*), a wyniki wykazały dużą skuteczność przygotowanych maści w zwalczaniu tych grzybów [28].

Cai i wsp. [29] przeprowadzili badania, których celem była analiza mechanizmów działania przeciugrzybiczego cytralu, limonenu i eugenolu przeciwko *Zygosaccharomyces rouxii*. Wszystkie te 3 składniki wielu olejków eterycznych wykazywały silne działanie przeciugrzybicze przeciwko *Z. rouxii*. Minimalne hamujące stężenia cytralu, limonenu

i eugenolu wyniosły odpowiednio: 0,188 $\mu\text{l/ml}$, 0,75 $\mu\text{l/ml}$ i 0,4 $\mu\text{l/ml}$, a minimalne stężenia grzybobójcze odpowiednio: 0,375 $\mu\text{l/ml}$, 3 $\mu\text{l/ml}$ i 0,8 $\mu\text{l/ml}$. Skaningowa mikroskopia elektronowa wykazała, że testowane związki miały destrukcyjny wpływ na powierzchnię komórek drożdży. Po potraktowaniu cytralem, limonenem i eugenolem względne przewodnictwo elektryczne i wyciek kwasu nukleinowego uległy znacznemu zwiększeniu. Analiza SDS-PAGE wykazała, że składniki olejków eterycznych mogą powodować utratę rozpuszczalnych białek, a także niszczyć białko drożdży lub hamować ich ekspresję. Wyniki te wykazały, że cytral, limonen i eugenol wywierały działanie przeciwgrzybicze na *Z. rouxii* poprzez uszkodzenie błony komórkowej i zniszczenie białek komórkowych. Badanie to dostarczyło teoretycznej możliwości wykorzystania cytralu, limonenu i eugenolu jako naturalnych środków konserwujących żywność do kontroli psucia się powodowanego przez *Z. Rouxii* w przemyśle soków owocowych. W badaniach wykazano, że synergistyczne działanie różnych składników olejków eterycznych może nie tylko zmniejszyć dawkę stosowanych związków terpenowych, ale też zwiększyć aktywność biologiczną badanych związków.

Ju i wsp. [30] dokonali oceny synergistycznego działania przeciwgrzybiczego eugenolu i cytralu (SEC) na *Penicillium roqueforti*. Oznaczenie reaktywnych form tlenu (ROS) i zawartości dialdehydu malonowego wskazało, że SEC może indukować peroksydację lipidów błonowych, a udział w tym indukowaniu cytralu jest większy niż eugenolu. Ponadto regulacja w dół genu kodującego podjednostkę oksydazy NADPH wskazywała, że w ROS indukowanym przez SEC pośredniczyła oksydaza NADPH. Badania przeprowadzone na skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) i transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM), obróbka jodkiem propidyny, elektroforeza w żelu DNA i eksperymenty z wyciekaniem komórek wykazały, że SEC zniszczył integralność błony komórkowej i struktur wewnętrznych oraz degradował zawartość komórki.

C. albicans to drożdże, które zasiedlają organizm człowieka i mogą powodować infekcje oportunistyczne lub patogenne. Leite i wsp. [31] zbadali przeciwgrzybicze działanie cytralu na *C. albicans*. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC) określono technikami mikrorozcieńczenia bulionu. MIC i MFC cytralu wynosiły odpowiednio 64 $\mu\text{g/ml}$ i 256 $\mu\text{g/ml}$. Ingerencja w ścianę komórkową i wiązanie ergosterolu zostały wykluczone jako możliwe mechanizmy działania. W teście interferencji morfologicznej zaobserwowano, że produkt hamował tworzenie pseudostrzępek i chlamydokonidów. MIC i MFC cytralu wymagały tylko 4 godzin ekspozycji, aby skutecznie zabić 99,9% inokulum. Cytral wykazał *in vitro* działanie przeciwgrzybicze przeciwko szczepom *C. albicans*.

2.5. Właściwości przeciwnowotworowe

Ghosh [32] przeprowadził badania *in vitro*, których celem była ocena przeciwnowotworowego działania olejku z trawy cytrynowej i emulsji cytralu na liniach komórkowych raka szyjki macicy (HeLa i ME-180). Cytral wykazał właściwości przeciwnowotworowe podczas badań na różnych ludzkich liniach komórek nowotworowych. Analiza DLS wykazała, że średnia wielkość emulsji olejku z trawy cytrynowej wynosiła 267 nm, a średnia wielkość emulsji cytralu powinna wynosić 270 nm. Działanie przeciwnowotworowe obu emulsji określono testem MTT, metodą DCFH-DA, Rh-123 i barwieniem AO/EtBr. Uzyskane wyniki pokazują, że olejek z trawy cytrynowej i emulsje cytralowe inicjują śmierć komórek rakowych, zmniejszając proliferację komórek, zwiększając

wewnątrzkomórkowe ROS, zmieniając potencjał błony mitochondrialnej i inicjowanie apoptozy w liniach komórkowych HeLa i ME-180. Obecne ustalenia tego badania wyraźnie wskazują na udział mechanizmu oksydacyjnego w działaniu antyproliferacyjnym w HeLa i ME-180 na linie komórkowe. ME-180, który jest chemowrażliwy, wykazywał dobre wyniki przy niższych stężeniach cytralu (IC_{50} 24 h 300 $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu do chemoopornych komórek HeLa (cytral IC_{50} 24 h 500 $\mu\text{g/ml}$). Natomiast olej z trawy cytrynowej wykazywał lepszą aktywność w obu liniach komórkowych (IC_{50} 24 h 200 $\mu\text{g/ml}$). Wszystkie wyniki sugerują, że olejek z trawy cytrynowej i emulsja cytralowa mogą być potencjalnymi składnikami leków przeciwnowotworowych.

Włączenie cytralu do nanostrukturalnego nośnika lipidowego (NLC-Cytral) poprawia zarówno rozpuszczalność cytralu, jak i szybkość jego dostarczania, nie obserwuje się przy tym efektów toksycznych *in vivo*. Nordin i wsp. [33] podjęli próbę oceny działania przeciwnowotworowego NLC-Cytral w komórkach MDA MB-231 *in vitro* za pomocą aneksyny V, cyklu komórkowego, JC-1 i testów fluorometrycznych. Dodatkowo badanie to miało na celu zbadanie wpływu NLC-Cytral na zmniejszenie masy i rozmiaru guza w mysim modelu raka sutka indukowanego 4T1. Wyniki wykazały, że NLC-Cytral indukował apoptozę i zatrzymanie G2/M w komórkach MDA MB-231. Co więcej, wykazano w warunkach *in vitro* wybitną zdolność przeciwprzerzutową NLC-Cytral przy użyciu testów zarysowania, migracji i inwazji. W komórkach MDA MB-231 traktowanych NLC-Cytral zaobserwowano znaczne zmniejszenie liczby migrujących i zaatakowanych komórek. W celu dalszej oceny mechanizmu apoptotycznego i przeciwprzerzutowego NLC-Cytral na poziomie molekularnym przeprowadzono ekspresję genów w oparciu o mikromacierze i profilowanie proteomiczne. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że NLC-Cytral reguluje kilka ważnych szlaków sygnałowych związanych z rozwojem raka, takich jak: apoptoza, cykl komórkowy i szlaki sygnałowe przerzutów. Ponadto analiza ekspresji genów została zweryfikowana poprzez ukierunkowane sekwencjonowanie RNA i reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym. Podsumowując, NLC-Cytral hamował proliferację komórek raka piersi *in vitro* (głównie poprzez indukcję apoptozy), hamował proliferację potencjałów przeciwprzerzutowych oraz zmniejszenie masy i wielkości guza bez zmiany działania terapeutycznego cytralu.

Bailly [34] dokonał analizy potencjału przeciwnowotworowego naturalnego citralu (CIT) występującego w wielu roślinach i olejkach eterycznych oraz szeroko stosowanego w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. CIT składa się z 2 stereoisomerów, przy czym trans-izomer geranial jest silniejszym związkiem przeciwnowotworowym niż cis-izomer nerol. CIT hamuje proliferację komórek rakowych i indukuje apoptozę komórek rakowych. Jego wieloczynnikowy mechanizm działania przeciwnowotworowego opiera się zasadniczo na 3 etapach: (i) indukowanej przez leki akumulacji reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych, co prowadzi do wybuchu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA, (ii) podobnego do kolchicyny hamowania polimeryzacji tubuliny, związanej z hamowaniem kinazy regulującej powinowactwo mikrotubul MARK4 oraz (iii) silnego hamowania izoformy dehydrogenazy aldehydowej ALDH1A3, która jest związana z proliferacją komórek macierzystych raka i chemoopornością. Ta wyjątkowa kombinacja celów i szlaków zapewnia znaczny potencjał przeciwnowotworowy. Jednak wewnętrzna siła działania CIT jest ograniczona, głównie dlatego, że lek ten nie jest bardzo stabilny i ma niską biodostępność oraz nie wykazuje wysokiej selektywności wobec komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami nienowotworowymi.

Stabilne preparaty CIT, wykorzystujące cyklodekstryny, biodegradowalne polimery lub różne nanostrukturalne cząstki, zostały zaprojektowane w celu zwiększenia biodostępności, zwiększenia zakresu dawek skutecznych i promowania aktywności przeciwnowotworowej. Brak selektywności w stosunku do komórek nowotworowych jest bardziej problematyczny i ogranicza stosowanie leku w terapii onkologicznej.

Komórki macierzyste raka piersi (CSC) można zidentyfikować na podstawie zwiększonej fluorescencji Aldefluor spowodowanej zwiększoną ekspresją dehydrogenazy aldehydowej 1A3 (ALDH1A3), a także ALDH1A1 i ALDH2. Oprócz bycia markerem CSC, ALDH1A3 reguluje ekspresję genów poprzez sygnalizację kwasu retinowego (RA) i odgrywa kluczową rolę w progresji i oporności na chemioterapię raka. Dlatego ALDH1A3 stanowi interesujący lek przeciwnowotworowy. Ponieważ do tej pory nie ma scharakteryzowanych inhibitorów izoform ALDH1A3, leki, które wcześniej opisano jako hamujące aktywność innych izoform ALDH, były testowane pod kątem aktywności anty-ALDH1A3. Porównano 12 leków (3-hydroksy-dl-kinurenina, benomyl, cytral, hydrat chloralu, cyjanamid, daidyn, DEAB, disulfiram, gossypol, kwas kinurenowy, molinat i pargilina) pod kątem ich skuteczności w wywoływaniu apoptozy i zmniejszaniu ALDH1A3, ALDH1A1 w komórkach raka piersi. Cytral został zidentyfikowany jako najlepszy inhibitor ALDH1A3, zmniejszający fluorescencję Aldefluoru w liniach komórkowych raka piersi oraz w heteroprzeszczepie nowotworu pochodzącego od pacjenta. Cytral w kapsułkach z nanocząsteczkami specyficznie redukował zwiększony wzrost guza komórek MDA-MB-231 z nadekspresją ALDH1A3. Aby określić potencjalne mechanizmy hamowania wzrostu guza za pośrednictwem cytralu, przeprowadzono testy proliferacji komórek, klonogenności i ekspresji genów. Cytral redukował tworzenie kolonii za pośrednictwem ALDH1A3 i ekspresję genów indukowalnych przez ALDH1A3. Podsumowując, cytral jest skutecznym inhibitorem ALDH1A3 i jest zdolny do blokowania wzrostu guza sutka, w którym pośredniczy ALDH1A3, potencjalnie poprzez blokowanie jego aktywności w tworzeniu kolonii i regulacji ekspresji genów. Omówiono także wariant stosowania inhibitorów ALDH1A3 jako terapii adjuwantowych dla pacjentów z nowotworami, które mają dużą populację CSC o wysokiej zawartości ALDH1A3 [35].

Balusamy i wsp. [36] przeprowadzili badania związane z cytralem. Izomery cytralu (cis-cytral i trans-cytral) wyizolowano z olejku *Cymbopogon citratus* (DC.), który wykazuje wiele właściwości terapeutycznych, w tym właściwości przeciwnowotworowe. Jednak wpływ cytralu na hamowanie raka gruczołu krokowego u człowieka i leżący u jego podstaw mechanizm molekularny nie został jeszcze wyjaśniony. Cytral oznaczono w oleju z trawy cytrynowej przy użyciu różnych analiz spektroskopowych, takich jak spektrometria mas z jonizacją elektronową (EI-MS) i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Przeprowadzono test 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-1H-tetrazoliowy (MTT) w celu oceny żywotności komórek cytralu w komórkach raka prostaty (PC-3 i PC3M). Ponadto, aby potwierdzić, że PC3 ulega apoptozie poprzez hamowanie lipogenezy, zastosowano kilka metod wykrywania, w tym cytometrię przepływową, fragmentację DNA, barwienie Hoechst, barwienie PI, barwienie olejem, qPCR i technikę western blot. Badania wykazały, że cytral zaburzał właściwości klonogenne komórek rakowych i zmieniał morfologię komórek rakowych. Badania interakcji molekularnych i program biologiczny PASS przewidział, że izomery cytralu mają tendencję do interakcji z białkami zaangażowanymi w lipogenezę i szlak apoptozy. Ponadto

cytral hamował lipogenezę komórek raka prostaty poprzez aktywację fosforylacji AMPK. Poza tym badania *in silico* przewidywały, że cytral może być stosowany jako bezpieczny, silny lek w leczeniu raka prostaty.

Rhabdomyosarcoma (RMS) jest najczęstszym mięsakiem tkanek miękkich u dzieci, z 5-letnim wskaźnikiem przeżycia wynoszącym od 30% do 65%. Standardowe leczenie obejmuje operację, radioterapię i chemioterapię. Istnieje jednak wysoki wskaźnik nawrotów, zwłaszcza w przypadku rozprzestrzeniania się lokoregionalnego. White i wsp. [37] zbadali zastosowanie cytralu do zapobiegania śmierci komórkom RSM. Znaczącą śmierć komórek rakowych zaobserwowano przy stężeniach powyżej 150 μM cytralu, a zmiany morfologiczne mitochondriów zaobserwowano po inkubacji z 10 μM cytralem. Ponieważ jednak cytral jest wysoce lotną cząsteczką, przygotowano cząsteczki albuminy metodą desolvatacji, aby otoczyć cytral w kapsułki (sposób stabilizacji cząsteczki cytralu). Następnie wprowadzono wypełnione nanocząstki do biodegradowalnej płytki polimerowej, aby stworzyć system powolnego uwalniania cytralu. Wykazano, że płytki ulegają degradacji w 50% w ciągu 25 dni i uwalniają związek aktywny. Dlatego zaproponowano zastosowanie płytek cytral-nanocząsteczkowo-polimerowych do implantacji do łożyska guza po chirurgicznym usunięciu mięsaka jako środka do kontrolowania rozprzestrzeniania się leku.

2.6. Zdolność do zapobiegania otyłości i wysokiemu ciśnieniu

Ekstrakt wodny z cytralu w dawce 500 mg/kg/dzień obniża znacznie indeks hipoglikemiczny w obecności przeciwregulatorów, takich jak: glukan, kortyzol i katecholamina. Zauważono, że efekt hipolipidemiczny zmniejsza się w krwiobiegu przy niskim poziomie gęstości lipidów. Ekstrakty z trawy cytrynowej, w tym olejek eteryczny, rozluźniają różne tkanki, takie jak: krezka szczura, pierścienie aorty szczura i jelito kręte królika [38, 39]. Na przykład cytral powodował zależne od dawki rozluźnienie naczyń w pierścieniach aorty fenylefryny (wstępnie zwężonych) męskich SHR lub WKR [39]. Podobnie dożylnie podawanie cytronellolu (acykliczny monoterpeneoid) stworzyło odpowiedź hipotensyjną u szczurów Wistar. Czynniki takie jak: indometacyna, heksamton i atropina nie mają wpływu na ten typ odpowiedzi hipotensyjnej.

Istnieje wiele badań dotyczących inhibitorów glikozydazy jako potencjalnych środków przeciwcukrzycowych i przeciwzapalnych. Wśród tych inhibitorów szczególne zainteresowanie budzą inhibitory alfa-amylazy, z których większość to naturalne związki. Cytral, będący izoprenoidalnym składnikiem wielu olejków eterycznych, został zbadany pod względem swojego potencjału hamowania alfa-amylazy w modelu cukrzycy typu I *in vivo*. Wpływ cytralu został oceniony *in vitro* na aktywność alfa-amylazy ssaków przy użyciu metody Bernfelda. Wpływ cytralu na szczury cukrzycowe (Wistar) indukowane streptozotocyną został zbadany *in vivo*. Szczury bez cukrzycy i cukrzycowe otrzymały różne dawki cytralu (2, 8, 16 lub 32 mg/kg masy ciała), rozpuszczonego w oleju z nasion winogron. Grupy kontrolne otrzymały tylko olej z nasion winogron. Leczenie trwało przez 24 dni, po czym zwierzęta zostały poddane eutanazji w lekkim znieczuleniu eterowym. Zmierzone parametry obejmowały spożycie żywności, spożycie wody, objętość moczu (dziennie), poziom glukozy we krwi (co 2 dni), stężenia cholesterolu, triacylogliceroli oraz poziomy alfa-amylazy po 24 dniach. Stwierdzono, że cytral jest umiarkowanym inhibitorem alfa-amylazy ssaków, o wartości IC_{50} wynoszącej 120 μM , oraz że powoduje obniżenie poziomów alfa-amylazy *in vivo*. U szczurów cukrzycowych po

leczeniu cytralem zaobserwowano umiarkowane obniżenie glukozy po posiłku oraz normalizację profilu lipidowego we krwi. Ponadto zaobserwowano, że cytral może promować utratę masy ciała i zmniejszyć spożycie pokarmu. Na podstawie tych wyników można sugerować, że cytral może być potencjalnym środkiem przeciwyhyperlipidemicznym w cukrzycy i może zostać w przyszłości wykorzystany w terapiach przeciwko otyłości. Jednak konieczne są dalsze badania w celu pełnego zrozumienia profilu działania tego związku jako potencjalnego leku [40].

3. Wnioski

Cytral, będący składnikiem olejków eterycznych, ma wiele interesujących właściwości biologicznych. Związek ten wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne przeciwko wielu patogennym bakteriom, takim jak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Salmonella*. Może on być stosowany w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych i wspomagać proces gojenia się ran. Cytral wykazuje działanie przeciwwirusowe przeciwko takim wirusom jak wirus opryszczki, który jest odpowiedzialny za powstawanie opryszczki wargowej. Może hamować replikację wirusa i zmniejszać nasilenie objawów. Cytral wykazuje również aktywność przeciwpasożytniczą przeciwko niektórym pasożytom, takim jak pierwotniaki z rodzaju *Trypanosoma* i *Leishmania*. Może więc on pomóc w zwalczaniu chorób pasożytniczych. Cytral posiada właściwości przeciwutleniające, co oznacza, że może neutralizować działanie wolnych rodników i zmniejszać stres oksydacyjny w organizmie. Ta właściwość jest ważna dla utrzymania zdrowia i opóźnienia procesów starzenia. Badania sugerują, że cytral może wykazywać działanie przeciwnowotworowe, zwłaszcza w przypadku niektórych rodzajów nowotworów, takich jak: rak skóry, rak jelita grubego i rak piersi. Może on działać poprzez hamowanie wzrostu komórek nowotworowych i indukowanie ich apoptozy (programowanej śmierci komórki). Cytral wykazuje działanie przeciwzapalne, które może pomóc w łagodzeniu stanów zapalnych takich jak zapalenie stawów czy choroby skóry, gdyż związek ten hamuje uwalnianie substancji prozapalnych i zmniejsza reakcję zapalną w organizmie.

Literatura

1. Bauer K., Garbe D., Surburg H., *Common fragrance and flavor materials*, 5th ed., Wiley-VCH, Weinheim 2006, ISBN: 978-3-527-60789-1.
2. Kirk-Othmer, *Chemical technology of cosmetics*, John Wiley & Sons, 2012, ISBN: 978-1-118-40692-2.
3. Mimoun H., *Chimia*, 50, 1996, ISBN: 9781118406922.
4. Bonrath W., Kiwi-Minsker L., Iouranov I., Patent US 20130217923 A1, 2013.
5. Barel A.O., Paye M., Maibach H.I. (red.), *Handbook of cosmetic science and technology*, 3rd ed., Informa Healthcare, New York 2009, ISBN: 1-4200-6963-2.
6. Emura M., Matsuda H., *Factors affecting hydrogen adsorption in metal-organic frameworks: a short review*, *Nanomaterials*, 11, 2021, s. 1638.
7. Maswal M., Dar A., *Inhibition of citral degradation in an acidic aqueous environment by polyoxyethylene alkyl ether surfactants*, *Food Chem*, 138, 2013, s. 2356-2364.
8. Esterbauer H., Zollner H., Scholz N., *Reaction of glutathione with conjugated carbonyls*, *Naturforsch C*, 30, 1975, s. 466-473.
9. Diliberto J., Srinivas P., Overstreet O., Usha V., Burka L., Birnbaum L., *Metabolism of citral, an alpha,beta-unsaturated aldehyde, in male f344 rats*, *Drug Met Disp*, 18, 1993, s. 886-875.

10. Katsukawa M., Nakata R., Takizawa Y., Hori K., Takahashi S., Inoue H., *Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Mol Cell Biol Lipids*, 1801, 2010, s. 1214-1220.
11. Shen Y., Sun Z., Guo X., *Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- γ* , *Eur J Pharmacol*, 15, 2015, s. 45-51.
12. Tiwari M., Dwivedi U., Kakkar P., *Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by Cymbopogon citratus D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages*, *Food Chem Toxicol*, 48, 2010, s. 2913-2919.
13. Lee H., Jeong H., Kim D., Noh Y., Yuk D., Hong J., *Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264.7 cells*, *Arch Pharm Res*, 31, 2008, s. 342-349.
14. Zielińska A., Martins-Gomes C., Ferreira N., Silva A., Nowak I., Souto E., *Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®*, *Int J Pharm*, 553, 2018, s. 428-440.
15. Ponce-Monter H., Fernandez-Martinez E., *Spasmolytic and anti-inflammatory effects of Aloysia triphylla and citral, in vitro and in vivo studies*, *Journal of Smooth Muscle Research*, 46, 2010, s. 309-319.
16. Ling Q., Zhang B., Wang Y., *Chemical composition and antioxidant activity of the essential oils of citral-rich chemotype Cinnamomum camphora and Cinnamomum bodinieri*, *Molecules*, 27, 2022, s. 7356.
17. Devasagayam T., Tilak J., Boloor K., Sane K., Ghaskadbi S., Lele R., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*, *J Assoc Physicians India*, 52, 2004, s. 794-804.
18. Finkel T., *Oxygen radicals and signaling*, *Curr Opin Cell Biol*, 10, 1998, s. 248-253.
19. Thannickal V., Fanburg B., *Reactive oxygen species in cell signaling*, *Am J Phys Lung Cell Mol Phys*, 279, 2000, s. 1005-1028.
20. Mirghani M., Liyana Y., Parveen J., *Bioactivity analysis of lemongrass (Cymbopogon citratus) essential oil*, *Inter Food Res J*, 19, 2012, s. 569-575.
21. Bouzenna H., Hfaiedh N., Giroux-Metges M., Elfeki A., Talarmin H., *Biological properties of citral and its potential protective effects against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells*, *Biomed Pharmacother*, 87, 2017, s. 653-660.
22. Rabbani S., Devi K., Zahra N., *Anti-clastogenic effects of citral*, *Iran J Pharm Therap*, 4, 2005, s. 28-31.
23. Espina L., Berdejo D., Alfonso P., García-Gonzalo D., Pagán R., *Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling*, *Food Control*, 82, 2017, s. 256-265.
24. Grace T., Sweetser E., Nelson M., Ydens L., Skipper B., *Isokinetic muscle imbalance and knee-joint injuries. A prospective blind study*, *J Bone Joint Surg*, 1984, 66, s. 734-740.
25. Zhang Y., Wei J., *Antibacterial activity of essential oils against Stenotrophomonas maltophilia and the effect of citral on cell membrane*, *LWT*, 2020, s. 108667, ISSN 0023-6438.
26. Kang S., Li X., Xing Z., *Antibacterial effect of citral on Yersinia enterocolitica and its mechanism*, *Food Control*, 135, 2022, s. 108775, ISSN 0956-7135.
27. Zhang J., Du C., Li Q., *Inhibition mechanism and antibacterial activity of natural antibacterial agent citral on bamboo mould and its anti-mildew effect on bamboo*, *R Soc Open Sci*. 2021, 8(4), s. 202244.
28. Cristiane de Bona S., *Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against Candida spp.*, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12, 2008, s. 63-66.
29. Cai R., Hu R., Zhang Y., *Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against Zygosaccharomyces rouxii*, *LWT*, 106, 2019, s. 50-56, ISSN 0023-6438.

30. Ju J., Xie Y., Yu H., Guo Y., *Analysis of the synergistic antifungal mechanism of eugenol and citral*, LWT, 2020, s. 109128, ISSN 0023-6438.
31. Leite M., Bezerra A., *Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against Candida albicans*, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2014, s. 378280.
32. Ghosh K., *Anticancer effect of lemongrass oil and citral on cervical cancer cell lines*, Pharmacognosy Communications, 2013, s. 3-4.
33. Nordin N., *In vitro cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells*, Scientific Reports, 9(1), 2019, s. 1-19.
34. Bailly Ch., *Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereoisomers*, European Journal of Pharmacology, 871, 2020, s. 172945.
35. Thomas M., de Antueno R., Coyle K., Sultan M., Cruickshank B., Giacomantonio M., Giacomantonio C., Duncan R., Marcato P., *Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3*, Molecular Oncology, 10, 2016, s. 1485-1496.
36. Balusamy S., Perumalsamy H., Veerappan K., *Citral induced apoptosis through modulation of key genes involved in fatty acid biosynthesis in human prostate cancer cells: In silico and in vitro study*, BioMed Research International, 2020.
37. White B., Evison A., Dombi E., Townley H., *Improved delivery of the anticancer agent citral using BSA nanoparticles and polymeric wafers*, Nanotechnology, Science and Applications, 10, 2017, s. 163.
38. Bastos J., Moreira I., Ribeiro T., *Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol*, Basic Clin Pharmacol Toxicol, 106, 2010, s. 331-337.
39. Devi R., Sim S., Ismail R., *Effect of Cymbopogon citratus and citral on vascular smooth muscle of the isolated thoracic rat aorta*, Evidence-Based Compl Altern Med, 2012, s. 539475.
40. Najafian M., Ebrahim-Habibi A., Yaghmaei P., Parivar K., Larijani B., *Citral as a potential antihyperlipidemic medicine in diabetes: a study on streptozotocin-induced diabetic rats*, Iranian J Diab Lipid Dis, 10, 2011, s. 1-8.

Cytral – związek pochodzenia naturalnego o wielu zastosowaniach w medycynie – przegląd literaturowy

Streszczenie

Cytral, znany również jako geranial, to organiczny związek chemiczny występujący naturalnie w olejkach eterycznych wielu roślin, w tym w cytrynach, limonkach i innych cytrusach. Celem niniejszej pracy było przedstawienie najnowszych badań dotyczących aktywności biologicznej cytralu i jego zastosowań w medycynie. Posiada on wiele właściwości biologicznych, które mogą mieć korzystny wpływ na zdrowie. Cytral wykazuje aktywność przeciwbakteryjną i może być skuteczny w zwalczaniu różnych patogenów, takich jak bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie. Może pomóc w hamowaniu wzrostu i rozwoju niektórych szkodliwych bakterii. Niektóre badania sugerują, że cytral może wykazywać aktywność przeciwwirusową, zwłaszcza przeciwko wirusom grypy i wirusom opryszczki. Może mieć zdolność do hamowania replikacji tych wirusów. Cytral wykazuje działanie przeciwzapalne, które może pomóc w łagodzeniu stanów zapalnych w organizmie. Może mieć potencjał do zmniejszenia objawów zapalenia, takich jak ból, obrzęk i zaczerwienienie. Niektóre badania sugerują, że cytral może mieć potencjał przeciwnowotworowy. Wykazano, że ma działanie przeciwnowotworowe w stosunku do niektórych linii komórkowych nowotworowych, jednak potrzebne są dalsze badania, aby dokładniej zrozumieć jego mechanizmy działania i potencjał terapeutyczny. Cytral jest związkiem o właściwościach przeciwutleniających, co oznacza, że może pomagać w ochronie komórek przed uszkodzeniem spowodowanym działaniem wolnych rodników. Przeciwdziała stresowi oksydacyjnemu i może mieć korzystny wpływ na ogólną zdolność organizmu do zwalczania chorób.

Słowa kluczowe: cytral, neral, geranial, właściwości przeciwwgrzybicze, właściwości przeciwnowotworowe

Citral – a compound of natural origin with many applications in medicine – a literature review

Abstract

Citral, also known as geranial, is an organic chemical compound found naturally in the essential oils of many plants, including lemons, limes and other citrus fruits. The purpose of this paper was to present the latest research on the biological activity of citral and its applications in medicine. It has a number of medicinal properties that may have health benefits. Citral has antimicrobial activity and can be effective against various pathogens, such as Gram-negative and Gram-positive bacteria. It can help inhibit the growth and development of some harmful bacteria. Some studies suggest that citral may have antiviral activity, especially against influenza and herpes viruses. It may have the ability to inhibit the replication of these viruses. Citral shows anti-inflammatory activity, which may help relieve inflammation in the body. It may have the potential to reduce symptoms of inflammation, such as pain, swelling and redness. Some studies suggest that citral may have anti-cancer potential. It has been shown to have anti-tumor activity against some cancer cell lines, but more research is needed to further understand its mechanisms of action and therapeutic potential. Citral is a compound with antioxidant properties, meaning it can help protect cells from free radical damage. It counteracts oxidative stress and may have a beneficial effect on the body's overall ability to fight disease.

Keywords: citral, neral, geranial, antifungal properties, anticancer properties

Możliwości zastosowania Efektywnych Mikroorganizmów w rolnictwie

1. Wprowadzenie

Unikalność mikroorganizmów, ich nieprzewidywalna natura i zdolność biosyntezy, zależne w dużej mierze od warunków środowiskowych, sprawiły, że są one prawdopodobnymi kandydatami do rozwiązywania szczególnie trudnych problemów z różnych dziedzin nauki. W ostatnim czasie dużo uwagi przykuwa stan środowiska naturalnego. Spowodowane jest to nieświadomym zaburzaniem homeostazy biologicznej poprzez działalność człowieka [1].

Zmniejszenie ilości stosowanej chemii jest możliwe poprzez stosowanie coraz popularniejszego w Polsce i na świecie (Europa Zachodnia, Japonia, USA, Brazylia) preparatu mikrobiologicznego, jakim są Efektywne Mikroorganizmy (EM) [2]. Ostatnie kilkanaście lat wykazuje tendencję wzrostową do zastosowania biopreparatów z substancjami pochodzenia naturalnego. Celem tego działania staje się poprawa zdrowotności roślin, umożliwienie im lepszego pobierania substancji odżywczych, a w efekcie uzyskanie zwiększonego plonu [3].

Efektywne Mikroorganizmy tworzą wyselekcjonowane i odpowiednio dobrane najmniejsze organizmy na Ziemi. Kompozycja ponad 80 różnych szczepów mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych. Technologia EM opiera się na zaszczerpieniu gleby kulturami pożytecznych mikroorganizmów, aby stworzyć środowisko sprzyjające wzrostowi i zdrowiu rośliny [4].

W celu stowrzenia preparatów EM początkowo izolowano drobnoustroje z różnych ekosystemów, następnie mieszano je ze sobą. Jednak z powodu powtarzających się niepowodzeń wyeliminowano niektóre drobnoustroje, a prostsze mieszaniny, składające się głównie z bakterii kwasu mlekowego, fotosyntetyzujących bakterii i drożdży, utrzymywane w pH = 3,5 zostały przetestowane [5].

Według Iriti i wsp. [6] EM składają się głównie z bakterii kwasu mlekowego. Bakterie te pełnią ważne funkcje biotechnologiczne w rolnictwie, ponieważ wytwarzają środki przeciwdrobnoustrojowe i działają poprzez rozkład materii organicznej. Kwas mlekowy wytwarzany przez te bakterie rozpuszcza fosforan, który stanowi ważny składnik odżywczy dla wzrostu i rozwoju roślin [7].

Stosowanie preparatów EM to sposób na wzbogacenie i odnowę gleby poprzez naturalne przemiany biochemiczne. Wysoka aktywność bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*) sprzyja poprawie sterylności warunków glebowych, gdyż zapobiegają one namnażaniu się grzybów (*Fusarium* sp.), bakterii (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp.) i enterokoków. Bakterie fotosyntetyzujące (*Rhodospseudomonas palustris*,

¹ anna.piotrowska.pb@wp.pl, Szkoła Doktorska Politechniki Białostockiej, Katedra Technologii w Inżynierii Środowiska, <https://pb.edu.pl/>.

² d.boruszko@pb.edu.pl, Katedra Technologii w Inżynierii Środowiska, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku, Politechnika Białostocka, <https://pb.edu.pl/>.

Rhodobacter spae) wytwarzają w procesie częściowej fotosyntezy związki organiczne, w tym wolne aminokwasy, które są wykorzystywane przez drożdże (*Saccharomyces albus*, *Candida utilis*). Drożdże produkują substancje aktywne, które stymulują aktywność bakterii kwasu mlekowego i promieniowców (*Streptomyces albus*, *S. griseus*) o naturalnym działaniu antybiotycznym. Grzyby (*Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*) znacząco poprawiają jakość gleby, eliminując przykry zapach i przyspieszając rozkład materii organicznej. Dobór mikroorganizmów w EM nie jest przypadkowy, mikroorganizmy te często wykazują działanie symbiotycznie [8].

Mechanizm działania Efektywnych Mikroorganizmów jest odwzorowaniem naturalnych procesów występujących w przyrodzie. Drobnoustroje potrafią funkcjonować w różnych warunkach, jak zbiornik na gnojowicę, w osadach ściekowych pozostałych po oczyszczaniu ścieków, w wodzie oraz glebie. Posiadają również zdolność produkcji substancji uniemożliwiających funkcjonowanie patogenów grzybowych. Poszczególne grupy mikroorganizmów tworzą określone związki, które stanowią pokarm dla innych. W ten sposób dostarczany jest niezbędny pokarm do ciągłego rozwoju. Efektywne Mikroorganizmy, mając ciągły dostęp do pożywienia wydzielają witaminy, antyutleniacze oraz kwasy organiczne przyczyniające się do zmian morfologii gleby [9].

Celem pracy była ocena potencjału Efektywnych Mikroorganizmów w rolnictwie.

2. Korzyści ze stosowania EM w regeneracji gleby i uprawie roślin

Gleby są niezbędne do funkcjonowania ekosystemów lądowych, w tym kontroli klimatu, ilości i jakości wody, obiegu składników odżywczych oraz siedliska o ogromnej różnorodności biologicznej [10]. W tej różnorodności biologicznej populacje drobnoustrojów w glebie są zanurzone w ramach interakcji, które wpływają na rozwój roślin i jakość gleby, pełnią wiele funkcji i oferują wiele zasobów, w tym kontrolę cykli geochemicznych czy też usuwanie zanieczyszczeń [11].

Dodatkowo tekstura gleby, jako czynnik abiotyczny, wpływa na retencję i dostępność składników pokarmowych oraz zawartość wody, oddziałując tym samym na środowisko życia i aktywność metaboliczną mikroorganizmów. Co ważne, gleba jest głównym motorem tworzenia agregatów, substancje polimerowe wydzielane przez bakterie i grzyby działają jak klej, który aglomeruje cząstki nieorganiczne i materiał organiczny (proces, który może również zachodzić w ciele dżdżownicy, w jelitach), podczas gdy strzępki grzybów i korzenie roślin przyczyniają się do utrzymania agregatów razem. Różnorodność rozmiarów agregatów oraz przestrzeni porów skutkuje bardzo zróżnicowanymi mikrosiedliskami (lub niszami) dla drobnoustrojów glebowych [12].

Rola mikroorganizmów glebowych jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania i wysokiej produktywności gleby. O ich znaczeniu decyduje nie tylko ich duża liczebność, ale przede wszystkim aktywność metaboliczna [13].

Mikroorganizmy biorą udział w tworzeniu dobrej struktury gleby oraz przemianie najważniejszych dla roślin pierwiastków, tj. węgla, azotu, fosforu, potasu, siarki i żelaza. Wytwarzają różne substancje biologicznie czynne, wspomagają wzrost i rozwój roślin oraz stymulują ich odporność na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe [14].

Węgiel i azot z biomasy drobnoustrojów są uważane za najszerzej stosowane bioindykatory jakości gleby. Określone grupy mikroorganizmów wyizolowane z mikrobiomu glebowego mogą być również wykorzystane jako składniki ekologicznych biopreparatów stosowanych w ramach strategii zrównoważonego rolnictwa [15].

Spośród dostępnych na rynku bioproduktów zawierających aktywne komórki drobnoustrojów zarówno wśród rolników, jak i naukowców dużą popularnością cieszą się preparaty EM. Dodatek Efektywnych Mikroorganizmów do gleby stanowi korzystną praktykę, dzięki której jesteśmy w stanie poprawić strukturę gleby, prowadząc do zwiększenia jej żyzności. Wprowadzenie EM do gleby niesie za sobą korzyści w postaci:

- radykalnej poprawy bioróżnorodności;
- ograniczenia rozwoju patogenów glebowych;
- wiązania azotu w glebie;
- poprawy wchłaniania składników odżywczych;
- wspomaganie rozkładu odpadów organicznych, pozostałości i kompostu;
- wspomaganie aktywności lokalnych mikroorganizmów;
- przyczyniania się do rozkładu i fermentacji frakcji organicznej gleby [16].

EM są uważane za aktywatory gleby, które zmniejszają zapotrzebowanie na nawozy chemiczne i pestycydy, a poprawiają obieg składników odżywczych, skutkując zwiększoną rentownością gleby. EM mogą również pomóc w korygowaniu zaburzeń upraw spowodowanych niedoborami gleby, zwiększeniu dostępności składników odżywczych i pobieraniu składników odżywczych przez rośliny, poprawie kiełkowania nasion oraz wzrostu i rozwoju roślin, a także zwiększeniu plonów i jakości owoców. Mogą także poprawiać zdolność roślin do fotosyntezy i aktywność białek, przyspieszać rozkład odpadów organicznych w celu poprawy właściwości fizycznych i chemicznych gleby [17, 18].

3. Dodatek EM do kompostowania masy organicznej

Stosowanie EM podczas kompostowania jest również uważane za wysoce wydajną praktykę, ponieważ sprzyja produkcji różnych enzymów, co skutkuje lepszym tempem degradacji surowców. EM poprzez wydzielanie enzymów, które ułatwiają rozkład złożonych związków organicznych, umożliwiają uwolnienie składników odżywczych oraz tworzenie pruchnicy. Ponadto EM znajduje zastosowanie głównie w kompostowaniu odpadów wolnorozkładających się, takich jak odpady o wysokim stosunku C/N (zdrewniałe części roślin, słoma), trawy i tłuszcze. Nie tylko zastosowany surowiec, ale także mikrobiota zaangażowana w proces ma całkowity wpływ na jakość produkowanego kompostu [19].

Dodatek EM do substratu sprzyja degradacji organicznej w procesie kompostowania poprzez uwalnianie enzymów hydrolitycznych, które rozkładają złożone molekuly strukturalne, tworząc związki rozpuszczalne w wodzie [20, 21]. Oprócz metabolizowania związków organicznych EM wytwarzają proste związki nadające się do wykorzystania przez rośliny, które po dodaniu do gleby poprawiają wykorzystanie w rolnictwie i stabilizują naturalny ekosystem [22].

Badania przeprowadzone przez Fan i wsp. [23] wykazały, że kompostowanie z zastosowaniem EM wpłynęło na poprawę kontroli zapachu i kilku parametrów kompostu (procesu humifikacji, redukcji tłuszczu i zawartości azotu). Pushpa i wsp. [24] wykorzystali EM do porównania czterech dojrzałych kompostów otrzymanych z różnych odpadów organicznych, takich jak odpady kuchenne i odpady liściaste, a także odpady papierowe i hiacynt wodny. Wyniki pochodzące z każdego z czterech dojrzałych kompostów wykazały lepszą jakość.

Kumar i wsp. [25] porównali skuteczność EM i biokompostu w zwiększaniu rozkładu odpadów kokosowych. Pod koniec okresu ich badań zastosowanie Efektywnych

Mikroorganizmów obniżyło zawartość węgla organicznego o 30,97% i odnotowano najwyższą zawartość azotu ogólnego ($1,20\% \pm 0,024\%$), fosforu ($0,21\% \pm 0,003\%$) i potasu ($1,21\% \pm 0,016\%$). Ponadto namnażanie Efektywnych Mikroorganizmów było bardzo skuteczne, a dojrzałość kompostu została osiągnięta w 60. dniu przy stosunku CN 17,8 : 1. Test dojrzałości kompostu potwierdził również, że Efektywne Mikroorganizmy były skuteczniejsze niż biokompost w poprawie tempa degradacji odpadów kokosowych i produkcji dojrzałego kompostu dobrej jakości.

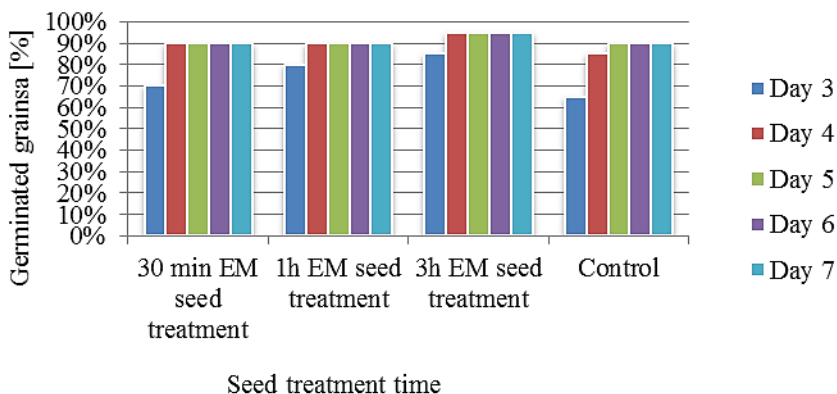
4. Zastosowanie EM w systemach rolniczych

Produkcja rolnicza w dużej mierze zależy od stanu gleby, który jest odzwierciedleniem złożonych oddziaływań biologicznych, chemicznych i fizycznych napędzanych przez mikroorganizmy. Efektywne Mikroorganizmy zwiększają populację pożytecznych drobnoustrojów w glebie, prowadząc do zrównoważonej produkcji roślinnej. Zastosowanie EM w rolnictwie może prowadzić do zwiększenia produktywności upraw, tworząc żyzne i produktywne środowisko glebowe. Stosowanie preparatów EM przyczynia się do doboru przodujących metod gospodarowania glebą, takich jak płodozmian, użycie organicznych ulepszaczy, uprawa konserwująca, recykling resztek plonów i biokontrola szkodników [26].

4.1. Zaprawianie nasion EM

Jakość nasion należy do kluczowych czynników determinujących rozwój, wzrost i plon roślin. Zaprawianie przedsiwne nasion ma na celu poprawę ich zdolności kiełkowania, a także wigoru siewek. Dzięki temu zabiegowi młode rośliny uzyskują większą odporność na stres środowiskowy, a co za tym idzie – zauważalny zostanie szybszy rozwój i większy wigor roślin [27, 28].

Piotrowska i wsp. w swoich badaniach wykazali, że zastosowanie preparatu EM w celu zaprawienia nasion w odpowiednim stężeniu preparatu i czasie zaprawiania ziarniaków powoduje przyspieszenie kiełkowania oraz zwiększa liczbę wykiełkowanych ziarniaków. Rysunek 1 przedstawia procentowe zestawienie wyników pomiarów siły kiełkowania ziarna po zaprawieniu roztworem 1% EM Naturalnie Aktywny. Po zaprawieniu ziarna 1% roztworem EM w czasie 3 h zaobserwowano 85% wschodów ziarniaka już na 3. dzień od założenia badania szalkowego, a to przyczyniło się do najszybszego skiełkowania pszenicy w porównaniu do kontroli oraz 30 min, 1 h zaprawiana ziarniaków [29].



Rysunek 1. Wykres zawierający procentowe zestawienie wyników pomiarów siły kiełkowania ziarna zaprawianego roztworem 1% EM Naturalnie Aktywny [29]

Ci sami autorzy w badaniach nad zaprawianiem nasion preparatem EM wykazali również, że ma on korzystny wpływ na ilość mikro- i makroelementów w roślinach. Najwyższe zawartości mikro- i makroelementów odnotowano w przypadku zaprawiania nasion optymalnym stężeniem EM wynoszącym 1% [30].

4.2. Zraszanie gleby lub dolistne opryski EM

Aplikacje glebowe i dolistne Efektownych Mikroorganizmów są skutecznym sposobem promowania wzrostu roślin, zwiększania pobierania składników odżywczych i zwiększania ogólnej produktywności upraw. Badania wykazały, że zaszczepienie ekosystemu gleba – roślina EM może poprawić jakość i zdrowie gleby, a także jakość plonów i wzrost. Aplikacje te wprowadzają korzystne mikroorganizmy bezpośrednio do gleby i liści roślin, tworząc środowisko sprzyjające interakcjom między roślinami a mikroorganizmami. Jedną z przyczyn tych efektów jest to, że bakterie fotosyntetyczne działają synergistycznie z innymi mikroorganizmami, wspierając zapotrzebowanie roślin na składniki odżywcze i ograniczając rozwój mikroorganizmów chorobotwórczych [31, 32].

Olle i in. [33] badali wpływ EM zastosowanego do gleby na wzrost, plonowanie, jakość i ochronę warzyw. Stwierdzili, że 70% opublikowanych badań na ten temat wykazuje pozytywny wpływ EM na wzrost roślin. Ci sami autorzy doszli do wniosku w innej pracy [5], że EM oddziałuje z ekosystemem gleba – roślina, tłumiąc patogeny roślin i czynniki chorobotwórcze, rozpuszczając minerały, oszczędzając energię, utrzymując równowagę mikrobiologiczną gleby, zwiększając fotosyntezę wydajności i wiązania azotu.

Wyniki badań uzyskane przez Piotrowską i wsp. wskazują na to, że wykorzystanie preparatu EM Naturalnie Aktywny, zawierającego pożyteczne mikroorganizmy, wpływa na tworzenie siedliska sprzyjającego rozwojowi roślin poprzez ułatwienie dostępności mikro- i makroelementów roślinom. Dzięki temu rośliny mają możliwość lepszej przyswajalności składników pokarmowych, co może sprawić, że roślina stanie się cenniejsza z punktu widzenia konsumenta. Spośród analizowanych mikroelementów, które przedstawia tabela 1, najczęstszy wzrost w obiektach podlewanych EM odnotowano dla miedzi. Największą zawartość miedzi, wynoszącą 201,53 $\mu\text{g/g}$ s.m. zaobserwowano w pszenicy rosnącej na podłożu najwyższej jakości podlewanym 1% roztworem EM Naturalnie Aktywny. Na tej samej glebie mniejszą zawartością miedzi charakteryzował się rzepak podlewany wodą, który zawierał 46,01 $\mu\text{g/g}$ s.m., a podlewany preparatem EM zawierał 74,01 $\mu\text{g/g}$ s.m. Spośród analizowanych makroelementów wzrostem fosforu w pszenicy i w rzepaku wykazało się 71,43% obiektów podlewanych EM. Nieco mniejszy wzrost w pszenicy oraz rzepaku odnotowano dla zawartości wapnia, magnezu oraz potasu (57,14% obiektów podlewanych EM) [34].

Tabela 1. Zawartość makro- i mikroelementów w roślinach

Obiekt	Makro- i mikroelementy							
	Mg	K	Ca	P	Zn	B	Mn	Cu
	mg/g s.m.				$\mu\text{g/g}$ s.m.			
R1	2,27	103,10	3,51	23,68	247,53	3,83	186,16	131,31
R2	2,66	92,76	3,88	26,46	170,90	9,65	218,82	201,53
R3	2,56	72,84	4,57	24,73	157,89	1,65	147,92	51,61
R4	3,12	78,18	5,93	30,93	129,45	13,41	184,73	126,76
R5	2,82	99,35	5,40	24,95	212,21	1,35	105,71	73,63
R6	2,89	92,68	5,13	24,49	167,51	2,29	117,70	24,09
R7	2,63	10,69	0,79	13,96	332,39	0,00	65,68	64,26

Możliwości zastosowania Efektywnych Mikroorganizmów w rolnictwie

R8	2,09	13,89	0,78	12,99	177,91	0,00	63,24	52,83
R9	7,46	121,89	16,24	15,79	151,84	21,20	304,35	46,01
R10	6,55	128,44	23,18	17,55	250,04	11,22	306,64	74,01
R11	6,46	107,52	26,79	17,62	186,68	53,34	214,64	58,64
R12	5,25	100,82	22,95	18,49	407,85	19,66	196,23	129,42
R13	6,54	104,35	21,70	17,35	146,56	27,5	111,16	20,47
R14	8,85	142,92	37,43	18,03	349,32	26,56	137,99	70,26

Źródło: opracowanie własne na podstawie [34].

Obiekty R4 (14-dniowa pszenica rosnąca na ziemi uniwersalnej podlewanej 1% roztworem EM Naturalnie Aktywny) oraz R14 (14-dniowy rzepak rosnący na podłożu ogrodniczym do wysiewu i pikowania podlewanym 1% roztworem EM Naturalnie Aktywny) wyróżniały się wzrostem zawartości 7 z 8 mikro- i makroelementów. Wzrost zawartości 75% mikro- i makroelementów zaobserwowano w obiekcie R2 (14-dniowej pszenicy rosnącej na podłożu najwyższej jakości podlewanym 1% roztworem EM Naturalnie Aktywny) oraz R10 (14-dniowym rzepaku rosnącym na uniwersalnym podłożu najwyższej jakości podlewanym 1% roztworem EM Naturalnie Aktywny) [34].

5. Podsumowanie i wnioski

Według niektórych danych literaturowych Efektywne Mikroorganizmy odnalazły swe zastosowanie w regeneracji gleby, uprawie roślin, jako dodatek EM do kompostowania masy organicznej czy też w zaprawianiu nasion. Rolnictwo, które wykorzystuje technologię EM, może liczyć na poprawę jakości i zdrowotności gleby, a także przyspieszenie kiełkowania oraz zwiększenie liczby wykiełkowanych ziarniaków. Dodatek EM wpływa korzystnie na tworzenie siedliska sprzyjającego rozwojowi roślin poprzez ułatwienie dostępności mikro- i makroelementów roślinom. Dzięki temu rośliny mają możliwość lepszej przyswajalności składników pokarmowych, co może sprawić, że roślina stanie się cenniejsza z punktu widzenia konsumenta. Potencjał EM w rolnictwie jest znaczny, natomiast nie stanowi on środka na wszystkie problemy produkcji roślinnej.

Literatura

1. Szymanek M., Dziwulska-Hunek A., Zarajczyk J., Michałek S., Tanaś W., *The influence of Red Light (RL) and Effective Microorganism (EM) application on soil properties, yield, and quality in wheat cultivation*, *Agronomy*, 10(8), 2020, s. 1201.
2. Kosicka D., Wolna-Maruwka A., Trzeciak M., *Wpływ preparatów mikrobiologicznych na glebę oraz wzrost i rozwój roślin*, *Kosmos*, 64(2), 2015, s. 332.
3. Gao C., El-Sawah A.M., Ali D.F.I., Alhaj Hamoud Y., Shaghaleh H., Sheteiwy M.S., *The integration of bio and organic fertilizers improve plant growth, grain yield, quality and metabolism of hybrid maize (Zea mays L.)*, *Agronomy*, 10(3), 2020, s. 319.
4. Ngueuleu D.A., Muyang R.F., Wamba F.O., Ngotta B.B., Tefouet V.D., Nyemene K.P.J., Asseng C.C., *Evaluation of soils fertility, growth, nutrient uptake and yield traits of peanut under indigenous and effective microorganism fertilizers in sandy ferrallitic soils in Douala, Cameroon*, *African Journal of Agricultural Research*, 17(3), 2021, s. 432-441.
5. Olle M., Williams I., *The influence of Effective Microorganisms on the growth and nitrate content of vegetable transplants*, *J. Adv. Agric, Technol*, 2(1), 2015, s. 1.
6. Iriti M., Scarafoni A., Pierce S., Castorina G., Vitalini S., *Soil application of Effective Microorganisms (EM) maintains leaf photosynthetic efficiency, increases seed yield and quality traits of bean (Phaseolus vulgaris L.) plants grown on different substrates*, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2019, s. 2327.

7. Cui Q., Xia J., Yang H., Liu J., Shao P., *Biochar and Effective Microorganisms promote Sesbania cannabina growth and soil quality in the coastal saline-alkali soil of the Yellow River Delta, China*, Science of the Total Environment, 756, 2021, s. 143801.
8. Pilarska A.A., Pilarski K., Wolna-Maruwka A., *The influence of Effective Microorganisms on the content of selected nutrients in vegetables*, Current Trends in Quality Science – Design, Quality and Safety of Products, 2021, s. 104-110.
9. Bhandari B.K., Babasaheb B., Pravin N., Shubham S., Nikhil S., *Review on domestic waste water treatment by using Effective Microorganisms technology*, IJSART, 6, 2021, s. 792-796.
10. Ramírez E., Prin J.L., de Astudillo L.R., *Evaluación del efecto de los microorganismos eficientes en el suelo usando microscopía electrónica de barrido analítica*, Acta Microscopica, 31(1), 2022, s. 63-71.
11. Seaton F.M., George P.B., Lebron I., Jones D.L., Creer S., Robinson D.A., *Soil textural heterogeneity impacts bacterial but not fungal diversity*, Soil Biology and Biochemistry, 144, 2020, s. 107766.
12. Tecon R., Or D., *Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil*, FEMS Microbiology Reviews, 41(5), 2017, s. 599-623.
13. Bickel S., Or D., *Soil bacterial diversity mediated by microscale aqueous-phase processes across biomes*, Nature Communications, 11(1), 2020, s. 116.
14. Ray P., Lakshmanan V., Labbé J.L., Craven K.D., *Microbe to microbiome: A paradigm shift in the application of microorganisms for sustainable agriculture*, Frontiers in Microbiology, 11, 2020, s. 622926.
15. Bünemann E.K., Bongiorno G., Bai Z., Creamer R.E., De Deyn G., De Goede R., Brussaard L., *Soil quality – a critical review*, Soil Biology and Biochemistry, 120, 2018, s. 105-125.
16. Joshi H., Somduttand C.P., Mundra S.L., *Role of Effective Microorganisms (EM) in sustainable agriculture*, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(3), 2019, s. 172-181.
17. Abd El-Mageed T.A., Rady M.M., Taha R.S., Abd El Azeam S., Simpson C.R., Semida W.M., *Effects of integrated use of residual sulfur-enhanced biochar with Effective Microorganisms on soil properties, plant growth and short-term productivity of Capsicum annuum under salt stress*, Scientia Horticulturae, 261, 2020, s. 108930.
18. Talaat N.B., Ghoniem A.E., Abdelhamid M.T., Shawky B.T., *Effective Microorganisms improve growth performance, alter nutrients acquisition and induce compatible solutes accumulation in common bean (Phaseolus vulgaris L.) plants subjected to salinity stress*, Plant Growth Regulation, 75, 2015, s. 281-295.
19. Begum N., Qin C., Ahanger M.A., Raza S., Khan M.I., Ashraf M., Zhang L., *Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance*, Frontiers in Plant Science, 10, 2019, s. 1068.
20. Begum N., Qin C., Ahanger M.A., Raza S., Khan M.I., Ashraf M., Ahmed N., Zhang L., *Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance*, Front. Plant Sci, 10, 2019, s. 1068.
21. Rastogi M., Nandal M., Khosla B., *Microbes as vital additives for solid waste composting*, Heliyon, 6(2), 2020, s. 3343.
22. Tarnabi Z.M., Iranbakhsh A., Mehregan I., Ahmadvand R., *Impact of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on gene expression of some cell wall and membrane elements of wheat (Triticum aestivum L.) under water deficit using transcriptome analysis*, Physiol. Mol. Biol. Plants, 2019, s. 1-20.
23. Van Fan Y., Lee C.T., Klemesš J.J., Chua L.S., Sarmidi M.R., Leow C.W., *Evaluation of Effective Microorganisms on home scale organic waste composting*, Journal of Environmental Management, 216, 2018, s. 41-48.
24. Pushpa T.B., Sekaran V., Sardhar Basha S.J., Jegan J., *Investigation on preparation, characterization and application of Effective Microorganisms (EM) based composts – an ecofriendly solution*, Nature Environment and Pollution Technology. An International Quarterly Scientific Journal, 15, 2016, s. 153.

25. Kumar P.A., Chozhan K., Dhevagi P., Mahimairaja S., Prabhu R., Poornima R., *A comparative study of Effective Microorganisms (EM) and biocompost in the decomposition of coconut waste material*, Journal of Applied and Natural Science, 14, 2022, s. 129-137.
26. Migdał W., Migdał Ł., *Od pola do stołu – wymagania konsumentów w stosunku do rolników*, Żywność: Nauka – Technologia – Jakość, 24, 2021, s. 41.
27. Rhodes L.A., McCarl B.A., *An analysis of climate impacts on herbicide, insecticide, and fungicide expenditures*, Agronomy, 10(5), 2020, s. 745.
28. Dziwulska-Hunek A., Szymanek M., Stadnik J., *Impact of pre-sowing red light treatment of sweet corn seeds on the quality and quantity of yield*, Agriculture, 10(5), 2020, s. 165.
29. Piotrowska A., Boruszko D., *Analysis of the influence of the application of Effective Microorganisms on the dynamics of spring wheat emergence*, Rocznik Ochrona Środowiska, 23, 2021, s. 684-693.
30. Piotrowska A., Boruszko D., *The effect of using Effective Microorganisms on the changes in the chemical composition of spring wheat*, Journal of Ecological Engineering, 23(6), 2022, s. 50-57.
31. Hidalgo D., Corona F., Martín-Marroquín J.M., *Manure biostabilization by Effective Microorganisms as a way to improve its agronomic value*, Biomass Conversion and Biorefinery, 12(10), 2022, s. 4649-4664.
32. Araujo Avila G.M. de, Gabardo G., Clock D.C., de Lima O.S. Jr., *Use of efficient microorganisms in agriculture*, Research, Society and Development, 10(8), 2021, s. 40610817515-40610817515.
33. Olle C., Williams Y., *Effective Microorganisms and their influence on vegetable production – a review*, J Horticult Sci Biotechnol, 88(4), 2013, s. 380-386.
34. Piotrowska A., Boruszko D., *Analysis of the potential of Effective Microorganisms in plant production*, Ekonomia i Środowisko (Economics and Environment), 83(4), 2022, s. 180-195.

Możliwości zastosowania Efektywnych Mikroorganizmów w rolnictwie

Streszczenie

Efektywne mikroorganizmy (EM) to mieszanina drobnoustrojów, która zyskuje światowe uznanie ze względu na potencjał w rozwiązywaniu różnych wyzwań w nauce i rolnictwie. Niniejsze badanie ma na celu ocenę potencjału EM w rolnictwie. Przegląd literatury obejmuje analizę wpływu EM na regenerację gleby, wzrost roślin, kompostowanie i zaprawianie nasion. Wyniki przedstawiają zdolność EM do poprawy stanu gleby, równowagi mikrobiologicznej i wchłaniania składników odżywczych, promując lepszą wydajność upraw. EM przyspieszają rozkład materii organicznej i uwalnianie składników odżywczych, podczas gdy zaprawianie nasion poprawia ich kiełkowanie. Pomimo swojego potencjału, EM nie są uniwersalnym lekarstwem na wszystkie problemy związane z rolnictwem. Okazują się cenne dla poprawy warunków glebowych i wspierania zrównoważonych praktyk, ale ich ograniczenia muszą być brane pod uwagę w ogólnych strategiach rolniczych.

Słowa kluczowe: Efektywne Mikroorganizmy, uprawa roślin, środowisko

Possibilities of using Effective Microorganisms in agriculture

Abstract

Efficient Microorganisms (EM) are advanced microorganisms that are gaining worldwide recognition for their potential to solve various problems in science and agriculture. This study aims to assess the potential of EM in agriculture. A literature review considered the effects of EM on grading, plant growth, composting and seed treatment. The results show EM to improve health because of microbial and nutrient absorption, promoting performance improvement. EM accelerates the decomposition of matter and the supply of nutrients, while treating the seeds improves their germination. Despite its potential, EM is not a universal cure for all agricultural problems. They prove useful for improving soil conditions and support sustainable practices, but their presence must be considered as part of agricultural strategies.

Keywords: Effective Microorganisms, plant cultivation, environment

Acmella oleracea – mało znana roślina zielarska

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach wśród konsumentów można zaobserwować wzrost zainteresowania kosmetykami i produktami leczniczymi, np. farmaceutykami, dermokosmetykami powstałymi na bazie roślin leczniczych. W związku z tym producenci wciąż szukają nowych, oryginalnych, często też egzotycznych surowców zielarskich, które pozwolą poszerzyć ich ofertę handlową i wyróżnić się na tle konkurencji. Jedną z roślin dostarczających tego typu surowiec jest mało znana *Acmella oleracea* z rodziny *Asteraceae*.

A. oleracea jest znana pod innymi nazwami, np. jambu, akmelia lub takimi, które odnoszą się bezpośrednio do jej wyjątkowych właściwości, np. roślina od bólu zęba, jeżówka elektryczna, znieczulecznik czy roślinny botoks. Najważniejszym metabolitem wtórnym obecnym w tym gatunku jest spilantol, należący do grupy N-alkiloamidów (NAA). Związek ten posiada właściwości przeciwbólowe i znieczulające, które znajdują zastosowanie w stomatologii. Dodatkowo może być wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym jako składnik preparatów przeciwzmarszczkowych i przeciwstarzeniowych, będąc alternatywą dla toksyny botulinowej, zwanej popularnie „botoksem” [1].

W fitoterapii wykorzystuje się ogromny potencjał terapeutyczny tego gatunku ze względu na silne działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne, antyoksydacyjne i przeciwgorączkowe. Działa również m.in. ochronnie na naczynia krwionośne [2].

Akmelia prawdopodobnie pochodzi z Brazylii i właśnie tam, oraz w Peru, została wprowadzona do uprawy. W dostępnych publikacjach naukowych trudno znaleźć konkretne informacje dotyczące zakładania i prowadzenia plantacji w warunkach naszego klimatu (w warunkach środkowej Polski). W związku z przypuszczalnym pochodzeniem rośliny i jej wymaganiami klimatycznymi, jako rośliny ciepłolubnej, istnieje dla niej realne zagrożenie wywołane wiosennymi przymrozkami. Są to warunki, w których z reguły zakładana jest plantacja z rozsady. Jest to jednak proces czasochłonny i kosztochłonny. Ponadto jednym z warunków wzrostu i rozwoju tej rośliny jest duża wilgotność podłoża. W niniejszej monografii podjęto próbę określenia wpływu gęstości siewu oraz terminu zakładania plantacji *A. oleracea* na plony ziela tej rośliny i obfitość kwitnienia.

Dokonano również oznaczenia wielkości genomu, co pozwoli na poszerzenie informacji z zakresu genetyki tego gatunku. W literaturze nie ma informacji dotyczących pomiaru 2C DNA w rodzaju *Acmella*, tym samym wydaje się istotne, aby badania z tego zakresu wykonywać. Znajomość wielkości genomu może być dodatkowym parametrem pozwa-

¹ emilka.adi@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologii BioX, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, al. prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, www.wrib.pbs.edu.pl.

² jedrzej@pbs.edu.pl, Koło Naukowe Biotechnologii BioX, Katedra Biotechnologii Rolniczej, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, al. prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, www.wrib.pbs.edu.pl.

³ jadviga.andrzejewska@pbs.edu.pl, Pracownia Produkcji Roślinnej i Doświadczalnictwa, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, al. prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, www.wrib.pbs.edu.pl.

lającym na identyfikację gatunkową oraz może stanowić podstawę do dalszych badań genetycznych, genomowych i biotechnologicznych w zakresie tego gatunku i rodzaju.

Celem badań było określenie właściwego terminu i gęstości siewu pozwalających uzyskać najwyższy plon ziela akmelii oraz najwyższą obfitość kwitnienia w warunkach środkowej Polski, a także pomiar zawartości jądrowego DNA.

2. Pochodzenie gatunku i morfologia

Do roślin z rodzaju *Acmella* należy 30 gatunków. Jedną z bardziej znanych roślin tego gatunku jest *Acmella oleracea* L. o synonimach: *Spilanthes acmella* L., *Spilanthes oleracea* L., akmelia, jambu, znieculecznik, jeżówka elektryczna czy roślina od bólu zęba. Aktualnie nie można jednoznacznie określić oryginalnego pochodzenia akmelii. Istnieją historyczne doniesienia o wprowadzeniu jej do uprawy na terenie Brazylii oraz Peru. Długoletnia uprawa przyczynia się do rozprzestrzenienia się rośliny w naturalnym środowisku. Około 1900 roku uprawa jambu została rozpowszechniona na terenie Afryki i lokalnie występuje tam do dzisiaj. W środowisku naturalnym rośnie w Afryce Wschodniej oraz w Brazylii i Peru. Obecnie roślina jest uprawiana na terenie Afryki, Ameryki Południowej oraz Azji Południowo-Wschodniej [3].

Acmella oleracea dorasta do wysokości około 30 cm (od 20 cm do 60 cm). Jest wiecznie zielona, jeśli jest odpowiednio zabezpieczana przed zimą. Bez odpowiedniej ochrony przed niskimi temperaturami nadziemne zielone części rośliny brązowieją, a kwiatostany obumierają. Pędy akmelii są wzniesione z tendencją do pokładania. Łodyga w barwach od zielonych po czerwone, a nawet brunatne, o gładkiej, nieowłosionej powierzchni. Liście są mięsiste, przeciwległe, ogonkowe o długości od 53 mm do 106 mm i szerokości od 40 mm do 79 mm. Liście mają nerwację pierzastą. U górnych liści ich podstawa się zwęża. Liście są nagoowłosione po obu stronach. Błazka liściowa ma ząbkowaną krawędź o kształcie szeroko jajowatym, zwężającym się do trójkątnego, o ostrym zakończeniu wierzchołka. Ogonki liściowe posiadają średnią długość od 20 mm do 65 mm, są spłaszczone i żłobione w górnej części. Ogonek jest wąsko uskrzydłony, nagi lub bardzo słabo owłosiony. Kwiatostan szypułkowy o wysokości od 10,5 mm do 23,5 mm i średnicy od 11 mm do 17 mm. Szypułki, których długość waha się w przedziale od 3,5 mm do 12,5 mm, są puste w środku. Kwiaty żółte z czerwonopurpurowym szczytem, obupłciowe i liczne. Dno kwiatowe jest kuliste lub stożkowate, białe i gąbczaste (fot. 1-3). Owocem są całobrzegie niełupki opatrzone puchem kielichowym, co jest charakterystyczne dla roślin z rodziny *Asteraceae*. *A. oleracea* nie ukorzenia się węzłowo, co wskazuje, że z małym prawdopodobieństwem będzie się rozprzestrzeniała w środowisku. Miejscami tworzą się korzenie rozłogowe (fot. 4) [3].

Roślina, jak i kwiaty nie wydzielają charakterystycznego zapachu. Można go jednak określić jako świeży, trawiasty, „zielony”. Natomiast smak rośliny można określić jako świeży i trawiasty. Jednak charakterystyczne jest odczucie mrowienia, drętwienia języka, dziąseł czy jamy ustnej. Osoby o wrażliwej skórze przy dłuższym bezpośrednim kontakcie z rośliną mogą odczuwać lekkie mrowienie np. na opuszkach palców. W obu przypadkach uczucie odrętwienia nie utrzymuje się długo. Po zjedzeniu jednego mniejszego liścia mrowienie utrzymuje się maksymalnie do 5 min (opis i obserwacje własne).



Fotografia 1. Kwiatostan *A. oleracea* w pełni kwitnienia oraz Fotografia 2. Przekwitanie kwiatostanów
[archiwum własne]



Fotografia 3. *A. oleracea* w pełni kwitnienia, pokrój rośliny oraz Fotografia 4. System korzeniowy *A. oleracea*
[archiwum własne]

3. Substancje czynne w roślinie

Podstawową i jednocześnie najważniejszą substancją biologicznie czynną w roślinach rodzaju *Acmella* jest spilantol, znany również jako affinin. Jest to metabolit wtórny z grupy *N*-alkiloamidów (NAA), związek amfilowy zbudowany z reszty 10-węglowego nienasyconego kwasu tłuszczowego, połączonego wiązaniem amidowym z łańcuchem

alifatycznym (2-metylopropylem). Spilantol występuje głównie w *A. oleracea*, ale w mniejszym stężeniu także w gatunkach z rodzaju *Acmella*: *A. brachyglossa*, *A. ciliate*, *A. oppositifolia*, *A. paniculata*, *A. radicans* i *Heliopsis longipes* [1].

Akmelia zawiera także znaczne ilości składników odżywczych, m.in: węglowodany (63,38%), błonnik (62,61%), białko (24,01%), popiół (10,92%), lipidy (1,54%). Spośród minerałów obecne są głównie: wapń (2551,56 mg/100 g), magnez (734 mg/100 g), miedź (2,09 mg/100 g). Występują też wolne aminokwasy: asparagina (32,01 mg/g), kwas glutaminowy (28,26 mg/g), walina (14,55 mg/g), izoleucyna (14,19 mg/g) [4].

Badanie przeprowadzone w 2019 roku przez Danielę A. Neves i wsp. miało na celu określenie wpływu gotowania na zawartość składników odżywczych w roślinie. Po tym procesie zaobserwowano wzrost ilości: popiołu, białka, nasyconych kwasów tłuszczowych oraz niektórych aminokwasów. Zwrócono uwagę na degradację węglowodanów, minerałów, błonnika, nienasyconych kwasów tłuszczowych i niektórych aminokwasów. Poziom lipidów oraz fitosteroli pozostały niezmiennione. Doświadczenie hydrotermalne dowiodło, że mimo częściowych strat substancji odżywczych, akmelia może stanowić alternatywę lub substytut dla warzyw tradycyjnych [5].

4. Zastosowanie

4.1. W fitoterapii

Informacje o korzyściach dla zdrowia, wynikających ze stosowania akmelii, można znaleźć w przekazach medycyny ludowej. W przeszłości stosowano ją głównie jako środek przeciwbólowy (przede wszystkim przy bólach zębów), środek znieczulający, przeciwgorączkowy i remedium na reumatyzm. Stąd pochodzi potoczna nazwa – roślina od bólu zęba. Obecnie w przemyśle dentystycznym roślina wykorzystywana jest również w leczeniu aft, paradontozy, infekcji i obrzęków dziąseł, a także do produkcji żeli, płynów do płukania jamy ustnej oraz jako składnik past do zębów [2].

Preparaty na bazie amelii znajdują szerokie zastosowanie w fitoterapii. Oprócz działania przeciwbólowego wykazują również bardzo silne działanie antyoksydacyjne, co zawdzięczają substancjom aktywnym takim jak: stigmasterol, glukozyd stigmasterylu, kwas wanilinowy, skopoletyna, kwas ferulowy. Kwas wanilinowy wykazuje również właściwości ochronne przed uszkodzeniami DNA, działa antymutagenie i immunostymulująco [2].

Produkty posiadające w swoim składzie ekstrakty z akmelii lub wyizolowany spilantol wspomagają gojenie ran, działają antyarytmicznie i ochronnie na naczynia krwionośne oraz zmniejszają agregację płytek krwi [2]. Ma również właściwości przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe i przeciwgruźlicze. Dodatkowo substancje bioaktywne zawarte w ekstraktach z *A. oleracea* wykazują działanie antynowotworowe, przeciwcukrzycowe, a także wspomagające w chorobach układu krwionośnego i neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimerera) [2].

W przytoczonym badaniu, mającym na celu sprawdzenie prozdrowotnego działania metabolitów wtórnych akmelii, udowodniono, że kwas 3-acetylauretyolowy posiada zdolność do hamowania topoizomazy 8 II DNA oraz ma silną aktywność cytotoksyczną wobec komórek ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc (A549). Co więcej, kwas 3-acetylauretyolowy wykazuje różnorodne właściwości biologiczne, w tym właściwości ograniczające wzrost np. *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty) i *Salmonella typhimurium* (salmonella) [2]. Według literatury stosowanie odwaru z korzenia *A. oleracea*

może działać przeczyszczająco. Ma też właściwości przeciwdziałające szkorbutowi i pobudzające trawienie. Ekstrakty z nadziemnych części roślin mają zastosowanie w przeciwdziałaniu malarii, są cytotoksyczne, wazorelaksacyjne (rozszerzające naczynia krwionośne) i moczopędne. Wodne i etanolowe ekstrakty z kwiatów zwiększają objętość moczu oraz wzrost poziomu jonów Na^+ , K^+ ; działają diuretycznie i ograniczają powstawanie kamieni w pęcherzu [6].

Akmelia jest również komponentem suplementów diety [2]. Oprócz tego ekstrakt akmelii, dodawany w małych ilościach, wykorzystywany jest jako słodzik [2].

Tak szeroki wachlarz właściwości prozdrowotnych akmelii powinien prowadzić do produkcji i wprowadzania na rynek farmaceutyczny nowych preparatów pochodzenia naturalnego [6].

4.2. W kosmologii

Acmella oleracea i izolowany z niej spilantol znajdują zastosowanie również jako składniki produktów kosmetycznych, przeciwstarzeniowych i przeciwzmarszczkowych, do pielęgnacji twarzy. Badania *in vitro* i *in vivo* potwierdzają, że spilantol ma dobrą biodostępność i swobodnie przenika przez wszystkie warstwy skóry, umożliwiając substancji dotarcie do mięśni. Ponadto na podstawie badań dermatologicznych udokumentowano [1], że zmniejsza, a w niektórych przypadkach nawet hamuje, skurcz mięśni podskórnych, pomagając zredukować zmarszczki mimiczne w obszarach wrażliwych (usta, oczy, czoło) poprzez rozluźnienie ich napięcia. Stosowanie odpowiednio wysokiego stężenia ekstraktu z akmelii bezpośrednio wpływa na poprawę gęstości, jędrności i gładkości skóry, co wpływa na zmniejszenie widoczności i wygładzenie zmarszczek. W literaturze można znaleźć porównania spilantolu i toksyny botulinowej ze względu na podobne działanie. Spilantol określany jest też mianem „roślinnego botoksu”, a istotną różnicą jest czas i intensywność działania preparatów na bazie rośliny i botoksu. Botoks, czyli toksyna botulinowa, jest otrzymywany z beztlenowych bakterii, laseczek jadu kiełbasianego (*Clostridium botulinum*). W produktach anti-aging i anti-wrinkle zawierających spilantol stymuluje on fibroblasty do produkcji kolagenu i elastyny w skórze właściwej. Jednocześnie działa jako antyoksydant [1, 7].

Badania nad bezpieczeństwem stosowania produktów farmaceutycznych, fitofarmaceutycznych, spożywczych i kosmetycznych na bazie *A. oleracea* lub spilantolu zostało potwierdzone przez licznych naukowców [8]. Testy na fibroblastach ssaków i komórkach mikrogleju wykazują niski poziom cytotoksyczności i jednocześnie jest to powiązane z działaniem przeciwzapalnym [8].

4.3. W ochronie roślin

W ludowych doniesieniach istnieją informacje o wykorzystywaniu akmelii do zwalczania roztoczy, owadów oraz pasożytów. Badania mające na celu potwierdzenie tych relacji przeprowadzono na roślinach uprawianych w środkowych Włoszech [9]. Eksperyment miał na celu przetestowanie działania owadobójczego na filariozie, przeciwko komarom domowym (*Culex quinquefasciatus*), muchom domowym (*Musca domestica*) i sówce bawełnowce egipskiej (*Spodoptera littoralis*). Preparaty najlepiej poradziły sobie z ograniczeniem ilości: komara domowego oraz larwy sówki bawełnowki egipskiej w trzecim stadium rozwoju. Eksperyment potwierdził domysły o zastosowaniu spilantolu jako skutecznego środka owadobójczego, co może z dużą prawdopodobnością przyczynić

się do wprowadzenia tego typu preparatów na rynek nowych ekologicznych środków do ochrony roślin [9].

W innych doniesieniach [10] opisano działanie roztoczebójcze, głównie na niektóre gatunki kleszczy. W tych badaniach naukowcy wykorzystali zdolność spilatolu do łatwego przenikania do mięśni i zaobserwowali zakłócenia w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego.

5. Agrotechnika

A. oleracea w klimacie tropikalnym jest uznawana za roślinę wieloletnią. Uprawiana w klimacie umiarkowanym jest rośliną jednoroczną bądź wieloletnią, jeśli jest chroniona przed zimmem (np. pod szkłem). Roślina preferuje gęste nasadzenia z ekspozycją na pełne nasłonecznienie, chociaż toleruje półcień. Najkorzystniejszymi warunkami są wilgotne lub bardzo wilgotne stanowiska. W warunkach naturalnych zajmuje siedliska wzdłuż jezior, rzek i bagien. Występuje również na zachwaszczonych siedliskach. Musi być systematycznie podlewana, bo inaczej szybko więdnie, wysusza się i nie podejmuje dalszego wzrostu, co doprowadza do obumierania rośliny. Gleba powinna być żyzna, gliniasta i bogata w substancje odżywcze. Natomiast uprawy powinny być zakładane na niskich, otwartych przestrzeniach, ale nie wyżej niż 1200 m n.p.m. W klimacie umiarkowanym plantacje zakłada się w drugiej połowie kwietnia lub w pierwszej połowie maja [4].

Obecnie nie ma doniesień na temat chorób atakujących *A. oleracea*. Jedyne zagrożenie może wynikać z dużej wilgotności gleby, szczególnie w miejscach zacienionych. Może to doprowadzić do gnicia martwych już części roślin. Konieczne jest zatem ich systematyczne usuwanie. Jedyne szkodnikami żerującymi na tej roślinie są ślimaki, które atakują liście [11].

Dostępne informacje o podstawach agrotechniki, przystosowane do warunków panujących w Polsce, nie są oparte na ścisłych doświadczeniach polowych, a przeważnie na obserwacjach. Opisane wyżej wymagania odnoszą się do warunków naturalnego występowania rośliny.

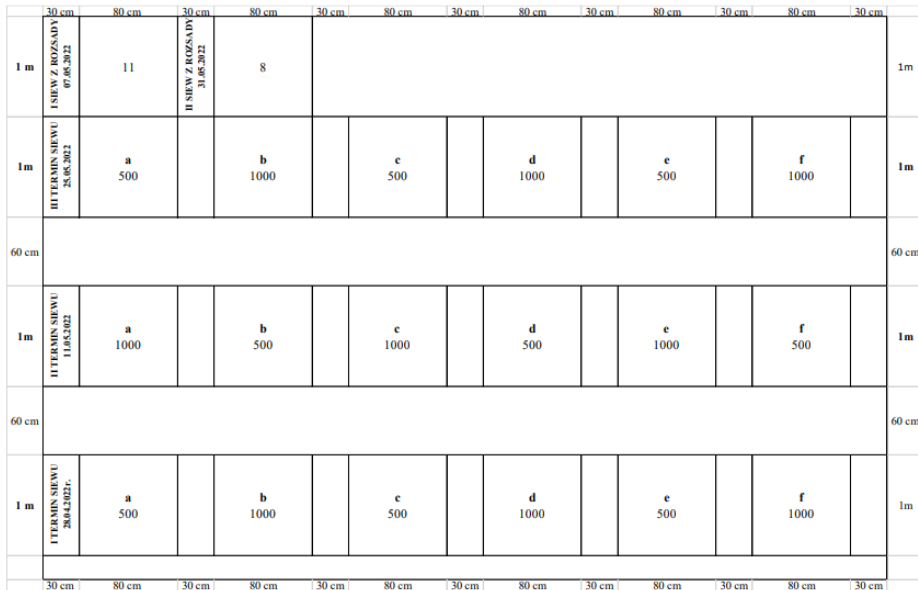
Akmelia może być rozmnażana przez wysiew nasion wczesną wiosną lub przez sadzonki pobrane w połowie lata. Nasiona należy namoczyć w wodzie na 24 godziny przed wysianiem do dużego pojemnika. Zalecana jest mieszanina piasku i odkwaszonego torfu w stosunku 1 : 1. Ważne jest, aby nasiona wysiewać płytko i następnie obficie podlać, a na końcu przykryć np. kawałkiem szyby lub kawałkiem przezroczystej folii z otworami, żeby nie utrudniać dostępu do światła. Bardzo ważne jest utrzymanie stałej wilgotności i temperatury, około 24°C. Takie warunki gwarantują szybkie wschody siewek, nawet już po kilku dniach. Gdy siewki akmelii osiągną ilość od 2 do 3 liści, należy przesadzić je do mniejszych doniczek produkcyjnych z otworami na dnie. Podczas wykonywania tej czynności trzeba zachować szczególną ostrożność z uwagi na bardzo słaby system korzeniowy i kruchość rośliny. Po „zimnych ogrodnikach” (druga połowa maja), gdy nie ma już zagrożenia przymrozkami, a roślina wykształciła mocny system korzeniowy, można ją wysadzić na stałe miejsce. Akmelia zacznie się rozrastać na szerokość i wysokość do około 20-30 cm. Wymaga stałego podlewania [12].

6. Materiał i metody

Materiał siewny pochodził od producenta: Adaptogeny Rzeszów. Doświadczenie zostało założone w Bydgoszczy (53°17'N, 18°05'E) na terenie Rodzinych Ogrodów Działkowych „TRANSPORTOWIEC”, na glebie lekkiej, o bardzo wysokiej zasobności

w przyswajalne formy fosforu i magnezu, średniej zasobności w przyswajalne formy potasu, zawartości substancji organicznej na poziomie 2,88% i odczynie obojętnym (pH od 7,0 do 7,3). Na całej powierzchni pola doświadczalnego założono nawadnianie kropelkowe. Schemat doświadczenia obejmował trzy terminy siewu: I – 28.04.2022; II – 11.05.2022; III – 25.05.2023 oraz dwie gęstości siewu: A – 500 nasion na jeden bieżący metr rzędu; B – 1000 nasion na jeden bieżący metr rzędu.

Dodatkowo jako tło na dwóch poletkach założono uprawę akmelii z rozsady. Posadzone były w dwóch terminach (7.05.2022 i 31.05.2022). W pierwszym terminie rośliny rozsady zostały posadzone w ilości 11 sztuk (w 4 rzędach: 3–3–3–2), rośliny w drugim terminie zostały posadzone w ilości 8 sztuk (w 3 rzędach: 3–3–2), w odstępach co 20 cm. Schemat doświadczenia przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat doświadczenia [opracowanie własne]

6.1. Zbiór roślin i suszenie ziela

Zbiór wykonano 6 września 2022 poprzez ścięcie roślin na wysokości od 3 cm do 4 cm od powierzchni gleby. Ziele suszono dwuetapowo: w sposób naturalny przez około 2,5 tygodnia (rozłożone na blacie w laboratorium, osłonięte od bezpośredniego promieniowania słonecznego). W drugim etapie rośliny umieszczono w suszarce i dosuszono w temperaturze 40°C przez 2 godziny.

6.2. Pomiar zawartości jądrowego DNA

Próby do analiz cytometrycznych przygotowano zgodnie z protokołem Galbraith'a i wsp. [13]. Jako standard wewnętrzny użyto liści kukurydzy (*Zea mays* 5,43 pg/2C) [14] Nasiona akmelii i standardu wewnętrznego umieszczono na płytce Petriego i zalano 1 ml buforu Galbraith'a [14] z dodatkiem 50 µg/ml RNAzy, 50 µg/ml jodku propidyny (PI) i 1% PVP-10 (poliwinylpirolidon). Materiał roślinny rozdrabniano żyletką, a otrzymaną zawiesinę jąder komórkowych przesączano przez filtr o średnicy oczek 50 µm i inkubowano przez 10 min w lodzie w celu lepszego wnikięcia barwnika. Analizę wykonano

w 5 powtórzeniach. W każdej próbie analizowano około 7000 jąder przy użyciu cytometru przepływowego CyFlow Ploidy Analyser (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Niemcy). Histogramy ewaluowano przy użyciu programu CyFlow Cube (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Niemcy). Wielkość genomu obliczono na podstawie proporcjonalnej zależności pomiędzy średnią pozycją pików akmelii oraz kukurydzy.

7. Wyniki

7.1. Doświadczenie polowe

W trakcie wegetacji roślin wykonano trzy pomiary każdej z cech (24.07.2022, 10.08.2022, 5.09.2022). Przeprowadzono następujące pomiary: wysokość roślin, liczba kwiatów na poletku oraz plon suchej masy po zbiorze.

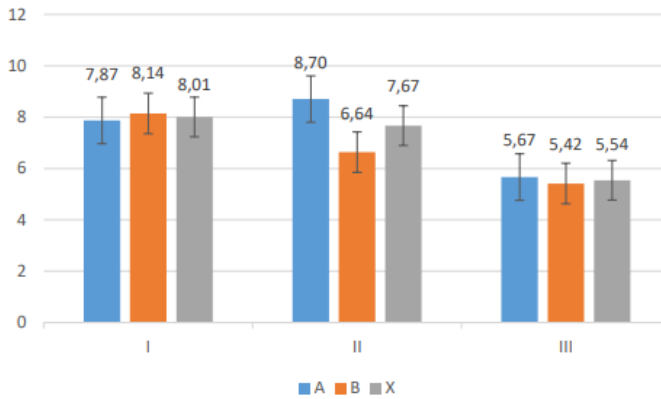
Wschody roślin trwały stosunkowo długo. Nasiona wysiane 28 kwietnia zaczęły wschodzić po okresie od 6 do 7 tygodni. Późniejsze siewy spowodowały, że wschody pojawiły się po 5 tygodniach. Po miesiącu wegetacji pojawiły się pierwsze kwiaty. Kwitnienie trwało do momentu zbioru, tj. do 6 września 2022 roku. Rośliny z najwcześniejszego terminu siewu były wtedy w końcowej fazie kwitnienia, a z późniejszych terminów siewu w fazie pełni kwitnienia (tab. 1).

Tabela 1. Fazy rozwojowe *A. oleracea*

Fazy rozwojowe rośliny	I termin	II termin	III termin
Pierwsze wschody	2 tydzień czerwca (od 6 do 12.06.2022)	3 tydzień czerwca (od 13 do 19.06.2022)	5 tydzień czerwca / 1 tydzień lipca (od 27.06. do 1.07.2022)
Początek kwitnienia	2 tydzień lipca (od 4 do 10.07.2022)	3 tydzień lipca (od 11 do 17.07.2022)	4 tydzień lipca (od 18 do 24.07.2022)
Pełnia kwitnienia	5 tydzień lipca (od 25 do 31.07.2022)	2 tydzień sierpnia (od 8 do 10.08.2022)	5 tydzień sierpnia / 1 tydzień września (29.08. – 04.09.2022)
Koniec kwitnienia	1 tydzień września (od 1 do 4.09.2022)	–	–

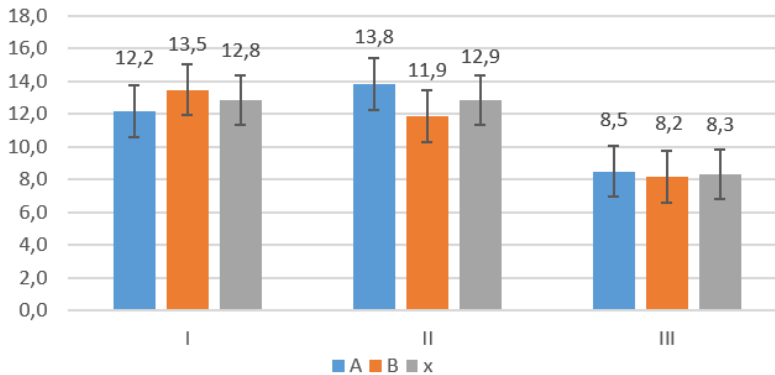
Źródło: opracowanie własne.

Pierwszy pomiar wysokości roślin wykonano 24 lipca 2022 roku, czyli w zależności od terminu siewu po 2, 2,5 i 3 miesiącach wegetacji (wykres 1). Średnia wysokość wysianych roślin w pierwszym terminie (28 kwietnia 2022 roku) wynosiła 8,01 cm, a w drugim terminie (11 maja 2022 roku) 7,67 cm, ale różnica ta nie była statystycznie istotna. Opóźnienie terminu siewu do 25 maja 2022 roku spowodowało, że rośliny były znacząco niższe (5,54 cm). Wpływ gęstości siewu zaznaczył się tylko na roślinach akmelii z drugiego terminu siewu – gęstszy siew spowodował, że rośliny były istotnie niższe od tych z siewu rzadszego.



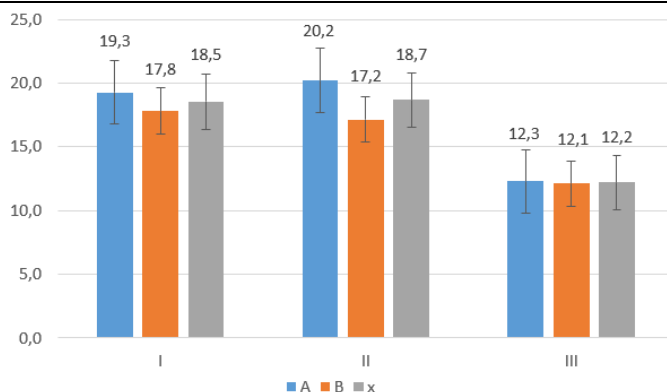
Wykres 1. Wysokość roślin akmelii (cm) w dniu 24 lipca 2022 roku w zależności od terminu (I, II, III) i gęstości siewu (A, B, X) [opracowanie własne]

Drugi pomiar wysokości roślin wykonano po kolejnych trzech tygodniach wegetacji (wykres 2). Średnia wysokość roślin wysianych w pierwszym terminie (28 kwietnia 2022 roku) wynosiła 12,8 cm, a w drugim terminie (11 maja 2022 roku) 12,9 cm. Opóźnienie terminu siewu do 25 maja 2022 roku spowodowało, że rośliny były znacząco niższe (8,3 cm). Wpływ gęstości siewu zaznaczył się na roślinach z pierwszego i drugiego terminu siewu. Pierwszy termin siewu – gęstszy siew spowodował, że rośliny akmelii były średnio o 1,3 cm wyższe od roślin sianych w rzadszej obsadzie. Drugi termin siewu – gęstszy siew spowodował, że rośliny akmelii były o 1,9 cm niższe od roślin sianych w rzadszej obsadzie. Nie były to jednak różnice statystycznie istotne.



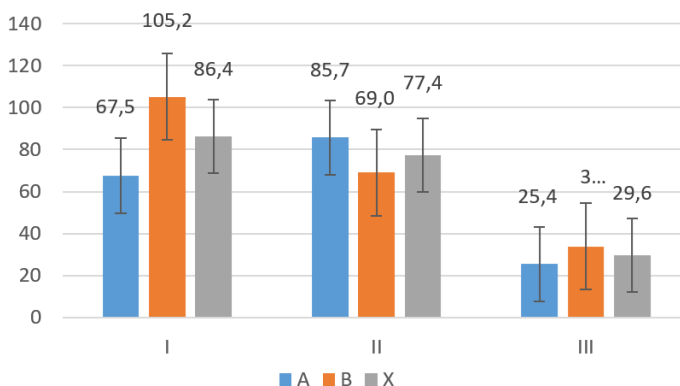
Wykres 2. Wysokość roślin akmelii (cm) w dniu 10 sierpnia 2022 roku w zależności od terminu (I, II, III) i gęstości siewu (A, B, X) [opracowanie własne]

Trzeci pomiar wysokości roślin wykonano po kolejnych 26 dniach wegetacji (wykres 3). Średnia wysokość roślin wysianych w pierwszym terminie (28 kwietnia 2022 roku) wynosiła 18,5 cm, a w drugim terminie (11 maja 2022 roku) 18,7 cm. Opóźnienie terminu siewu do 25 maja 2022 roku spowodowało, że rośliny były znacząco niższe (średnia ich wysokość wynosiła 12,2 cm). Zwiększenie gęstości siewu skutkowało tym, że rośliny z pierwszego terminu siewu były niższe o 1,5 cm, a z drugiego o 3 cm niższe w porównaniu do roślin wysianych rzadziej.



Wykres 3. Wysokość roślin akmelii (cm) w dniu 5 września 2022 roku w zależności od terminu (I, II, III) i gęstości siewu (A, B, X) [opracowanie własne]

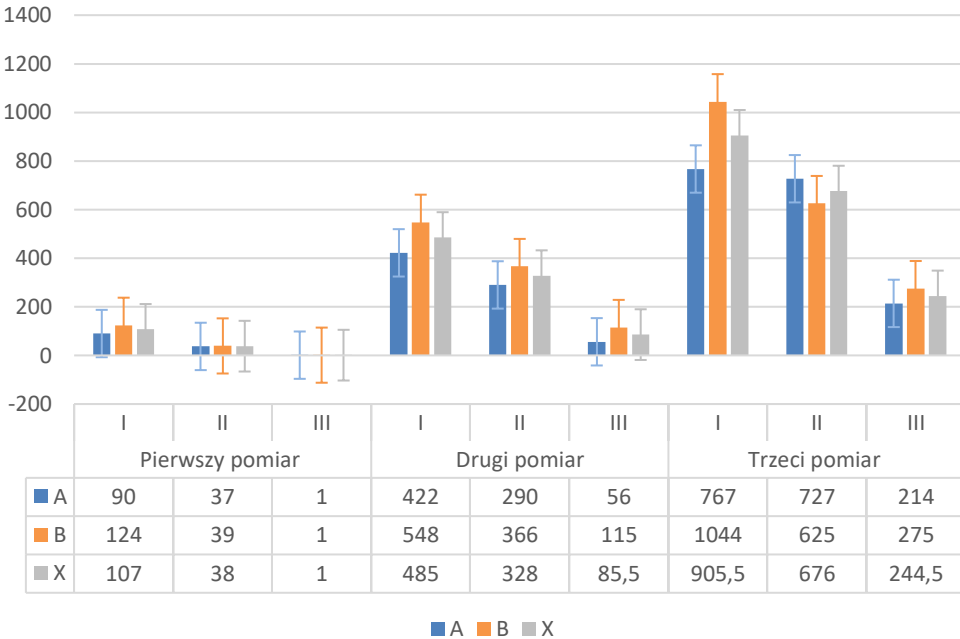
Średni plon suchej masy z roślin wysianych w pierwszym terminie (24 kwietnia 2022 roku) wynosił 86,4 g, a w drugim terminie (11 maja 2022 roku) 77,4 g, ale różnica ta nie była statystycznie istotna (wykres 4). Opóźnienie terminu siewu do 25 maja 2022 roku spowodowało, że plon suchej masy był znacząco niższy (29,6 g). Wpływ gęstości siewu na plon suchej masy zaznaczył się szczególnie w pierwszym terminie siewu, kiedy plon suchej masy roślin wysianych gęściej był istotnie wyższy niż wysianych rzadziej. W drugim terminie siewu zależność była odwrotna, choć mieściła się w granicach błędu statystycznego. W trzecim terminie wpływ gęstości siewu na plon suchej masy roślin był niewielki, także mieszczący się w granicach błędu.



Wykres 4. Plon suchej masy roślin akmelii [g] w zależności od terminu (I, II, III) i gęstości siewu (A, B, X) [opracowanie własne]

Obfitość kwitnienia rosła wraz z rozwojem roślin akmelii w okresie od lipca do września (wykres 5). W każdym z tych miesięcy najwięcej kwiatów miały rośliny z najwcześniejszego, a najmniej z najpóźniejszego terminu siewu. Pomiar wykonany we wrześniu wykazał, że gdyby liczbę kwiatów na 1 m² z roślin wysianych w kwietniu (I termin siewu) przyjąć za 100% (905,5 kwiatów na 1 m²), to drugi termin siewu wpłynie na obniżenie liczby kwiatów o 25% (676 kwiatów na 1 m²), a trzeci aż o 87% (244,5 kwiatów na 1 m²).

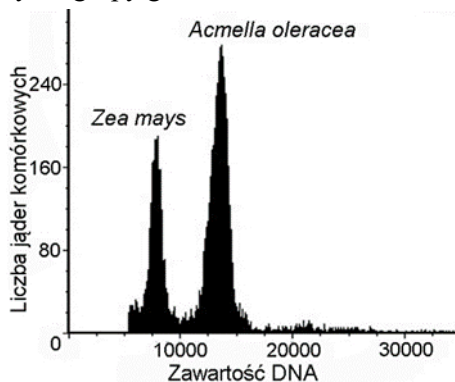
Gęstszy siew roślin wysianych najwcześniej sprzyjał obfitości kwitnienia, co szczególnie uwidoczniło się podczas wykonywania trzeciego pomiaru (we wrześniu), kiedy także potwierdzono to statystycznie.



Wykres 5. Liczba kwiatów akmelii na 1 m² w zależności od terminu (I, II i III) i gęstości siewu (A, B) w kolejnych terminach pomiaru [opracowanie własne]

7.2. Pomiar zawartości jądrowego DNA

Wielkość genomu dla *Acmella oleracea* wyniosła 9,4 pg/2C, co odpowiada 9193 Mpz (1pg 2C DNA = 978 Mpz) [15]. Histogramy były dobrej jakości, a średnia wartość CV (współczynnik wariancji) wyniosła 5,9 (rys. 2). Zgodnie z klasyfikacją Soltis i wsp. [16] genom *A. oleracea* należy do grupy genomów średnich.



Rysunek 2. Histogram zawartości jądrowego DNA dla *A. oleracea* [opracowanie własne]

8. Wnioski/Podsumowanie

- Najkorzystniejszym terminem siewu akmelii uprawianej w celu pozyskania kwitnącego ziela w warunkach środkowej Polski była druga połowa kwietnia.
- Opóźnienie terminu siewu do połowy maja miało niewielki wpływ na wysokość roślin i plony ziela, ale zmniejszyła się wtedy obfitość kwitnienia.
- Zwiększenie gęstości siewu z 500 do 1000 nasion na jeden metr bieżący zwiększyło obfitość kwitnienia, ale miało niejednoznaczny wpływ na wysokość roślin i plon suchej masy ziela.
- W warunkach środkowej Polski bardziej uzasadnione jest zakładanie plantacji produkcyjnej akmelii z siewu niż z rozsady ze względu na wyższe plonowanie i obfitość kwitnienia.
- Wielkość genomu dla *A. oleracea* została określona po raz pierwszy.
- Oznaczona zawartość jądrowego DNA akmelii wzbogaci międzynarodową bazę danych wielkości genomu (Plant DNA C-values Database) i będzie mogła być wykorzystana przez innych badaczy.

Literatura

1. Grymel M., *Charakterystyka i zastosowanie spilantolu w kosmetologii*, Aesth Cosmetol Med., 10(3), 2021, s. 101-108.
2. Prachayasittikul S., Suphamong S., Worachartcheewan A., Lawung R., Ruchirawat S., Prachayasittikul V., *Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr*, Molecules (Basel, Switzerland), 14(2), 2019, s. 850-867.
3. Jansen R.K., *The systematics of *Acmella* (Asteraceae-Heliantheae)*, Systematic Botany Monographs, 1985, s. 1-115.
4. Uthpala T.G.G., Navaratne S.B., *Acmella oleracea Plant; identification, applications and use as an emerging food source – review*, Food Reviews International, 37(4), 2021, s. 399-414.
5. Neves D.A., Schmiele M., Pallone J.A.L., Orlando E.A., Risso E.M., Cunha E.C.E., Godoy H.T., *Chemical and nutritional characterization of raw and hydrothermal processed jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen)*, Food Res Int, 116, 2019, s. 1144-1152.
6. Sahu J., Jain K., Jain B., Sahu R.K., *A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella**, Pharmacologyonline, 2, 2011, s. 1105-1110.
7. Mrozek-Szetela A., *Acmella oleracea – czy natura znalazła alternatywę dla botoksu?*, Herbalism, 1(1), 2015, s. 84-10.
8. Spinozzi E., Pavela R., Bonacucina G., Perinelli D.R., Cespi M., Petrelli R., Cappellacci L., Fiorini D., Scortichini S., Garzoli S., Angeloni C., Freschi M., Hrelia S., Quassinti L., Bramucci M., Lupidi G., Sut S., Dall'Acqua S., Benelli G., Canale A., Drenaggi E., Maggi F., *Spilanthol-rich essential oil obtained by microwave-assisted extraction from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen and its nanoemulsion: Insecticidal, cytotoxic and anti-inflammatory activities*, Industrial Crops and Products, 172, 2021, s. 114027.
9. Benelli G., Pavela R., Drenaggi E., Maggi F., *Insecticidal efficacy of the essential oil of jambú (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) cultivated in central Italy against filariasis mosquito vectors, houseflies and moth pests*, Journal of Ethnopharmacology, 229, s. 272-279.
10. Spinozzi E., Ferrati M., Baldassarri C., Cappellacci L., Marmugi M., Caselli A., Benelli G., Maggi F., Petrelli R., *A review of the chemistry and biological activities of *Acmella oleracea* („jambú”, Asteraceae), with a view to the development of bioinsecticides and acaricides*, Plants, 11(20), 2022, s. 2721.
11. Hind N., Biggs N., *Plate 460. *Acmella oleracea* compositae*, Curtis's Botanical Magazine, 20(1), 2003, s. 31-39.
12. <http://adaptogeny.rzeszow.pl/> [data dostępu: 24.01.2023.]

13. Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E., 1983. *Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues*, Science, 220(4601), s. 1049-1051.
14. Lysak M.A., Doležel J., *Estimation of nuclear DNA content in Sesleria (Poaceae)*, Caryologia, 52, 1998, s. 123-132.
15. Doležel J., Bartoš J., *Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size*, Annals of Botany, 95, 2005, s. 99-110.
16. Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett D., Leitch I.J., *Evolution of genome size in the angiosperms*, American Journal of Botany, 2003, 90(11), s. 1596-1603.

***Acmella oleracea* – mało znana roślina zielarska**

Streszczenie

Acmella oleracea L. (akmelia) należy do rodziny *Asteraceae* i prawdopodobnie pochodzi z Brazylii. W Polsce jest rośliną mało znaną, chociaż wykorzystywana jest w fitoterapii, kosmetologii, stomatologii, a także w ochronie roślin. Podstawową substancją czynną jest spilantol, który wykazuje m.in. silne działanie znieczulające, przeciwbólowe i antyoksydacyjne. Celem badań było określenie właściwego terminu i gęstości siewu, pozwalających uzyskać najwyższy plon ziela akmelii w warunkach środkowej Polski oraz pomiar zawartości jądrowego DNA. W doświadczeniu polowym porównywano trzy terminy siewu (28.04.22, 11.05.22, 28.05.22) oraz dwie gęstości siewu (500 i 1000 nasion na 1 m.b.). Wielkość genomu została określona za pomocą cytometru przepływowego CyFlow Ploidy Analyser (Sysmex, Niemcy). Materiałem do badań cytometrycznych były nasiona akmelii. Jako standard wewnętrzny wykorzystano liście *Zea mays* (5,43 pg/2C). W każdej próbie analizowano około 7000 jąder komórkowych. Zawartość 2C DNA obliczona została na podstawie proporcjonalnej zależności pomiędzy średnią pozycją piku akmelii oraz kukurydzy. Wyniki badań polowych wykazały, że najwyższe plony suchej masy kwitnącego ziela uzyskano z najwcześniejszego terminu siewu. Opóźnienie siewu do 11 maja miało niewielki wpływ na wysokość roślin i plony ziela, ale zmniejszyła się wtedy obfitość kwitnienia. Zwiększenie gęstości siewu wpłynęło korzystnie na obfitość kwitnienia, ale miało niejednoznaczny wpływ na wysokość roślin i plon suchej masy ziela. Wielkość genomu dla *Acmella oleracea* została oznaczona po raz pierwszy i wyniosła 9,4 pg/2C, co odpowiada 9193 Mpz. Uzyskany wynik klasyfikuje genom *A. oleracea* w grupie genomów średnich. Na podstawie wyników z badań polowych można stwierdzić, że w warunkach środkowej Polski uzasadnione jest zakładanie plantacji produkcyjnej akmelii z siewu wykonanego do końca pierwszej dekady maja.

Słowa kluczowe: *Acmella oleracea*, akmelia, spilantol, wielkość genomu, plon ziela, cytometria przepływowa

***Acmella oleracea* – a little-known herbal plant**

Abstract

Acmella oleracea L. (jambu) belongs to the *Asteraceae* family and is believed to be native to Brazil. In Poland, it is a little-known plant, although it is used in phytotherapy, cosmetology, dentistry, as well as in plant protection. The main active substance is spilanthol, which exhibits strong anesthetic, analgesic and antioxidant effects, among others. The purpose of this study was to determine the proper sowing date and density to obtain the highest yield of jambu herb under conditions in central Poland, and to measure nuclear DNA content. Three sowing dates (28.04.22, 11.05.22, 28.05.22) and two sowing densities (500 and 1000 seeds per 1m.b.) were compared in the field experiment. Genome size was determined using a CyFlow Ploidy Analyser flow cytometer (Sysmex, Germany). The material for cytometric studies was jambu seeds. *Zea mays* leaves (5.43 pg/2C) were used as an internal standard. About 7000 cell nuclei were analyzed in each sample. The 2C DNA content was calculated based on the proportional relationship between the average peak position of jambu and corn. Field results showed that the highest yields of flowering herb dry matter were obtained from the earliest sowing date. Delaying sowing until May 11 had little effect on plant height and herb yields, but flowering abundance then decreased. Increasing sowing density had a positive effect on flowering abundance, but had an ambiguous effect on plant height and herb dry matter yield. The genome size for *Acmella oleracea* was determined for the first time and was 94 pg/2C, corresponding to 9193 Mpz. The result classifies the *A. oleracea* *Acmella* genome in the group of medium genome group. Based on the results from the field study, it can be concluded that under the conditions of central Poland, it is reasonable to establish a production plantation of jambu from sowings made by the end of the first decade of May.

Keywords: *Acmella oleracea*, jambu, spilanthol, genome size, yield of herb, flow cytometry

Wybrane ekstrakty roślinne wykorzystywane w preparatach do mezoterapii igłowej

1. Wprowadzenie

Dbanie o zdrowy i młody wygląd to domena współczesnych czasów. Większa część populacji szuka różnych sposobów na zatrzymanie czasu lub przynajmniej jego spowolnienie, w tym celu stosując zabiegi mające za zadanie biorewitalizację skóry i stymulację procesów naprawczych na poziomie komórkowym. Nowoczesna kosmetologia daje takie możliwości zabiegowe. Jednym z nich jest mezoterapia igłowa, która jest metodą polegającą na śródskórnym dostarczeniu składników aktywnych w głąb skóry, by tam rozpocząć procesy odbudowujące. Same iniekcje nie dają tak pożądanego efektu, jak zastosowanie odpowiednich preparatów, w tym wypadku nazywanych koktajlami bądź ampułkami. Preparat do mezoterapii igłowej musi spełniać szereg norm, m.in. być biokompatybilny, fizjologiczny, dobrze tolerowany, bezpieczny, sterylny i przede wszystkim posiadać właściwości terapeutyczne. Najczęściej stosowane są substancje pochodzenia roślinnego lub całe ekstrakty roślinne. Jednymi z nich są ekstrakty z ziele *Centella asiatica*, *Rosmarinus officinalis* oraz *Melilotus officinalis*. Wymienione wyżej gatunki roślinne są szeroko stosowane od tysięcy lat w tradycyjnej medycynie jako preparaty terapeutyczne. Również w czasach terażniejszych cieszą się dużą popularnością. Wszystkie przytoczone gatunki posiadają swoje monografie m.in. w Farmakopei Europejskiej, Polskiej, Chińskiej czy Indyjskiej [1-4].

C. asiatica w tradycyjnej medycynie chińskiej jest stosowana od stuleci, przede wszystkim jako środek wspomagający gojenie się ran oraz w leczeniu dolegliwości skórnych, m.in. trądu lub oparzeń. Surowcem leczniczym jest ziele *C. asiatica*. Za aktywności biologiczne *C. asiatica* odpowiadają przede wszystkim związki triterpenowe – saponiny oraz kwasy [5-9]. Są to charakterystyczne związki dla rodzaju *Centella*. Oprócz działania terapeutycznego związanego z chorobami skóry ekstrakt z *C. asiatica* jest stosowany również w schorzeniach związanych z ośrodkowym układem nerwowym [10, 11].

Kolejnym gatunkiem o cennych właściwościach leczniczych jest *R. officinalis*. Oprócz działania terapeutycznego jest szeroko znany jako roślina przyprawowa. Za aktywność biologiczną *R. officinalis* odpowiadają głównie związki polifenolowe, w tym występujący

¹ kordian1503@gmail.com, Koło naukowe Praktyczne Aspekty Fitokosmetologii, Zakład Kosmetologii Medycznej, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków, Polska.

² julia.plyjgawko@gmail.com, Koło naukowe Praktyczne Aspekty Fitokosmetologii, Zakład Kosmetologii Medycznej, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków, Polska.

³ anna.gozdzialska@gmail.com, Zakład Kosmetologii Medycznej, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków, Polska.

⁴ karolina.jafernik@doctoral.uj.edu.pl, Koło naukowe Praktyczne Aspekty Fitokosmetologii, Zakład Kosmetologii Medycznej, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków, Polska; Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, Polska.

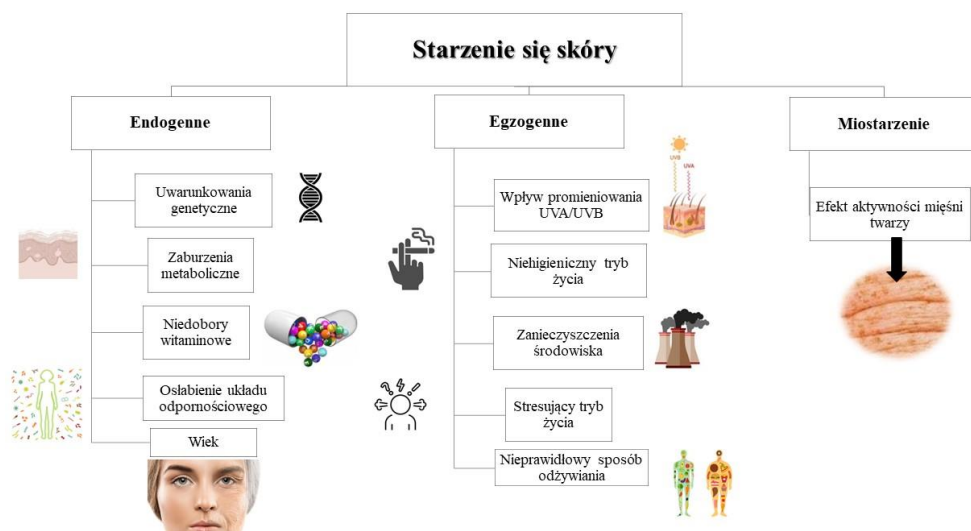
w dużej ilości w tym ziele kwas fenolowy (należący do grupy kwasów fenolowych kwas rozmarynowy). Ekstrakty z ziele *R. officinalis* wykazują przede wszystkim działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne, co uwarunkowane jest właśnie profilem fitochemicznym rośliny [12-14]. Należy wspomnieć o równie cennym składniku wyizolowanym z ziele *R. officinalis*, jakim jest olejek eteryczny, który również posiada swoją monografię w Farmakopeach [2, 4, 15].

Kolejnym gatunkiem opisanym w poniższym przeglądzie jest *M. officinalis*, również szeroko rozpowszechniony gatunek leczniczy, który znalazł swoje zastosowanie w kosmologii. Główny profil działania *M. officinalis* to poprawa mikrokrążenia, działanie regenerujące, ale również działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne [16-18].

2. Mezoterapia igłowa

Starzenie się skóry jest procesem wieloetapowym zachodzącym na kilku poziomach. Wyróżnia się szereg czynników, które umożliwiają podział procesów starzenia na poszczególne rodzaje. Jednym z nich jest starzenie zewnątrzpochodne skóry, za które odpowiedzialne są czynniki środowiskowe. Zalicza się do nich między innymi warunki klimatyczne, sposób odżywiania, niehigieniczny tryb życia, rodzaj i sposób wykonywanej pracy oraz nadmierna ekspozycja skóry na promieniowanie ultrafioletowe. Kolejnym rodzajem starzenia jest starzenie wewnątrzpochodne, gdzie głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za postępowanie procesu jest wiek oraz profil genetyczny, które warunkują szybkość zachodzenia niekorzystnych zmian w wyglądzie skóry [19, 20].

Innym rodzajem starzenia się skóry jest miostarzenie, czyli powstawanie zmarszczek w wyniku skurczu mięśni mimicznych twarzy. Wraz z częstością skurczu oraz wiekiem ulegają one znacznemu pogłębieniu i utrwaleniu. Jednym z zabiegów terapeutycznych stosowanych w prewencji miostarzenia jest mezoterapia igłowa, inaczej nazywana intradermoterapią lub też miejscową terapią śródskórną (rys. 1) [19, 20].



Rysunek 1. Rodzaje starzenia się skóry [opracowanie własne]

2.1. Definicja

Mezoterapia, inaczej zwana miejscową terapią śródskórną (LIT) czy intradermoterapią, należy do małoinwazyjnych niechirurgicznych metod leczniczych, której technika opiera się na wielokrotnej podaży substancji aktywnej w mikrodermę, co umożliwia jej powolną dyfuzję w warstwie tkanki [21]. Wywołuje to przedłużony efekt terapeutyczny. W języku greckim przedrostek „mezo-” oznacza: pomiędzy, środkowy – związek z powstawaniem skóry oraz tkanki łącznej z mezodermy, czyli środkowej warstwy komórek zarodka. W przypadku mezoterapii odnosi się on głównie do tkanki podskórnej do której aplikowane są dostosowane względem potrzeb pacjenta składniki aktywne [21, 22]. Zabieg mezoterapii igłowej opiera się głównie na elementach medycyny klasycznej, nie wykluczając przy tym terapii naturalnych (wykorzystanie ekstraktów roślinnych). Co istotne, mezoterapia zalicza się do praktyk opartych na salutogenicznym modelu podejścia do zdrowia, tj. skupia się na zachowaniu zdrowia, a nie leczeniu choroby.

Mezoterapia igłowa stwarza optymalne warunki do przeprowadzenia celowanego leczenia z zastosowaniem przedłużonego uwalniania substancji aktywnej. Optymalizacja skuteczności użytego preparatu następuje poprzez możliwość uzyskania potrzebnego do wystąpienia pożądaných efektów stężenia substancji leczniczej. Zgodnie ze współczesną wiedzą z zakresu farmakokinetyki metabolizm substancji leczniczej w miejscowej terapii śródskórną nie wywołuje działania hepatotoksycznego [22]. Intradermoterapię w kosmologii estetycznej wykorzystuje się przede wszystkim w zabiegach biorewitalizacji skóry twarzy, szyi oraz dekoltu. Biorewitalizacja określana jest jako ogół działań zmierzających ku indukcji naturalnych procesów regeneracyjnych skóry, podczas których następuje odbudowa autogennych składników skóry [23].

Wyróżnia się tutaj 2 mechanizmy, gdzie pierwszy to bodziec farmakologiczny określany jako specyficzna aktywność zastosowanego składnika aktywnego, a drugi bodźcem fizycznym, czyli procesem gojenia się tkanki po serii wielokrotnych iniekcji [21].

Prekursorem mezoterapii igłowej był francuski lekarz Michael Pistor, który po raz pierwszy w 1952 roku wykorzystał metodę śródskórną terapii miejscowej u pacjenta z niedosłyszeniem. Pomimo braku konkretnych efektów leczenia nastąpiło zredukowanie objawów związanych z *hypacusis*, tj. bólu w okolicy stawów skroniowo-żuchwowych oraz szumów usznych. Wspomnianą powyżej metodę zaczęto stosować w leczeniu objawowym chorób przewlekłych takich jak migrena oraz niewydolność żylna wraz z towarzyszącymi zespołami bólowymi. W latach 60. XX wieku można zauważyć próby stosowania mezoterapii igłowej w terapii niektórych chorób skóry (dermatoz) – łuszczycy zwykłej, łysienia plackowatego i świerzbki kolczystokomórkowej [21, 22].

2.2. Metodyka wykonania, przeciwwskazania do wykonania zabiegu

Jak wspomniano wcześniej, zabieg polega na iniekcjach śródskórnych. Jakość igieł oraz strzykawek decyduje o bezpieczeństwie mezoterapii igłowej. Odpowiednio dobrane instrumenty zabiegowe minimalizują ryzyko urazów oraz bólu związanego z iniekcją. Na rynku dostępne są igły oraz strzykawki przeznaczone do tego typu zabiegu. Powinny być pozbawione substancji potencjalnie alergicznych (np. lateks, krzem). Strzykawki dostępne są w różnych rozmiarach, tj. 1 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml. Klasyczne oraz Luer Lock. Ważne jest, aby były to strzykawki 3-częściowe, posiadające gumową nasadkę na tłoku, która umożliwia płynne podanie preparatu [23].

Igły do mezoterapii dostępne są w różnych rozmiarach. Wybór odpowiednio dopasowanego rozmiaru jest związany z techniką iniekcji, okolicą zabiegową oraz gęstością podanego preparatu [23]. Istotna jest kilkukrotna wymiana igły przy opracowywaniu większej ilości wstrzyknięć, gdyż igła może się stępić lub zwyczajnie zgiąć, co będzie skutkować większym prawdopodobieństwem wystąpienia efektów ubocznych w postaci obrzęku i/lub krwawienia. Wskazaną praktyką powinno być skrupulatne sprawdzanie drożności igły bezpośrednio przed zabiegiem [22].

Ogólne względy bezpieczeństwa stanowią o tym, iż kobiety w ciąży nie powinny korzystać z żadnych zabiegów kosmetyki estetycznej, szczególnie w okolicy jamy brzusznej. Wśród dodatkowych przeciwwskazań należy wymienić: zakażenia bakteryjne lub wirusowe, stany zapalne skóry, choroby autoimmunologiczne, epilepsję, zaburzenia sercowo-naczyniowe, zaburzenia metaboliczne, alergie na substancje aktywne stosowanego preparatu, predyspozycje do tworzenia się blizn przerostowych, a także karmienie piersią, zakażenie wirusem opryszczki (HSV1), zaburzenia krzepnięcia krwi (w przypadku głębokich iniekcji), zaburzenia dysmorficzne, urazy struktur anatomicznych, wiek poniżej 16. roku życia [24-26].

2.3. Techniki iniecyjne stosowane w mezoterapii igłowej

Mezoterapia jest jednym z najpopularniejszych zabiegów w gabinecie kosmetyki i medycyny estetycznej. Wyróżniamy kilka jej metod:

- mezoterapia frakcyjna mikroigłowa – substancje aktywne wprowadzane są za pomocą specjalnego urządzenia wyposażonego w wieloigłowe, sterylne, jednorazowe kartridże;
- mezoterapia bezigłowa – substancje aktywne wprowadzane są przy pomocy fal elektromagnetycznych różnych długości;
- mezoterapia igłowa, czyli zabieg, który wykonuje się za pomocą igły i strzykawki [27, 28].

W mezoterapii igłowej wykorzystuje się techniki manualne, a także te z użyciem liniowych lub kołowych multiiniektorów.

Techniki iniekcji stosowane w zabiegu mezoterapii igłowej wykonywane są ręcznie lub przy użyciu specjalnie do tego celu zaprojektowanego pistoletu. Wybór techniki iniekcyjnej zależy będzie od wielu czynników, a przede wszystkim od lokalizacji, wskazań zabiegowych, wieku pacjenta, wywiadu diagnostycznego, wyjściowego stanu skóry oraz zastosowanych substancji aktywnych. W przypadku pierwszej metody, tj. ręcznej, istotne jest, aby nauczyć się praktycznego zastosowania (tab. 1) [29, 30].

Tabela 1. Stosowane nazwy, głębokość wykonywania oraz cechy charakterystyczne poszczególnych technik iniecyjnych wykorzystywanych w mezoterapii igłowej

Technika	Głębokość iniekcji	Cechy
Naskórkowa (dragging)	≤1 mm	<ul style="list-style-type: none"> • bezbolesna, • brak krwawienia, • można stosować na duże obszary, • stosowana w zabiegach stymulacji skóry, • wykazuje długotrwały efekt, • powolna dyfuzja
Nappage	1-4 mm	<ul style="list-style-type: none"> • skóra właściwa, powierzchowna do głębokiej, • objętość preparatu <0,1 ml (pojedyncze krople), • odległość kilku milimetrów pomiędzy punktami iniekcji

Seryjna	2-4 mm	<ul style="list-style-type: none"> • punkt po punkcie, a także celowane podanie do punktów akupunkturowych, • szybka dyfuzja, jak i działanie, • objętość preparatu na punkt <0,2 ml, • odległość pomiędzy punktami iniekcji to 5-10 mm
Nasiękowa	≥4 mm	<ul style="list-style-type: none"> • podskórna, • duże ilości podania substancji terapeutycznej, • możliwość wywołania efektu ogólnoustrojowego
Mieszana	różna głębokość	<ul style="list-style-type: none"> • technika powierzchniowa i głęboka podczas tego samego zabiegu

Źródło: opracowanie własne na podstawie [22].

- Technika naskórkowa

W technice naskórkowej lub „punkt po punkcie” na jedno wstrzyknięcie stosowane są dawki 0,01 ml preparatu na głębokość <1 mm. Metoda ta stosowana jest w przypadku planowania biorewitalizacji na niewielkie i wrażliwe obszary (skóra wokół oczu, ust, stóp i dłoni). Aby zapewnić maksymalną absorpcję substancji aktywnych nie należy usuwać widocznych depozytów płynu z powierzchni naskórka [25].

- Technika śródskórna

Technika śródskórna na głębokość ≤1 mm w ilości >0,1 ml/depozyt. Stosowana w przypadku korekcji zmarszczek w okolicy podoczołowej, szyi i dekoltu, a także w odmładzaniu grzbietów dłoni oraz policzków. Zastosowanie posiadają również iniekcje śródskórne, w których głębokość wstrzyknięcia w zależności od potrzeby wykonuje się na głębokość od 1 mm do 4 mm (terapia łysienia oraz w przypadku rozstępów i cellulitu) [21].

- Technika podskórna

Iniekcja podskórna znajduje szczególne zastosowanie w zabiegu lipolizy iniekcyjnej. Ilość preparatu przypadająca na punkt wynosi 0,5 ml. Docelowym miejscem iniekcji jest tkanka tłuszczowa łączna, przy jednoczesnym unikaniu podania preparatu do tkanki mięśniowej [29].

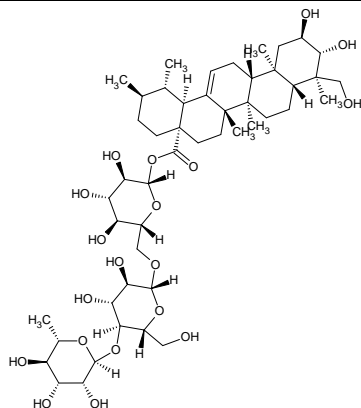
3. Wybrane ekstrakty roślinne wykorzystywane w koktajlach do mezoterapii igłowej

3.1. Wąkrota azjatycka

Centella asiatica L. (wąkrota azjatycka) to gatunek roślinny ceniony na całym świecie ze względu na swoje właściwości terapeutyczne, wykorzystywane zarówno w naukach medycznych, jak i w kosmologii [6, 10, 11]. Za aktywność biologiczną rośliny odpowiada przede wszystkim bogaty skład chemiczny, w tym związki charakterystyczne tylko dla tego gatunku. *C. asiatica* należy do rodziny *Apiaceae* (selerowate). Jako roślina lecznicza była już stosowana w czasach starożytnych. Najstarsze zachowane dokumenty mówią o stosowaniu ziela *C. asiatica* w medycynie arjuwerdyjskiej (Indie), tradycyjnej medycynie chińskiej (TCM), ale również na Sri Lance i obszarze Półwyspu Malajskiego [10, 31]. Ekstrakty z ziela *C. asiatica* stosowano najczęściej w schorzeniach skórnych, takich jak oparzenia, egzemy, trądzik, łuszczyca, ale również jako środek przyspieszający gojenie się ran oraz przy dolegliwościach ze strony układu pokarmowego i układu krążenia [10]. W ludowej nomenklaturze stosowane nazwy dla wąkroty azjatyckiej to m.in. gotu kola, tygrysia trawa/ziele. Nazwy znacznie się od siebie różnią, w zależności od regionu, w którym *C. asiatica* była stosowana (rys. 2) [10, 32].



A



Azjatykozyd

B

Rysunek 2. Wygląd morfologiczny *C. asiatica* (A) oraz struktura chemiczna azjatykozydu wyizolowanego z ziela *C. asiatica* [opracowanie własne]

Współcześnie *C. asiatica* dalej cieszy się niesłabnącą popularnością jako roślina lecznicza. Ziele wąkroty azjatyckiej – *Asiaticae herba* ma swoje monografie w Farmakopeach na całym świecie, między innymi Indyjskiej, skąd pierwotnie się wywodzi, ale również Europejskiej, Polskiej czy Amerykańskiej [4, 33-35]. Najnowsze badania dotyczącego tego gatunku skupiają się przede wszystkim na wykorzystaniu potencjału leczniczego *C. asiatica* w schorzeniach chorób związanych z ośrodkowym układem nerwowym. Oprócz tego *C. asiatica* jest szeroko stosowana w przemyśle kosmetycznym oraz kosmologii, gdzie najczęściej wykorzystuje się jej potwierdzone badaniami działanie, m.in. wspomagające gojenie się ran, zwiększanie syntezy kolagenu typu I i III, lipolityczne czy przeciwdrobnoustrojowe [7, 8, 36].

3.1.1. Charakterystyka botaniczno-ekologiczna

C. asiatica jest rośliną wieloletnią. Charakteryzuje się płożącą łodygą, która może na swojej powierzchni posiadać włoski okrywające w dolnej części. Na łodydze znajdują się węzły, z których wychodzą liście. Liście *C. asiatica* mają wydłużone ogonki o długości około 6 mm oraz posiadają niewielki przylistek. Kształt liści jest nerkowaty lub dłoniasty, epliptyczny na wierzchołku z karbowanymi brzegami [10, 37]. Powierzchnia liścia jest gładka, widoczne są na niej grube, odchodzące promieniście żyły. Kwiatostan ma kształt baldacha, na którym znajduje się od 1 do 5 kwiatów. Kwiaty *C. asiatica* są niewielkie, bez szypułki. Mogą mieć kolor biały lub ciemnoróżowy. Owoc ma kształt owalny, osiąga długość około 8 milimetrów [10].

C. asiatica to wieloletnia płożąca bylina. Naturalne obszary występowania to tereny Indii i Cejlonu, jednak ze względu na niske wymagania tak naprawdę występuje na ciepłych obszarach obu półkul. Występuje w tropikalnych i subtropikalnych rejonach. Rośnie na obszarze Chin, Sri Lance, Madagaskarze, Malezji, Indonezji, w części południowej i centralnej Afryki, Australii oraz w środkowej i południowej Ameryce [10, 37, 38]. Dobrze rośnie w miejscach o dużej wilgotności, więc często można ją spotkać przy brzegach zbiorników wodnych. Występuje również w miejscach skalistych, nasłonecznionych, ale wilgotnych [37].

3.1.2. Skład chemiczny *C. asiatica*

Za aktywność biologiczną ekstraktów z zieleń *C. asiatica* odpowiadają głównie związki triterpenowe. Stwierdzono obecność zarówno glikozydów triterpenowych: azjatykozyd, azjatykozyd B, centellasaponiny A-D, madekassozyd, bramozyd, braminozyd, centellozyd, indocentellozyd, skffoleozyd A, intanokunizyd, takanunizyd; jak i kwasów triterpenowych: kwas azjatykowy, madekasowy, tankunowy, izotankunowy, centellowy, centykowy, betulinowy, izobramowy, madazjatykowy, centoikowy, indocentoikowy. Większość wymienionych powyżej związków jest charakterystyczna tylko dla rodzaju *Centella* i zostały pierwszy raz wyizolowane z *C. asiatica* (tab. 2) [5, 7].

Tabela 2. Skład chemiczny ekstraktu z zieleń *C. asiatica*

Grupa związków	Rodzaj związków	Związek chemiczny
Związki triterpenowe	Glikozydy (saponiny) triterpenowe	azjatykozyd, azjatykozyd B, centellasaponiny A-D, madekassozyd, bramozyd, braminozyd, centellozyd, indocentellozyd, skffoleozyd A, intanokunizyd, takanunizyd
	Kwasy triterpenowe	azjatykowy, madekasowy, tankunowy, izotankunowy, centellowy, centykowy, betulinowy, izobramowy, madazjatykowy, centoikowy, indocentoikowy
Związki polifenolowe	Kwasy fenolowe	chlorogenowy, izochlorogenowy, neochlorogenowy
	Flawonoidy	apigenina, luteolina, katechina, kwercetyna, kemferol, naringenina, castillcetin oraz castilliferol
Sacharydy	Monosacharydy	fruktoza, sacharoza, rafinoza, ramnoza, glukoza, arabinoza
	Polisacharydy	arabinogalaktan
Inne	Aminokwasy	fenyloalanina, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, glicyna, seryna, alanina
	Fitosterole	β -stigmasterol, β -sitosterol, kampesterol
		Karotenoidy
	Witaminy	A, B, C, E, K
	Sole mineralne	Mg

Źródło: opracowanie własne na podstawie [5-7, 36, 39].

Oprócz związków triterpenowych drugą bardzo istotną grupą o dużym znaczeniu terapeutycznym, potwierdzoną w zieleń *C. asiatica*, są związki polifenolowe, kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, izochlorogenowy, neochlorogenowy) oraz flawonoidów (apigenina, luteolina, katechina, kwercetyna, kemferol, naringenina, castillcetin oraz castilliferol) – tabela 2 [36, 39, 40].

Oprócz związków polifenolowych w zieleń z *C. asiatica* występują również związki z grupy polisacharydów, monosacharydów, aminokwasów, karotenoidów, fitosteroli, soli mineralnych (Mg) oraz witaminy: C, A, E, K (tab. 2) [36, 39, 41].

Z zieleń *C. asiatica* został również wyizolowany olejek eteryczny. W jego skład wchodzi związki monoterpenowe (α -pinen, β -pinen, cymol, g-terpinen, mircen) i seskwiterpenowe (β -kariofilen, kamfora, cyneol, trans-*p*-farnezen, α -humulen, germakren D, n-dodekan) oraz pochodne: izosiarkocyjanian allilu, octan bornylu [41-43].

3.1.3. Aktywność biologiczna ekstraktów z *C. asiatica*

Zarówno ekstrakty z zieleń *C. asiatica*, jak i wyekstrahowane z niego związki wykazują szereg aktywności biologicznych wykorzystywanych w terapii zarówno problemów skórnych, jak i problemów związanych m.in. z chorobami neurodegeneracyjnymi.

Współczesne badania opierają się na badaniach na liniach komórkowych, jak i badaniach klinicznych. *C. asiatica* od dawna cieszy się dużym zainteresowaniem badaczy. Poniżej przedstawiono m.in. potwierdzenie działania przeciwutleniającego, przeciwstarzeniowego oraz wspomagające gojenie ran ekstraktów z *C. asiatica* [31, 44-47].

3.1.4. Aktywność antyoksydacyjna

Meena i wsp. przeprowadzili badanie mające na celu określenie właściwości przeciwutleniających ekstraktów z *C. asiatica*. Testy opierały się na zdolności redukującej oraz aktywności wychwytywania wolnych rodników przy pomocy metody DPPH oraz H₂O₂. Przeprowadzono również analizę związków o działaniu przeciwutleniającym. Stwierdzono obecność związków z grupy polifenoli, witaminy C oraz garbników. Wykazano, że metanolowy ekstrakt z ziela *C. asiatica* ze względu na obecność związków o silnym działaniu przeciwutleniającym skutecznie redukował wolne rodniki [48].

Pitella i wsp. również skupili się na zbadaniu aktywności antyoksydacyjnej za pomocą metody DPPH wodnego ekstraktu z liści *C. asiatica*. Dodatkowo rozszerzyli swoje badania o działanie cytotoksyczne. Zbadano również poziom polifenoli (kwasów fenolowych i flawonoidów), który wynosił 2,86 g/100 g i 0,361 g/100 g. Stwierdzono, że ekstrakt z *C. asiatica* wykazuje wysoką aktywność wychwytywania wolnych rodników metodą DPPH. Oprócz tego ekstrakt z *C. asiatica* wykazywał obiecującą aktywność cytotoksyczną na linii komórkowej mysiego czerniaka (B(16)F(1)), ludzkiego raka piersi (MDA MB-231) oraz komórki nowotworowe glejaka szczura (C(6)) [8].

3.1.5. Aktywność wspomagająca odbudowę bariery skórnej

Angraeeni i wsp. skupili się na zbadaniu aktywności ekstraktu *C. asiatica* jako składnika wspomagającego odbudowę uszkodzonej bariery skórnej. W tym celu przeprowadzono podwójnie ślepe badanie kliniczne, w którym brało udział 30 osób mających do czynienia z przewlekłą suchością skóry ze względu na wykonywaną pracę. Badanym podano krem zawierający ekstrakt z *C. asiatica*, który nakładano na ręce i ramiona 2 razy dziennie. Badanie przeprowadzono za pomocą aparatury kutometru wraz z innymi dostępnymi sondami (korneometrem oraz tewametrem; Cutometer dual MP = 580), którą badano transepidermalną ucieczkę wody (TEWL) oraz poziom nawilżenia warstwy rogowej naskórka. Po 4 tygodniach wykazano, że nastąpiła istotna poprawa po stosowaniu kremu z *C. asiatica*. Stwierdzono wzrost nawilżenia skóry w warstwie rogowej dłoni oraz grzbietu (odpowiednio o 95%) oraz zmniejszoną TEWL (również o 95%) [47].

3.1.6. Aktywność biologiczna wspomagająca gojenie się ran

Damkerngsuntorn i wsp. przeprowadzili podwójnie ślepe, randomizowane badanie kliniczne mające na celu ocenę wpływu na szybsze gojenie się ran zabiegu z użyciem lasera frakcyjnego Er: YAG. W badaniu wzięło udział 30 osób z widocznymi bliznami potrądzikowymi, które zostały poddane zabiegowi laserowemu. Pacjenci mieli za zadanie na połowie twarzy używać żelu z certyfikowanym ekstraktem z *C. asiatica*, zaś na drugiej części żelu placebo. Wykonywane zdjęcia pacjentów podczas czasu trwania badania miało ocenić 3 dermatologów. Wykazano, że ekstrakt z *C. asiatica* skutecznie zmniejszał widoczny obrzęk oraz wpływał na szybsze gojenie i wygląd zmian po zabiegu laserowym [46].

3.1.7. Aktywność przeciwstarzeniowa

Poomanee i wsp. skupili się na potwierdzeniu aktywności przeciwstarzeniowej ekstraktu z *C. asiatica*. W tym celu przeprowadzono podwójnie ślepe badanie, w którym wykonano preparat składających się z mieszanki 3 ziół, w tym *C. asiatica*. Preparat miał formę emulsji, którą 60 kobiet nakładało na twarz. Przed zabiegiem, po 30 dniach i po 60 dniach przeprowadzono testy *in vivo* oceniające nawilżenie skóry, elastyczność oraz głębokość zmarszczek wokół oczu. Zbadano aktywność przeciwutleniającą również przygotowanej mieszanki. Badania wykazały, że u żadnej z badanych w ciągu 60 dni nie pojawił się rumień ani obrzęk skóry. Po zakończeniu badania u znaczącej ilości pacjentek wzrosło znacząco nawilżenie oraz elastyczność skóry [45].

Haftek i wsp. przeprowadzili badanie mające na celu wykazanie aktywności przeciwstarzeniowej wyizolowanego z ekstraktu z ziela *C. asiatica* madekasozydu. Testy polegały na połączeniu witaminy C (5%) i związku (0,1%) w randomizowanym podwójnie ślepym badaniu z udziałem 20 pacjentów. Badanie miało na celu ocenę fotostarzejącej się skóry. Po 6 miesiącach wykazano znaczną poprawę w redukcji zmarszczek głębokich i powierzchniowych oraz jędrności, a także na poziomie nawilżenia skóry. Wyniki zostały potwierdzone pomiarami elastyczności skóry oraz nawilżenia, jak i pomiarem histologicznym włókien elastynowych w skórze brodawkowej [44].

3.1.8. Zastosowanie ekstraktu *C. asiatica* w preparatach do mezoterapii igłowej

W preparatach do mezoterapii igłowej ekstrakt z *C. asiatica* wykorzystuje się przede wszystkim ze względu na jego działanie poprawiające mikrokrążenie oraz wspomagające przepływ limfy i zapobiegające zastojom chłonki. Co istotne, w koktajlach bardzo ważna jest także aktywność wspomagająca gojenie się ran ekstraktu z *C. asiatica*. Także działanie stymulujące syntezę kolagenu jest bardzo ważne przy wykorzystaniu preparatów w terapii przeciwstarzeniowej skóry dojrzałej. Bardzo często ekstrakt z *C. asiatica* jest także wykorzystywany w terapii antycellulitowej w połączeniu z innymi zabiegami, np. endermologią [11, 31, 49].

Ekstrakty z *C. asiatica* cieszą się również dużą popularnością w formułacjach w preparatach kosmetycznych. Według bazy CosIng (*Cosmetic Ingredient Database*) dopuszczono do zastosowania w kosmetykach aż 19 postaci surowców pozyskiwanych z *C. asiatica*. Oprócz ekstraktów z poszczególnych części rośliny do obiegu w przemyśle kosmetycznym dopuszczono m.in. proteiny wyizolowane z *C. asiatica*. Postaci surowców z *C. asiatica* mają przede wszystkim działanie kondycjonujące skórę oraz włosy, wygładzające, kojące, ale również przeciwdrobnoustrojowe i tonizujące (tab. 3) [1].

Tabela 3. Postacie surowców pozyskiwane z *C. asiatica* oraz ich zastosowanie wg bazy CosIng

Stosowana postać		Zastosowanie w preparatach kosmetycznych
Nazwa polska	Nazwa angielska	
Pożywka wzrostowa pozyskana z hodowli komórek kalusa <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica callus conditioned media</i>	• kondycjonujące skórę
Zawiesina hodowli komórek <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica callus culture</i>	• antyoksydacyjne • kondycjonujące skórę
Lizat zawiesiny hodowanych komórek kalusa <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica callus culture lysate</i>	• kondycjonujące skórę

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki uwalniane do pożywki wzrostowej z kultur komórkowych kalusa <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica callus extracellular vesicles</i>	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwdrobnoustrojowe • antyoksydacyjne
Ekstrakt z kalusa <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica callus extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwdrobnoustrojowe • antyoksydacyjne • odżywiające włosy • ochronne na skórę • jako humektant
Ekstrakt z części nadziemnych <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • oczyszczające • kondycjonujące skórę • wygładzające • kojące • tonizujące
Ekstrakt z kwiatów, liści i łodyg <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica flower/leaf/stem extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę
Liście z <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica leaf</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę
Ekstrakt z hodowli komórek liściowych <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica leaf cell culture extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjne • ochronne na skórę
Ekstrakt z liści <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica leaf extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę
Wodny roztwór destylatu z parą wodną otrzymywany z liści <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica leaf water</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę
Ekstrakt z liści oraz łodyg <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica leaf/stem extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • jako humektant
Proszek otrzymywany z suszonych, zmielonych liści i łodyg <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica leaf/stem powder</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące włosy
Zawiesina hodowanych komórek merystemu <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica meristem cell culture</i>	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjne • ochronne na skórę
Ekstrakt z kultury komórkowej merystemu <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica meristem cell culture extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę • jako humektant
Olejek eteryczny pozyskiwany z całej rośliny <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica oil</i>	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwdrobnoustrojowe • antyoksydacyjne • jako humektant • ochronne na skórę
Ekstrakt z korzeni <i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica root extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę
Hydrolizat z ekstraktu z <i>C. asiatica</i>	<i>Hydrolyzed centella asiatica extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjne • jako humektant
Hydrolizat białek wyizolowanych z całej rośliny <i>C. asiatica</i>	<i>Hydrolyzed centella asiatica protein</i>	<ul style="list-style-type: none"> • jako humektant

Źródło: opracowanie własne na podstawie [1].

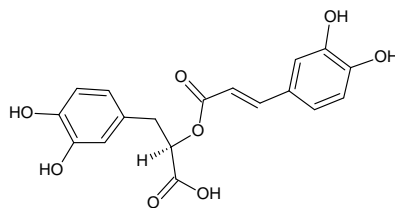
3.2. Rozmaryn lekarski (*Rosmarinus officinalis*)

Rosmarinus officinalis L. (rozmaryn lekarski) jest gatunkiem krzewu należącym do rodziny Lamiaceae (jasnotowate). Jako roślina lecznicza jest znany od czasów starożytnych. Egipcjanie używali preparatów na bazie ekstraktu z ziela *R. officinalis* do ochrony przed wysokimi temperaturami i pustynnym upałem. Ekstrakt *R. officinalis* był także składnikiem mieszanek, w skład których wchodziły również ekstrakty z *Thymus vulgaris*, *Commiphora abyssinica*, *Cedrus pinaceae*, *Matricaria chamomilla* L. Ludność wykorzystywała je w celu leczenia dolegliwości trawiennych, chorób układu oddechowego oraz rozrodczego. Wiązanki z *R. officinalis* były także umieszczane w grobowcach fara-

onów – miały symbolizować zapach podróży. Istnieją dowody, że *R. officinalis* (rys. 3) był również stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej (TCM) [35, 50, 51]. Warto również wspomnieć, że zarówno liść *R. officinalis* (*Rosmarini folium*), jak i olejek eteryczny (*Rosmarini aetheroleum*) posiadają swoje monografie w Farmakopeach polskiej i europejskiej. Olejek eteryczny został również wyróżniony przez Europejską Agencję Leków (EMA, European Medicines Agency) [2-4, 52, 53].



A



Kwas rozmarynowy
B

Rysunek 3. Wygląd morfologiczny (A) *R. officinalis* oraz struktura chemiczna kwasu rozmarynowego (B) obecnego w ekstrakcie z ziela *R. officinalis* [opracowanie własne]

3.2.1. Charakterystyka botaniczno-ekologiczna

R. officinalis jest zimozielonym krzewem osiagającym wysokość do 1,8 metra. Liście są kształtu liniowego bądź lancelowatrego o zakrzywionych i zaokrąglonych brzegach. Górna powierzchnia liści jest koloru zielonego, występuje na niej duża ilość włosków gruczołowych. Kwiaty *R. officinalis* są małe, ułożone w krótkie grona posiadające fioletową lub białą koronę. Okres kwitnienia przypada na okres od końca grudnia do kwietnia w regionie Morza Śródziemnego (półkula północna) [54].

R. officinalis naturalnie występuje na terenach Kaukazu i na obszarach basenu Morza Śródziemnego: Hiszpania, Cypr, Azory, Madera, Wyspy Kanaryjskie, Turcja, Francja, Algieria, Maroko, Tunezja, Grecja, Włochy oraz Portugalia. *R. officinalis* rośnie na wysokości od 0 do 1600 m n.p.m. i nie jest zbyt wymagającym gatunkiem, jeśli chodzi o rodzaj gleby. Nie rośnie dobrze w bardzo wilgotnych lub bardzo zimnych obszarach geograficznych [54]. Jest szeroko rozpowszechnionym gatunkiem na całym świecie ze względu na swoje właściwości lecznicze, ale również jako roślina przyprawowa. Głównymi krajami zajmującymi się uprawą i eksportem rośliny są Francja, Włochy, Grecja, Hiszpania, Tunezja oraz Meksyk. Na mniejszą skalę *R. officinalis* uprawiany jest na terenie Azji, Afryki Południowej oraz Stanów Zjednoczonych [12, 13, 51, 54].

3.2.2. Skład chemiczny *R. officinalis*

R. officinalis jest cenionym gatunkiem leczniczym ze względu na swoje właściwości terapeutyczne wykorzystywane od dawna w medycynie ludowej. Surowcem było najczęściej ziele rozmarynu. To właśnie z nich ludność przygotowywała wodne mikstury (napary, odwary), a także wodno-alkoholowe ekstrakty, które stanowiły preparaty lecznicze na bóle migrenowe, bóle mięśniowe, schorzenia artretyczne i żołądkowe [12, 51]. W przemyśle spożywczym stosowany jest jako środek aromatyzujący i konserwujący żywność ze względu na potencjał przeciwutleniający oraz przeciwdrobnoustrojowy [14].

Za aktywność biologiczną *R. officinalis* odpowiada szereg związków, których obecność potwierdzono w ekstraktach oraz olejku eterycznym z ziela *R. officinalis*. To właśnie olejek eteryczny odpowiada za większość stwierdzonych aktywności biologicznych ekstraktu z ziela *R. officinalis*. Dodatkowo większość z badań skupia się na izolacji samego olejku eterycznego i analizowaniu jego działania [12, 13, 55].

W skład olejku eterycznego, którego zawartość w ekstrakcie z ziela *R. officinalis* może wynosić do 3%, wchodzi przede wszystkim związki z grupy polifenoli oraz związki terpenowe. Stwierdzono obecność flawonoidów (luteolina, apigenina, genkwanina, diosmetyna, hispidulina), kwasów fenolowych (kwas kawowy, chlorogenowy oraz rozmarynowy), a także związków mono-, di- oraz triterpenowych (tab. 4) [56, 57].

Tabela 4. Związki aktywne biologicznie zawarte w olejku eterycznym *R. officinalis*

Grupa związków	Substancja aktywna	Aktywność biologiczna
Związki monoterpenowe	1,8-cineol (eucalyptol), kamfora, α -pinen, β -pinen, borneol, limonen, p-cymen, werbenon	<ul style="list-style-type: none"> • rozgrzewająca • pobudzająca mikrokrążenie • antybiotyczna • przeciwbakteryjna • immunomodulująca
Związki diterpenowe	kwas karnozowy, karnozol, rosmarol, epirosmanol, isorosmanol, rosmaridifenol	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjna • przeciwzapalna • przeciwbakteryjna • antyproliferacyjna
Związki triterpenowe	kwas oleanowy, ursolowy, α -amyryna, β -amyryna	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwzapalna • przeciwbakteryjna • przeciwgrzybicza • pierwotniakobójcza • przeciwnowotworowa • przeciwbólowa
Flawonoidy	luteolina, apigenina, genkwanina, diosmetyna, hispidulina	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjna • przeciwzapalna • detoksykująca • przeciwwirusowa • uszczelniająca naczynia krwionośne • przeciwalergiczna • moczopędna • uspokajająca • hepatoprotekcyjna • hipotensyjna • przeciwwrzodowa
Kwasy fenolowe	kwas kawowy, chlorogenowy, kwas rozmarynowy	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjna • regulująca gospodarkę hormonalną • przeciwzapalna • immunostymulująca • przeciwnowotworowa • spazmolityczna • przeciwstarzeniowa • fotoprotekcyjna • poprawiająca mikrokrążenie skóry • przeciwwirusowa

Źródło: opracowanie własne na podstawie [58-62].

3.2.3. Aktywność biologiczna ekstraktów z *R. officinalis*

Aktywność biologiczna ekstraktów z *R. officinalis* determinowana jest obecnością przede wszystkim związków polifenolowych. Współcześnie jest prowadzonych wiele badań z wykorzystaniem metod testowania *in vitro* oraz *in vivo* ekstraktów wodnych, heksanowych, etylooctanowych z ziela *R. officinalis*, jak i wyizolowanego olejku eterycznego [55, 56]. Badania dotyczące działania terapeutycznego ekstraktów z *R. officinalis* skupiają się głównie na testach pod kątem m.in. aktywności antyoksydacyjnej, przeciwdrobnoustrojowej, fotoprotekcyjnej oraz wspomagającej gojenie się ran. Prowadzone są także badania ekstraktów w terapii wspomagającej leczenie łysienia androgenowego, gdyż wykazuje działanie hamujące wobec 5 α -reduktazy [55, 61, 63]. Poniżej przedstawiono wybrane badania dotyczące aktywności biologicznej ekstraktów oraz olejku eterycznego *R. officinalis*.

3.2.4. Aktywność antyoksydacyjna

Ezzat i wsp. przeprowadzili badania dotyczące działania przeciwutleniającego odłuszczonego ekstraktu z *R. officinalis*. Przeprowadzono testy wychwytywania wolnych rodników *in vitro*. Wykazano, że odłuszczony ekstrakt ma wysoką zdolność wychwytywania w stosunku do rodników ponadtlenkowych, 2,2'-azyno-bis (kwasu 3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) oraz 2,2-difenylo-2-pikrylowo-hydrazylowych. Dodatkowo stwierdzono, że ekstrakt z *R. officinalis* skutecznie hamował odbarwienie się β -karotenu i posiadał wysoką zdolność chelatowania Fe (II) i Fe (III) [62].

Salem i wsp. przeprowadzili badania dotyczące działania antyoksydacyjnego powiązanego z oceną zawartości polifenoli w wodnym i etanolowym ekstrakcie z *R. officinalis*. Metodą wielowymiarowej analizy danych (MVDA) wykazano, że ekstrakty z *R. officinalis* posiadają szereg związków chemicznych o działaniu przeciwutleniającym. Były to związki z grupy: kwasów fenolowych, flawonoidów, diterpenoidów i związków aromatycznych. Dodatkowo zbadano działanie hamujące ekstraktów na aktywność enzymów odpowiadających za starzenie się skóry w warunkach *in vitro*: kolagenazy, elastazy oraz tyrozynazy. Wykazano, że zarówno ekstrakt wodny, jak i etanolowy z *R. officinalis* skutecznie hamował aktywność wymienionych enzymów [64].

3.2.5. Aktywność fotoprotekcyjna

Martin i wsp. przeprowadzili badania mające na celu ustalenie, czy wodny ekstrakt z *R. officinalis* wykazuje działanie fotoochronne. Stwierdzono, że ekstrakt znacznie obniżał aktywność oraz transkrypcję metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP-1). Testy przeprowadzono przy zastosowaniu sztucznego modelu skóry. Wykazano także, że ekstrakt z *R. officinalis* w dalszym przebiegu procesu obniżał stężenie cytokin: interleukiny-1- α oraz interleukiny-6 indukowanych promieniowaniem ultrafioletowym [65].

3.2.6. Aktywność wspomagająca gojenie się ran

Abu-Al-Basal i wsp. w badaniu *in vivo* przeprowadzonym na mysich modelach, w których jedna grupa była zdrowa, druga miała cukrzycę wykonano 2 okrągłe rany na grzbiecie. Następnie na rany stosowano miejscowo olejek eteryczny z *R. officinalis*. Testy wykazały, że po 6 i 15 dniach od zranienia zwierząt zmniejszył się stan zapalny w ranie, nastąpiło ponowne narastanie tkanki nabłonkowej oraz widoczna regeneracja tkanki ziaminowej. Stwierdzono również angiogenezę oraz syntezę kolagenu w zmienionej chorobowo tkance u obu badanych grup, co potwierdza działanie wspomagające w gojeniu się ran olejku eterycznego z *R. officinalis* [66].

3.2.7. Aktywność przeciwgrzybicza

Zespół badaczy skupił się na zbadaniu aktywności przeciwgrzybiczej olejku eterycznego wyizolowanego z *R. officinalis*. Testy przeprowadzono na szczepach dermatofitowych z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* oraz *C. krusei*, które najczęściej odpowiadają za grzybice skórne. Stwierdzono, że olejek eteryczny w stężeniu 8% skutecznie hamuje wzrost wszystkich badanych szczepów z rodzaju *Candida* [67].

W innym badaniu testowano aktywność przeciwgrzybiczą ekstraktu wodno-alkoholowego *R. officinalis* na 2 szczepu dermatofitowe: *Microsporum gypseum* oraz *Trichophyton rubrum*. Stwierdzono, że 10% ekstrakt z *R. officinalis* skutecznie hamował wzrost opisanych szczepów grzybów w 86% [60].

3.2.8. Aktywność poprawiająca mikrokrążenie i wspomagająca wzrost mieszków włosowych

Duża liczba badań skupia się na wykorzystaniu potencjału terapeutycznego ekstraktów oraz olejku eterycznego z *R. officinalis* w leczeniu problemów skóry głowy. Testy skupiają się przede wszystkim na wykorzystaniu *R. officinalis* w łysieniu androgenowym (typu męskiego) [61, 68].

W badaniu klinicznym, które przeprowadzili Panahi i wsp. porównywano skuteczność olejku eterycznego wyizolowanego z ziela *R. officinalis* z 2% roztworem minoksydylu w terapii leczenia łysienia androgenowego. Pacjenci zostali podzieleni na 2 grupy: jedna stosowała roztwór minoksydylu, druga grupa olejek eteryczny z *R. officinalis*. Badanie wykazało wzmożony i porównywalny wzrost liczby włosów w przypadku obu terapii, co potwierdziło skuteczność terapeutyczną olejku *R. officinalis*. Dodatkowo pacjenci ocenili również stopień podrażnienia skóry głowy. Było ono wyższe w grupie, gdzie jako preparat leczniczy był stosowany 2% roztwór minoksydylu. Wyniki pokazują, że olejek eteryczny z *R. officinalis* wykazuje podobne działanie terapeutyczne do 2% roztworu minoksydylu [61].

Badania skupiają się również na terapiach łączonych. Badacze skoncentrowali się na połączeniu ekstraktów ziołowych, między innymi z ziela *R. officinalis*, z osoczem bogatopłytkowym podawanym w zabiegu mezoterapii igłowej na owłosioną skórę głowy. Wykazano, że wykonany zabieg nasilał proliferację komórek brodawek skórnych poprzez regulację kinazy sterowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym i białek kinazy białkowej B, dając nowe możliwości terapeutyczne w celu pobudzenia wzrostu włosów [65].

3.2.9. Zastosowanie ekstraktu *R. officinalis* w preparatach do mezoterapii igłowej

Ekstrakt z *R. officinalis* znalazł zastosowanie jako jeden ze składników aktywnych preparatów do mezoterapii igłowej. Stanowi on najczęściej komponent gotowych koktajli mezoterapeutycznych stosowanych w zabiegach biorewitalizacji dojrzałej skóry twarzy, szyi, dekoltu oraz okolic oczu, które mają działanie poprawiające elastyczność skóry, biostymulujące oraz drenujące (niwelujące zastoje limfatyczne poprzez pobudzenie mikrokrążenia). Również bardzo często ekstrakt z *R. officinalis* stosuje się w preparatach do iniekcji wspomagających leczenie łysienia androgenowego [61].

Ekstrakt z *R. officinalis* najczęściej występuje w koktajlach w połączeniu z ekstraktem z *Ruscus aculeatus*, *Ginko Biloba*, witaminą C, peptydami biomimetycznymi oraz nieusieciovany kwasem hialuronowym [69].

Oprócz zastosowania w preparatach do mezoterapii igłowej różnego rodzaju ekstrakty oraz inne sporządzone wyciągi z *R. officinalis* mają szerokie zastosowanie w preparatach kosmetycznych. Udokumentowaną aktywność biologiczną oraz wykorzystanie w przemyśle kosmetycznym zawiera baza CosIng. Według bazy CosIng zastosowanie w przemyśle kosmetycznym ma aż 16 postaci surowców pozyskiwanych z *R. officinalis*. Surowce wykazują m.in. działanie ochronne na skórę, perfumujące, ale również antyoksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe (tab. 5) [1].

Tabela 5. Postaci surowców pozyskiwane z *R. officinalis* oraz zastosowanie wg bazy CosIng

Stosowana postać		Zastosowanie w preparatach kosmetycznych
Nazwa polska	Nazwa angielska	
Ekstrakt z kalusa <i>R. officinalis</i> uprawianego w kulturach <i>in vitro</i>	<i>Rosmarinus officinalis callus extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwdrobnoustrojowe • antyoksydacyjne • kondycjonujące włosy • ochronne na skórę
Wodny roztwór destylatu z pary wodnej z ziela <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis water</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach
Olejek eteryczny otrzymywany z łodyg <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis stem oil</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach
Wodny roztwór otrzymywany z destylatów z parą wodną liści i łodyg <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis leaf/stem water</i>	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjne • humektant • kodycjonujące skórę • jako emolient
Ekstrakt z <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwdrobnoustrojowe • odświeżające • tonizujące
Wosk otrzymywany z kwiatów <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis flower cera/wax</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach
Ekstrakt z kwiatów <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis flower extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjne • deodorujące • nadające zapach • kondycjonujące skórę
Olejek eteryczny otrzymywany z liści i świeżych wierzchołków kwitnących <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis flower oil/Rosmarinus officinalis leaf oil</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach • kondycjonujące skórę
Ekstrakt z kwiatów, liści oraz łodyg <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis flower/leaf/stem extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach • kondycjonujące skórę
Wodny roztwór pozyskiwany na drodze destylacji z parą wodną z kwiatów, liści oraz łodyg <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis flower/leaf/stem water</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach • perfumujące
Liście <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis leaf</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę

Ekstrakt z liści <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> leaf extract	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwdrobnoustrojowe • nadające zapach • kondycjonujące skórę
Sproszkowane liście <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> leaf powder	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach • kondycjonujące skórę
Wodny roztwór destylatu z pary wodnej otrzymywany z <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> leaf water	<ul style="list-style-type: none"> • nadające zapach
Olejek eteryczny otrzymywany z liści i łodyg <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> leaf/ stem oil	<ul style="list-style-type: none"> • antyoksydacyjne • kondycjonujące skórę
Ekstrakt z fitoplacenty <i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> phytoplacenta extract	<ul style="list-style-type: none"> • przeciwdrobnoustrojowe • przeciwutleniające • jako humektant • ochronne na skórę

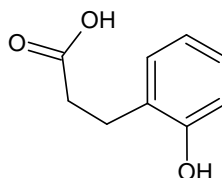
Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1]

3.3. Nostrzyk żółty (*Melilotus officinalis*)

M. officinalis jest jednoroczną lub dwuletnią rośliną należącą do rodziny *Fabaceae* (bobowate), rodzaju *Melilotus* (nostrzyk). Do rodzaju *Melilotus* należy około 25 gatunków, gdzie największą popularnością cieszy się właśnie nostrzyk żółty (*M. officinalis*), ale także nostrzyk biały (*M. albus*), nostrzyk wyniosły (*M. altissimus*) oraz nostrzyk ząbkowany (*M. dentatus*) (rys. 4) [16-18].



A



Kwas melilotowy

B

Rysunek 4. Wygląd morfologiczny (A) *M. officinalis* oraz struktura chemiczna kwasu melilotowego występująca w ekstrakcie z *M. officinalis* [opracowanie własne]

Właściwości lecznicze *M. officinalis* są znane od wieków starożytnych. Pierwsze wzmianki o wykorzystaniu *M. officinalis* udokumentowano już w starożytnej Grecji. Dostępne są zapisy, gdzie Hipokrates, Dioskurydes czy Galen opisują zastosowanie terapeutyczne ziela *M. officinalis* w przypadku leczenia owrzodzeń czy jako środek zmiękczejący i przeciwobrzękowy [70]. *M. officinalis* cieszył się dużą popularnością także w czasach nowożytnych, bardzo często stosowano preparaty na bazie ziela *M. officinalis* w medycynie ludowej. W XIX wieku sporządzano okłady z papki na bazie ekstraktu z ziela z *M. officinalis* przy opuchliznach oraz napary ziołowe jako preparaty do mycia i płukania jamy ustnej w celu zmniejszenia obrzęków węzłów chłonnych i ropni [70]. Współcześnie *M. officinalis* jest także cenionym gatunkiem leczniczym. Ziele nostrzyka (*Meliloti herba*) posiada swoje monografie w Farmakopei Europejskiej oraz Farmakopei Polskiej [2-4, 15].

3.3.1. Charakterystyka botaniczno-ekologiczna *M. officinalis*

M. officinalis jest gatunkiem osiągającym wysokość około 1 metra. Liście *M. officinalis* są ułożone naprzemianlegle, trójlistkowe z 2 lancetowatymi, zaokrąglonymi brzegami. Górna powierzchnia liści ma barwę ciemnozieloną, natomiast powierzchnia dolna jest bladezielona [71]. Kwiaty *M. officinalis* są zebrane w groniasty kwiatostan. Pojedyncze kwiaty osiągają długość około 7 milimetrów. Owocem *M. officinalis* jest 1- lub 2-nasienny strąk o długości około 3-4 milimetrów [16, 72].

Okres kwitnienia *M. officinalis* przypada od czerwca do sierpnia [71]. Podczas kwitnienia *M. officinalis* wydziela specyficzny słodki zapach, który po wyschnięciu staje się bardziej intensywny. Jest to związane z obecnością kumaryn w ziele *M. officinalis* [70, 71].

Naturalne obszary występowania *M. officinalis* to tereny Azji oraz Europy. Jednak w związku z dużą inwazyjnością gatunku na dzień dzisiejszy *M. officinalis* występuje w stanie dzikim na niemalże każdym kontynencie z wyjątkiem Antarktydy. Jest to uwarunkowane małymi wymaganiami *M. officinalis* co do warunków dotyczących wzrostu rośliny, głównie gleby [70, 71].

Głównym problemem dotyczącym uprawy różnych gatunków nostrzyka jest grożąca erozja genetyczna związana z ukierunkowaniem gospodarstw na uprawę wybranych roślin, często w monokulturach [73]. W Polsce uprawa *M. officinalis* dotyczy formy 1-letniej lub 2-letniej. *M. officinalis* jest łatwym gatunkiem uprawowym ze względu na wysoką odporność na zimno, suszę, działanie insektów, wirusów, smogu, SO₂, wysokie pH gleby oraz obecność w niej metali ciężkich. W odróżnieniu od innych roślin z rodziny *Fabaceae*, *M. officinalis* rośnie na glebach o umiarkowanym zasoleniu [74].

W Polsce *M. officinalis* występuje na terenach nizinnych, jak i w niższych rejonach górskich, można go spotkać w całym kraju. Zasadza głównie stanowiska ruderalne, ugory, nasypy, żwirowiska, przydroża i rowy. Poza tym, że nie toleruje pełnego zacięcia, może rosnąć zarówno w pełnym słońcu, jak i półcieniu. *M. officinalis* zalicza się do roślin dnia długiego, jest również odporny na warunki zimowe. Zaliczany jest do roślin pionierskich, wybierających gleby bogate w wapń [71, 74].

3.3.2. Skład chemiczny *M. officinalis*

Liczne badania dotyczące składu chemicznego ekstraktów z *M. officinalis* wykazały obecność związków o wysokiej aktywności biologicznej.

W skład ekstraktu z zieleń *M. officinalis* wchodzi takie związki jak kumaryny (kumaryna od 0,3% do 0,8% – wg Farmakopei Polskiej nie mniej niż 0,3%), melilotyna (3,4-dihydrokumaryna), umbeliferon (7-hydroksykumaryna), skopoletyna (7-hydroksy-6-metoksykumaryna), herniaryna, fraksydyna, 4-oksykumaryna) [75-77].

Oprócz kumaryn stwierdzono obecność związków polifenolowych: kwasów fenolowych (kwas p- i o-kumarowy, kwas melilotowy (dihydro-o-kumarowy), kwas kawowy 0,1%, kwas ferulowy, kwas salicylowy, kwas chlorogenowy, kwas cynamonowy, kwas elagowy, a także dużą ilość flawonoidów (rutozyd, hiperozyd, hesperydyna, astragalina, luteolina, robinina, witeksyna, genisteina) [78].

W ekstrakcie z zieleń *M. officinalis* potwierdzono obecność związków terpenoidowych, takich jak: triterpeny i saponiny triterpenowe (kwas betulinowy, lupanon, lupeol, melilotigenina, sojasapogenol B i E, sojasaponina I, astragalozyd VIII, azukisaponina II, azukisaponina V, karboksylan, melilotus-saponina O2, wistariasaponina D) oraz innych grup

związków: garbniki, żywice, trygonelina, kwas moczowy, pochodne mocznika (alantoina i kwas alantoinowy), a także witamin: A, E, B₃, C, K, soli mineralnych, polisacharydów, karotenoidów, aminokwasów (waliny, izoleucyny, glutaminy, treoniny czy argininy), i kwasów tłuszczowych (kwas oleinowy, palmitynowy, linolowy), alkaloidów, węglowodanów (galaktoza, arabinoza, fruktoza) oraz kwasów fenylokarboksylowych [18, 75-79].

Badano również profil fitochemiczny ekstraktu z nasion *M. officinalis*. Stwierdzono obecność dużej liczby aminokwasów: waliny, izoleucyny, glutaminy, treoniny czy argininy, ale także kwasów tłuszczowych (kwas oleinowy, palmitynowy, linolowy) [78].

Skupiono się również na składzie chemicznym ekstraktu z korzenia *M. officinalis*. Stwierdzono obecność substancji aromatycznych, kwasu melilotowego oraz kumaryny [78].

3.3.3. Aktywność biologiczna ekstraktów z *M. officinalis*

Badania dotyczące aktywności biologicznej ekstraktów skupiają się przede wszystkim na potwierdzeniu aktywności antyoksydacyjnej oraz przeciwzapalnej ze względu na obecność dużej ilości związków polifenolowych. Również skupiono się na działaniu wspomagającym gojenie się ran oraz aktywności lipolitycznej ekstraktów z *M. officinalis* [77, 80].

3.3.4. Aktywność antyoksydacyjna i przeciwrodnikowa

Liu i wsp. przeprowadzili badanie mające na celu analizę aktywności przeciwutleniających związków polifenolowych (kwasów fenolowych oraz flawonoidów) wyizolowanych z ekstraktu z części nadziemnych *M. officinalis*. Z ekstraktu wyizolowano: kwas salicylowy, kumarynę, betainę, kwas fumarowy, kwas kofeinowy, luteinę, kwercetynę), a następnie oceniono aktywność przeciwutleniającą za pomocą kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS) i 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu (DPPH). Wyniki pokazały, że najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazał związek z grupy kwasów fenolowych (kwas kofeinowy) oraz 2 flawonoidy (luteina i kwercetyna) w porównaniu z innymi oznaczonymi związkami polifenolowymi [77].

Kiewlicz i wsp. przeprowadzili badanie polegające na analizie właściwości przeciwrodnikowych wodno-alkoholowych wyciągów wybranych surowców zielarskich, w tym ekstraktu ziela *M. officinalis*. Testy polegały na zmierzeniu zdolności wygaszania rodnika DPPH oraz obliczono parametr EC₅₀, który oznacza stężenie wyciągu roślinnego wymagane do obniżenia początkowego stężenia DPPH o 50%. Wykazano, że aktywność przeciwrodnikowa ekstraktu z ziela *M. officinalis* była 2. najlepszą w kolejności zaraz za ekstraktem z owoców *Hippophae rhamnoides*, który również był poddany badaniu na aktywność przeciwrodnikową [80].

3.3.5. Aktywność przeciwzapalna

Liu i wsp. skupili się również na zbadaniu aktywności przeciwzapalnej z 70% etanolowego ekstraktu z części nadziemnych *M. officinalis*. Z ekstraktu wyizolowano związki o składzie: 2 glikozydy kwasu, 3 kwasy fenolowe, 2 flawonoidy, kumaryna oraz alkaloid. W testach stymulowano makrofagi w linii komórkowej RAW 264.7 lipopolisacharydem (LPS). Stwierdzono, że wszystkie związki wykazywały działanie hamujące indukowaną przez LPS produkcję tlenu azotu (NO) i prostaglandyny E₂ poprzez hamowanie ekspresji indukowalnej syntazy NO (iNOS) i cyklooksygenazy-2 w stymulowanej LPS linii komórkowej RAW 264.7. Wyniki sugerują, że ekstrakt z *M. officinalis* może być wykorzystywany w terapii jako preparat przeciwobrzękowy [77].

Skupiono się również na zbadaniu działania 2 związków: kumaryny oraz melilotyny wyizolowanych z zieleń *M. officinalis*. Wykazano, że oba związki skutecznie zwiększają opór kapilarny. Co więcej, zawarte w składzie ekstraktu kumaryna i melilotyna zwiększają opór kapilarny. Dodatkowo stwierdzono, że kumaryna ma działanie przeciwzakrzepowe i umiarkowane działanie fibrynolityczne [78].

3.3.6. Aktywność przeciwstarzeniowa

Pastorino i wsp. przeprowadzili badanie mające na celu ocenę wpływu etanolowego ekstraktu z *M. officinalis* na procesy starzenia się komórek. Testy wykazały, że ekstrakt ma działanie stymulujące na komórki skóry oraz przyspiesza procesy regenerowania się tkanek. Testy *in vitro* obejmowały podawanie ekstraktu z *M. officinalis* w dawkach od 0,25 µg/ml do 50 µg/ml (od 1 do 5000 µg/ml w testach żywotności komórek) do linii komórkowych ludzkich keratynocytów HaCaT, fibroblastów 46BR IN, komórek adipocytów oraz enzymów rozkładających macierz. Badania wykazały, że ekstrakt z *M. officinalis* wpływa na wzrost tempa fibroblastów, ma działanie hamujące na enzym kolagenazę oraz wykazuje działanie stymulujące na produkcję kolagenu. Dodatkowo test barwienia adipocytów Oil-Red-O sugeruje, że ekstrakt ma również działanie lipolityczne [81].

3.3.7. Zastosowanie ekstraktu *M. officinalis* w preparatach do mezoterapii igłowej

Profil działania ekstraktu z *M. officinalis* w preparatach do mezoterapii igłowej opiera się na wzmocnieniu naczyń krwionośnych, niwelowaniu zastoju limfatycznych, aktywacji odpływu limfy poprzez zmniejszenie obrzęków oraz przywróceniu prawidłowego krążenia żylnego. Także bardzo istotnym profilem działania ekstraktu *M. officinalis* jest działanie przeciwstarzeniowe, opierające się na aktywności przeciwzapalnej i antyoksydacyjnej. Wszystkie te aktywności biologiczne są związane z dużą zawartością związków polifenolowych w składzie chemicznym *M. officinalis*. Ponadto dowiedziono badaniami, iż związki te mają działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne [77, 82, 83].

Dodatkowo baza CosIng dopuszcza do stosowania w preparatach kosmetycznych 6 form surowców pozyskiwanych z *M. officinalis*. Surowce w kosmetykach mają m.in. za zadanie kondycjonować skórę, pełnić rolę emolienta, nadawać zapach oraz koić skórę (tab. 6) [1].

Tabela 6. Postacie surowców pozyskiwane z *M. officinalis* oraz zastosowanie wg bazy CosIng

Stosowana postać		Zastosowanie w preparatach kosmetycznych
Nazwa polska	Nazwa angielska	
Ekstrakt z nadziemnych części <i>M. officinalis</i>	<i>Melilotus officinalis extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ściągające • nadające zapach • kojące
Ekstrakt z kwiatów <i>M. officinalis</i>	<i>Melilotus officinalis flower extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ściągające • kondycjonujące skórę • zmiękczające
Wodny wyciąg destylatu z pary wodnej z kwiatów <i>M. officinalis</i>	<i>Melilotus officinalis flower water</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kondycjonujące skórę
Ekstrakt z zieleń <i>M. officinalis</i>	<i>Melilotus officinalis herb extract</i>	<ul style="list-style-type: none"> • perfumujące

Olejek eteryczny z ziela <i>M. officinalis</i>	<i>Melilotus officinalis herb oil</i>	• perfumujące
Ekstrakt z liści <i>M. officinalis</i>	<i>Melilotus officinalis leaf extract</i>	• kondycjonujące skórę

Źródło: opracowanie własne na podstawie [1].

4. Podsumowanie

Mezoterapia igłowa jest jedną z najpopularniejszych metod zabiegowych wykorzystywanych w gabinetach kosmetycznych oraz medycyny estetycznej. By w pełni wykorzystać potencjał zabiegu stosuje się szereg preparatów bogatych w składniki aktywne, które mają na celu dodatkowo zastymulować skórę do regeneracji i przebudowy. Jednymi z popularniejszych substancji aktywnych wchodzących w skład koktajli są ekstrakty roślinne. Ich głównymi zaletami są przede wszystkim biokompatybilność oraz brak występowania reakcji alergicznych. Dodatkowo, oprócz kierunkowego działania, wykazują aktywność przeciwzapalną oraz antyoksydacyjną. W pracy skupiono się na 3 surowcach roślinnych szeroko wykorzystywanych w preparatach do iniekcji: ziele *C. asiatica*, *R. officinalis* oraz *M. officinalis*. Oprócz potwierdzonego działania kosmetycznego powyższe surowce wykazują szereg działań o charakterze terapeutycznym, co z dużą skutecznością jest wykorzystywane w terapiach związanych z chorobami skóry.

Literatura

1. <https://ec.europa.eu/> [data dostępu: 21.05.2023].
2. Upton R., Graff A., Jolliffe G., Längler R., Williamson E., *American herbal pharmacopoeia: botanical pharmacognosy – microscopic characterization of botanical medicines*, CRC Press, London 2011.
3. *The European Pharmacopoeia 6th ed., 2.*, Council of Europe, 2007, 6th ed., France.
4. Prezes Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, *Farmakopea Polska XI*, t. 3, Warszawa 2007.
5. James J.T., Dubery I.A., *Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, Centella asiatica (L.) Urban*, *Molecules*, 14, 2009, s. 3922-3941, <https://doi.org/10.3390/molecules14103922>.
6. Matsuda H., Morikawa T., Ueda H., Yoshikawa M., *Saponin constituents of gotu kola (2): Structures of new ursane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides, centellasaponins B, C, and D, from Centella asiatica cultivated in Sri Lanka*, *Chem Pharm Bull Medicinal*, 49, Tokyo 2001, s. 1368-1371, <https://doi.org/10.1248/cpb.49.1368>.
7. Hashim P., Sidek H., Helan M.H.M., Sabery A., Palanisamy U.D., Ilham M., *Triterpene composition and bioactivities of centella asiatica*, *Molecules*, 16, 2009, s. 1310-1322, <https://doi.org/10.3390/molecules16021310>.
8. Pittella F., Dutra R.C., Junior D.D., Lopes M.T.P., Barbosa N.R., *Antioxidant and cytotoxic activities of Centella asiatica (L) Urb*, *Int J Mol Sci*, 10, 2009, s. 3713-3721, <https://doi.org/10.3390/IJMS10093713>.
9. Zainol M.K., Abd-Hamid A., Yusof S., Muse R., *Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of Centella asiatica (L.) Urban*, *Food Chem*, 81, 2003, s. 575-581, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00498-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00498-3).
10. Monograph, *Centella asiatica*, *Alternative Medicine Review*, 12, 2007, s. 69-72, https://doi.org/10.1007/978-3-031-08774-5_11.
11. Ratz-Lyko A., Arct J., *Kosmetyczne i dermatologiczne właściwości Centella asiatica (Cosmetic and dermatological properties of Centella asiatica)*, *Pol J Cosmetol*, 18(1), 2015.

12. De Oliveira J.R., Camargo S.E.A., De Oliveira L.D., *Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent*, Journal of Biomedical Science, 26, 2019, s. 1-22, <https://doi.org/10.1186/S12929-019-0499-8>.
13. Andrade J.M., Faustino C., Garcia C., Ladeiras D., Reis C.P., Rijo P., *Rosmarinus officinalis L.: An update review of its phytochemistry and biological activity*, Future Sci OA, 4, 2018, <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>.
14. Li Pomi F., Papa V., Borgia F., Vaccaro M., Allegra A., Cicero N., Gangemi S., *Rosmarinus officinalis and skin, antioxidant activity and possible therapeutic role in cutaneous diseases*, Antioxidants, 12, 2023, s. 680, <https://doi.org/10.3390/antiox12030680>.
15. *United States Pharmacopeia National Formulary*, Pharmaceut, 1999.
16. Bährle-Rapp M., *Melilotus officinalis*, Springer Lexikon Kosmetik und Körperpflege, 2010.
17. Szymański M., Szajkowska D., Szymański A., *Phytochemical analysis of Melilotus officinalis and Melilotus alba species*, Postępy Fitoterapii, 21, 2020, <https://doi.org/10.25121/PF.2020.21.4.207>.
18. Sisay M.A., Mammo W., Yaya E.E., *Phytochemical studies of Melilotus officinalis*, Bull Chem Soc Ethiop, 35, 2021, s. 141-150, <https://doi.org/10.4314/bcse.v35i1.12>.
19. Kołodziejczak A., *Kosmetologia*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 2019.
20. Chaudhary M., Khan A., Gupta M., *Skin ageing: pathophysiology and current market treatment approaches*, Curr Aging Sci, 13, 2019, s. 22-30, <https://doi.org/10.2174/1567205016666190809161115>.
21. Osika G., Wesołowska A., *Możliwości opóźniania procesów starzenia się skóry z wykorzystaniem wybranych substancji leczniczych*, Farm Pol, 75, 2019, s.369-376.
22. Knoll B., *Illustrated Atlas of esthetic mesotherapy*, Quintessence Publishing Poland, Warszawa 2017.
23. Jankowiak W., Winter J., *The use of microneedling in cosmetology*, Aesthetic Cosmetology and Medicine, 10, 2021, s. 75-78, <https://doi.org/10.52336/acm.2021.10.2.06>.
24. Tazbir M., Pastuszka M., Kaszuba A., *Rola mezoterapii w medycynie estetycznej*, Acta Clinica et Morphologica, 13, 2010, s. 29-32.
25. Mammucari M., Maggiori E., Russo D., Giorgio C., Ronconi G., Ferrara P.E., Canzona F., Antonaci L., Violo B., Vellucci R., Mediatì D.R., Migliore A., Massafra U., Bifarini B., Gori F., Di Carlo M., Brauneis S., Paolucci T., Rocchi P., Cuguttu A., Di Marzo R., Bompreszi A., Santini S., Giardini M., Catizzone A.R., Troili F., Dorato D., Gallo A., Guglielmo C., Natoli S., *Mesotherapy: from historical notes to scientific evidence and future prospects*, Scientific World Journal, 2020, <https://doi.org/10.1155/2020/3542848>.
26. Vedamurthy M., *Mesotherapy*, Indian J Dermatol Venereol Leprol, 73, 2007.
27. Lee J.C., Daniels M.A., Roth M.Z., *Mesotherapy, Microneedling, and Chemical Peels*, Clin Plast Surg, 2016.
28. Matthews-Brzozowska T., Łącka M., Bernacka M., Lichaj M., *Mesotherapy – a method of facial skin rejuvenation from an interdisciplinary perspective on improving facial aesthetics*, J Med Sci, 86, 2018, s. 308, <https://doi.org/10.20883/jms.2017.242>.
29. Drobnik A., *Mezoterapia – przegląd metod*, Kosmetologia Estetyczna, 3, 2014.
30. Doddaballapur S., *Microneedling with dermaroller*, J Cutan Aesthet Surg, 2, 2009, s. 110, <https://doi.org/10.4103/0974-2077.58529>.
31. Bylka W., Znajdek-Awizeń P., Studzińska-Sroka E., Dańczak-Pazdrowska A., Brzezińska M., *Centella asiatica in dermatology: an overview*, Phytother Res, 28, 2014, s. 1117-1124, <https://doi.org/10.1002/PTR.5110>.
32. Shakir Jamil S., Nizami Q., Salam M., *Centella asiatica (Linn.) urban óa review*, Indian J Nat Prod Resour, 6, 2007, s. 158-170.

33. Tang J.L., Liu B.Y., Ma K.W., *Traditional Chinese medicine*, The Lancet, 372, 2008, s. 1938-1940.
34. Bensky D., Gamble A., *Chinese herbal medicine Materia Medica*, 1993, <https://doi.org/10.4236/eng.2013.510B001>.
35. *Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, China chemical industry, Beijing 2005.
36. Brinkhaus B., Lindner M., Schuppan D., Hahn E.G., *Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant Centella asiatica*, *Phytomedicine*, 7, 2005, s. 427-448, [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80065-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80065-3).
37. Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D.Y., *Flora of China*, Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis 2008.
38. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Valentine D.H., *Flora Europaea: Volume 4, Plantaginaceae to composite (and Rubiaceae)*, Cambridge University Press, 1976.
39. Siddiqui B.S., Aslam H., Ali S.T., Khan S., Begum S., *Chemical constituents of Centella asiatica*, *J Asian Nat Prod Res*, 9, 2007, s. 407-414, <https://doi.org/10.1080/10286020600782454>.
40. Subban R., Veerakumar A., Manimaran R., Hashim K.M., Balachandran I., *Two new flavonoids from Centella asiatica (Linn.)*, *J Nat Med*, 62, 2008, s. 369-373, <https://doi.org/10.1007/s11418-008-0229-0>.
41. Sardrood S.G., Saadatmand S., Assareh M.H., Satan T.N., *Chemical composition and biological activity of essential oils of Centella asiatica (L.)*, *Toxicol Environ Health Sci*, 11, 2019, s. 125-131, <https://doi.org/10.1007/s13530-019-0397-1>.
42. Joshi V.P., Kumar N., Singh B., Chamoli R.P., *Chemical composition of the essential oil of Centella asiatica (L.) Urb. from Western Himalaya*, *Nat Prod Commun*, 2, 2007, s. 587-590.
43. Oyedeji O.A., Afolayan A.J., *Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Centella asiatica growing in South Africa*, *Pharm Biol*, 43, 2005, s. 249-252, <https://doi.org/10.1080/13880200590928843>.
44. Haftek M., Mac-Mary S., Le Bitoux M.A., Creidi P., Seité S., Rougier A., Humbert P., *Clinical, biometric and structural evaluation of the long-term effects of a topical treatment with ascorbic acid and madecassoside in photoaged human skin*, *Exp Dermatol*, 17, 2008, s. 946-952, <https://doi.org/10.1111/J.1600-0625.2008.00732.X>.
45. Poomanee W., Yaowiwat N., Pattarachaidaecharuch T., Leelapornpisid P., *Optimized multiherbal combination and in vivo anti-skin aging potential: a randomized double blind placebo controlled study*, *Sci Rep*, 13, 2023, s. 5633, <https://doi.org/10.1038/S41598-023-32738-7>.
46. Damkerngsuntorn W., Rerknimitr P., Panchaprateep R., Tangkijngamvong N., Kumtornrut C., Kerr S.J., Asawanonda P., Tantisira M.H., Khemawoot P., *The effects of a standardized extract of Centella asiatica on post laser resurfacing wound healing on the face: a split-face, double-blind, randomized, placebo-controlled trial*, *J Altern Complement Med*, 26, 2020, s. 529-536, <https://doi.org/10.1089/ACM.2019.0325>.
47. Anggraeni S., Umborowati M.A., Damayanti D., Endaryanto A., Prakoeswa C.R.S., *Role of Centella asiatica and ceramide in skin barrier improvement: a double blind clinical trial of Indonesian batik workers*, *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 32, 2021, s. 589-593, <https://doi.org/10.1515/JBCPP-2020-0510>.
48. Meena H., Pandey H.K., Pandey P., Arya M.C., Ahmed Z., *Evaluation of antioxidant activity of two important memory enhancing medicinal plants Baccopa monnieri and Centella asiatica*, *Indian J Pharmacol*, 44, 2012, s. 114-117, <https://doi.org/10.4103/0253-7613.91880>.
49. Klimowicz A., Zielonka J., Turek M., Nowak A., *Substancje pochodzenia naturalnego stosowane w terapii cellulitu*, *Postępy Fitoterapii*, 16, 2015, s. 96-101.

50. Unschuld P.U., *Medicine in China: A history of pharmaceuticals*, University of California Press Berkeley, Los Angeles–London 1986.
51. Nicholson P.T., *Ancient Egyptian materials and technology*, Cambridge University Press, Cambridge 2000.
52. Petersen M., Simmonds M.S.J., *Rosmarinic acid*, *Phytochemistry*, 62, 2003, s. 121-125, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7).
53. European Medicines Agency, *Committee for Veterinary Medicinal Products, Artemisia abrotanum summary report*, 1999.
54. Morales R., *Flora Ibérica*, CSIC, Madrid 2010.
55. González-Minero F.J., Bravo-Díaz L., Ayala-Gómez A., *Rosmarinus officinalis L. (Rosemary): An ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics*, *Cosmetics*, 7, 2020, s. 77, <https://doi.org/10.3390/COSMETICS7040077>.
56. Ibrahim N., Abbas H., El-Sayed N.S., Gad H.A., *Rosmarinus officinalis L. hexane extract: phytochemical analysis, nanoencapsulation, and in silico, in vitro, and in vivo anti-photoaging potential evaluation*, *Scientific Reports*, 12, 2022, s. 1-20, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16592-7>.
57. Nowak K., Jaworska M., Ogonowski J., Chemii I., Krakowska P., *Rozmaryn – roślina bogata w związki biologicznie czynne*, *Chemik*, 67, 2013, s. 11-13.
58. Heleno S.A., Martins A., Queiroz M.J., Ferreira I.C., *Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review*, *Food Chem*, 173, 2015, s. 501-513, <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.057>.
59. Heleno S.A., Martins A., Queiroz M.J.R.P., Ferreira I.C.F.R., *Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review*, *Food Chem*, 2015, 173, s.501-513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
60. De Macedo L.M., Dos Santos É.M., Militão L., Tundisi L.L., Ataíde J.A., Souto E.B., Mazzola P.G., *Rosemary (Rosmarinus officinalis L., syn Salvia rosmarinus Spenn.) and its topical applications: a review*, *Plants*, 9, 2020, s. 651, <https://doi.org/10.3390/PLANTS9050651>.
61. Panahi Y., Taghizadeh M., Marzony E.T., Sahebkar A., *Rosemary oil vs. Minoxidil 2% for the treatment of androgenetic alopecia: a randomized comparative trial*, *Skinmed*, 13, 2015, s. 15-21.
62. Ezzat S.M., Salama M.M., ElMeshad A.N., Teaima M.H., Rashad L.A., *HPLC–DAD–MS/MS profiling of standardized rosemary extract and enhancement of its anti-wrinkle activity by encapsulation in elastic nanovesicles*, *Arch Pharm Res*, 39, 2016, s. 912-925, <https://doi.org/10.1007/S12272-016-0744-6/FIGURES/6>.
63. Borges R.S., Ortiz B.L.S, Pereira A.C.M., Keita H., Carvalho J.C.T., *Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved*, *J Ethnopharmacol*, 229, 2019, s. 29-45, <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.09.038>.
64. Salem M.A., Radwan R.A., Mostafa E.S., Alseekh S., Fernie A.R., Ezzat S.M., *Using an UPLC/MS-based untargeted metabolomics approach for assessing the antioxidant capacity and anti-aging potential of selected herbs*, *RSC Adv*, 10, 2020, s. 31511-31524, <https://doi.org/10.1039/D0RA06047J>.
65. Martin R., Pierrard C., Lejeune F., Hilaire P., Breton L., Bernerd F., *Photoprotective effect of a water-soluble extract of Rosmarinus officinalis L. against UV-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and reconstructed skin*, *European Journal of Dermatology*, 18, 2008, s. 128-135, <https://doi.org/10.1684/EJD.2008.0349>.
66. Abu-Al-Basal M.A., *Healing potential of Rosmarinus officinalis L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice*, *J Ethnopharmacol*, 131, 2010, s. 443-450, <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.07.007>.

67. Al-Zubairi A.S., Al-Mamary M.A., Al-Ghasani E., *The antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of essential oil from different aromatic plants*, Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences, 6, 2017, s. 224-233.
68. Ahmed H.M., Babakir-Mina M., *Investigation of rosemary herbal extracts (Rosmarinus officinalis) and their potential effects on immunity*, Phytotherapy Research, 34, 2020, s. 1829-1837, <https://doi.org/10.1002/PTR.6648>.
69. Kandhari R., Kaur I., Sharma D., *Mesococktails and mesoproducts in aesthetic dermatology*, Dermatol Ther, 33(6), 2020, <https://doi.org/10.1111/DTH.14218>.
70. Jasicka-Misiak I., Makowicz E., Stanek N., *Polish yellow sweet clover (Melilotus officinalis L.) Honey, chromatographic fingerprints, and chemical markers*, Molecules, 22, 2017, <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22010138>.
71. Sowa P., Dżugan M., Jarecki W., *Nostrzyk (Melilotus) – zapomniana roślina o dużym znaczeniu gospodarczym*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 593, 2018, s. 73-85, <https://doi.org/10.22630/ZPPNR.2018.593.17>.
72. Van Riper L.C., Larson D.L., *Role of invasive Melilotus officinalis in two native plant communities*, Plant Ecol, 200, 2009, s. 129-139, <https://doi.org/10.1007/s11258-008-9438-6>.
73. Głodowska M., Gałązka A., *Intensyfikacja rolnictwa a środowisko naturalne*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 592, 2018, s. 3-13, <https://doi.org/10.22630/ZPPNR.2018.592.1>.
74. Wolf J.J., Rohrs J., *The influence of physical soil conditions on the formation of root nodules of Melilotus officinalis in the montane zone of Rocky Mountain National Park*, Eur J Soil Biol, 37, 2001, s. 51-57, [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01068-8](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01068-8).
75. Suhail Anwer M., Mohtasheem M., Azhar I., Ahmed S.W., Bano H., *CHEMICAL CONSTITUENTS FROM MELILOTUS OFFICINALIS*, Journal of Basic and Applied Sciences, 4, 2008, s. 89-94.
76. Quijano-Celis C.E., Pino J.A., Morales G., *Chemical composition of the leaves essential oil of melilotus officinalis (L.) pallas from Colombia*, Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 13, 2010, s. 313-315, <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643826>.
77. Liu Y.T., Gong P.H., Xiao F.Q., Shao S., Zhao D.Q., Yan M.M., Yang X.W., *Chemical constituents and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities of melilotus officinalis (linn.) pall*, Molecules, 23, 2018, s. 1-12, <https://doi.org/10.3390/molecules23020271>.
78. Schepetova E.V., Abdurakhmanova N.M., Lomteva N.A., Kondratenko E.I., Kasimova S.K., *Pharmacological effects at the chronic administration of Melilotus officinalis L. extract*, IOP Conf Ser Earth Environ Sci, 839, 2021, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/839/4/042100>.
79. Hirakawa T., Okawa M., Kinjo J., Nohara T., *A new oleanene glucuronide obtained from the aerial parts of Melilotus officinalis*, Chem Pharm Bull (Tokyo), 48, 2000, s. 286-287.
80. Kiewlicz J., Malinowska P., Szymusiak H., *Aktywność przeciwrodnikowa wybranych wyciągów ziółowych Antiradical activity of selected herbal extracts*, Probl Hig Epidemiol, 94(2), 2013, s. 317-320.
81. Pastorino G., Marchetti C., Borghesi B., Cornara L., Ribulla S., Burlando B., *Biological activities of the legume crops Melilotus officinalis and Lespedeza capitata for skin care and pharmaceutical applications*, Ind Crops Prod, 96, 2017, s. 158-164, <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.11.047>.
82. Pleşca-Manea L., Pârnu A.E., Pârnu M., Taămaş M., Buia R., Puia M., *Effects of Melilotus officinalis on acute inflammation*, Phytother Res, 16, 2002, s. 316-319, <https://doi.org/10.1002/PTR.875>.
83. Paun G., Neagu E., Albu C., Savin S., Radu G.L., *In Vitro Evaluation of antidiabetic and anti-inflammatory activities of polyphenolic-rich extracts from Anchusa officinalis and Melilotus officinalis*, ACS Omega, 5, 2020, s. 13014-13022, <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C00929>.

Wybrane ekstrakty roślinne wykorzystywane w preparatach do mezoterapii igłowej

Streszczenie

Mezoterapia igłowa jest zabiegiem z zakresu kosmetologii estetycznej, który się cieszy niesłabnącą popularnością ze względu na dobre efekty zabiegowe oraz krótki czas rekonwalescencji. By zwiększyć efektywność metody stosuje się odpowiednie preparaty, które mają za zadanie wykazywać działanie terapeutyczne, a co za tym idzie stymulować procesy regeneracji w skórze. Głównymi składnikami koktajli do mezoterapii igłowej są ekstrakty roślinne. Charakteryzują się biokompatybilnością oraz dobrym efektem terapeutycznym. Jednymi ze stosowanych ekstraktów roślinnych są ekstrakty z ziela *C. asiatica*, *R. officinalis* oraz *M. officinalis*. Oprócz działania kosmetycznego, wykazują szereg aktywności o charakterze leczniczym, co jeszcze bardziej zwiększa efektywność zabiegu. W niniejszym przeglądzie przedstawiono szczegółowy opis zabiegu mezoterapii igłowej, charakterystykę botaniczno-ekologiczną, skład chemiczny, wybrane aktywności biologiczne oraz profil aktywności wykorzystywany w mezoterapii igłowej ekstraktów z ziela *C. asiatica*, *R. officinalis* oraz *M. officinalis*.

Słowa kluczowe: mezoterapia igłowa, preparaty do mezoterapii igłowej, ekstrakty roślinne, *Centella asiatica*, *Rosmarinus officinalis*, *Melilotus officinalis*

Selected plant extracts used in preparations for needle mesotherapy

Abstract

Needle mesotherapy is a treatment in the field of aesthetic cosmetology, which enjoys unflagging popularity due to good treatment effects and short recovery time. To increase the effectiveness of the method, appropriate preparations are used, which are designed to have a therapeutic effect, and thus stimulate regeneration processes in the skin. The main ingredients of needle mesotherapy cocktails are plant extracts. They are characterized by biocompatibility and good therapeutic effect. One of the plant extracts used are extracts from the herb *C. asiatica*, *R. officinalis* and *M. officinalis*. In addition to the cosmetic effect, they show a number of therapeutic activities, which further enhances the effectiveness of the treatment. This review presents a detailed description of the needle mesotherapy treatment, botanical and ecological characteristics, chemical composition, selected biological activities and the profile of activity used in needle mesotherapy of *C. asiatica*, *R. officinalis* and *M. officinalis* herb extracts.

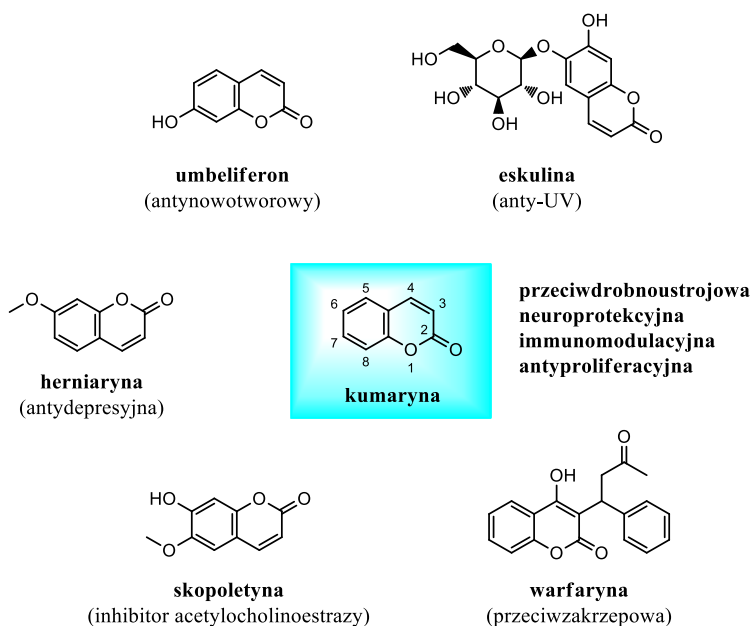
Keywords: needle mesotherapy, preparations for needle mesotherapy, plant extracts, *Centella asiatica*, *Rosmarinus officinalis*, *Melilotus officinalis*

Postępy w syntezie i potencjalnie bioaktywne kumaryny

1. Kumaryny – wprowadzenie

Kumaryny to heterocykliczne metabolity wtórne roślin szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Związki te mają kilka atrakcyjnych cech, takich jak niska masa cząsteczkowa, prosta budowa, wysoka biodostępność, dobra rozpuszczalność w większości rozpuszczalników organicznych i niska toksyczność [1]. Od wielu lat przykuwają uwagę naukowców oraz pełnią rolę wiodących cząsteczek w badaniach nad potencjalnymi lekami.

Szkielet kumaryny stanowi podstawę dużej liczby biologicznie czynnych związków i jest znany z posiadania aktywności biologicznych, takich jak: przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwdrgawkowe, przeciwnowotworowe, przeciwbólowe i przeciwzapalne [2] (rys. 1).



Rysunek 1. Wybrane kumaryny o właściwościach biologicznie czynnych

Proste kumaryny wykazują wiele efektów farmakologicznych. Hydroksylowe pochodne kumaryny, jak umbeliferon oraz 6,7-dihydroksykumaryny znalazły zastosowanie we fluorometrycznych testach enzymatycznych, jako barwniki i fluorescencyjne wskaźniki pH, a także wykazały działanie hamujące proliferację wielu linii komórek nowotworowych człowieka, takich jak: nowotwory nerki, rak prostaty, nowotwory jamy ustnej, białaczka promielocytowa i czerniak. Kumaryna taka jak herniaryna stosowana jest jako

¹ mateusz.kow1@o2.pl, Wydział Chemii UMCS w Lublinie.

² katarzyna.szwaczko@umcs.pl, Katedra Chemii Organicznej i Krystalochemii Instytutu Nauk Chemicznych UMCS w Lublinie.

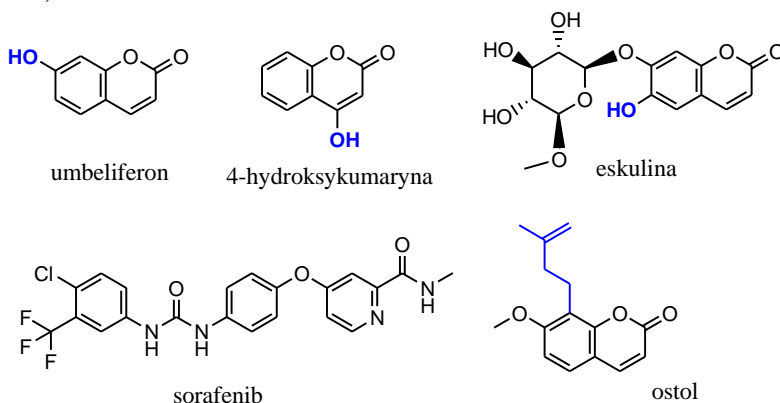
łagodny środek uspokajający w leczeniu hysterii, koszmarów sennych i bezsenności, natomiast skopoletyna jest inhibitorem acetylocholinoesterazy i ma potencjalne zastosowanie jako środek łagodzący objawy choroby Alzheimera [3].

W niniejszym rozdziale opisane zostaną wybrane pochodne kumary, które w ostatnim czasie były badane pod kątem ich potencjalnego działania farmakologicznego. W kolejnych podrozdziałach zaprezentowane zostaną kumaryny wykazujące właściwości przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne, antybakteryjne, przeciwgrzybicze, antywirusowe i antyneurodegeneracyjne.

1.1. Właściwości przeciwnowotworowe kumaryn

Choroby nowotworowe odpowiadają za ponad 20% zgonów w Polsce. Wraz z chorobami krążenia są najczęściej występującymi schorzeniami na świecie. Mechanizm działania choroby nowotworowej opiera się na niekontrolowanym podziale, proliferacji i magazynowaniu komórek w organizmie żywym. Może on obejmować pojedynczy organ, jak i rozprzestrzenić się na szereg innych powiązanych z nim narządów. Jako że podział i szybkość wzrostu komórek ludzkich są określone i kontrolowane przez geny, zakłada się, że choroba ta jest bezpośrednio powiązana z posiadaniem przez daną jednostkę zestawem genów [4]. Na przestrzeni lat opracowano bardzo różnorodne techniki zwalczania nowotworów, jak np.: usunięcie zmian nowotworowych, radioterapia, chemioterapia, immunoterapia, terapia hormonalna oraz terapia genowa. Każda z tych metod może być stosowana osobno lub w połączeniu z różnymi lekami [5, 6]. Chemioterapeutyki takie jak cisplatylna [7] i winblastyna [8] wykazały właściwości hamujące niekontrolowane namnażanie się komórek nowotworowych, jednak związane z ich stosowaniem liczne efekty uboczne powodują, że wielu pacjentów nie jest w stanie dotrzeć do końca leczenia. W związku z tym pożądane jest poszukiwanie mniej toksycznych i równie skutecznych związków do leczenia chorób nowotworowych. Dobrą alternatywę do obecnie stosowanych chemioterapeutyków mogą stanowić kumaryny. Niektóre z kumaryn są już używane w terapiach przeciwko nowotworowi prostaty i białaczki [9].

Ciekawą właściwość biologiczną, nawiązującą do zależności między poziomem cytotoksyczności kumaryn a ich strukturą, opisali Jakubowicz-Gil i wsp. [10]. W badaniach wykorzystano kumaryny różniące się od siebie miejscem podstawienia lub podstawioną grupą funkcyjną w szkielecie, takie jak: 4-hydroksykumaryna, umbeliferon, eskulina i ostol (rys. 2).

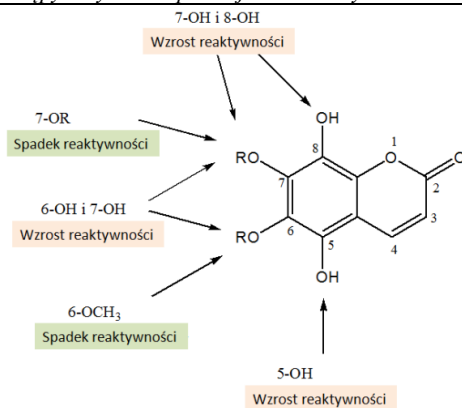


Rysunek 2. Sorafenib oraz wybrane kumaryny o działaniu przeciwnowotworowym

Zostało udowodnione, że każda z kumaryn posiada zdolność do redukcji proliferacji, adhezji oraz migracji komórek nowotworowych. 4-hydroksykumaryna wykazała właściwości dezorganizacji cytoszkieletu komórek czerniaka. Umbeliferon redukował migrację komórek nowotworu krtani oraz wykazywał właściwości cytotoksyczne przeciwko komórkom nowotworów płuc, nerek, piersi oraz białaczki. Eskulina zakłócała adhezję komórek glejaka poprzez modyfikację funkcji receptorów. Sprawdzono również kompatybilność kumaryn w terapii przeciw glejakowi ze znanym chemioterapeutycznym sorafenibem. Eksperyment przeprowadzony na fibroblastach ludzkiej skóry wykazał, że ostol oraz eskulina (osobno, jak i w połączeniu z sorafenibem) nie wykazały żadnych efektów cytotoksycznych względem komórek. Pozostałe hydroksykumaryny posiadały silne działanie nekrotyczne osobno i w połączeniu z chemioterapeutykiem. Badania wykazały, że obecność cząsteczki izoprenylowej w ostolu była kluczowa do indukcji apoptozy w terapii skojarzonej z sorafenibem.

1.2. Właściwości antyoksydacyjne kumaryn

Reaktywne formy tlenu (ROS) oraz azotu (RNS) są grupą niestabilnych substancji, które mogą być wytworzone w małych ilościach fizjologicznie lub w wyniku różnego rodzaju stanów zapalnych. Związki te zawierają jeden lub więcej niesparowanych elektronów, których endogennym źródłem są mitochondria, cytochrom P450 oraz oksydaza ksantynowa. Mitochondria są ważnym źródłem nadtlenu wodoru oraz anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), który w większości przypadków zostaje bardzo szybko pochłonięty przez enzym mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową [11, 12]. Wysoki poziom wolnych rodników w naszym organizmie może powodować obniżenie naturalnej odporności na te rodniki i zwiększenie podatności na stres oksydacyjny. Stres oksydacyjny prowadzi do uszkodzenia lipidów, protein oraz DNA i dalej do powstawania patologicznych stanów zapalnych, kancerogenezy i miażdżycy. Odkryto, że naturalne i chemicznie modyfikowane flawonoidy oraz kumaryny wykazują potencjalne właściwości usuwania wolnych rodników [13]. Przebadano wiele pochodnych kumaryn i odkryto, że pochodne 7-benzyloksykumaryny wykazują bardzo dobre właściwości inhibitoryjne oraz są selektywne względem monoaminooksydazy B (MAO-B). W wielu źródłach naukowych [14, 15] można znaleźć bezpośrednie powiązanie między inhibicją MAO-B a działaniem prewencyjnym w związku z tworzeniem się wolnych rodników w trakcie reakcji enzymatycznej. Udowodniono, że ilość grup hydroksylowych w szkielecie kumaryny jest bezpośrednio powiązana z usuwaniem reaktywnych form tlenu. Zarówno eskuletyna, jak i 4-metylo-eskuletyna, posiadające 2 grupy hydroksylowe, okazały się najbardziej efektywnymi związkami przeciwdziałającymi tworzeniu się ROS. Skopoletyna, która posiada grupę metoksylową, wykazała niższą efektywność w porównaniu z eskuletyną. Pozycja podstawienia grupy w dużym stopniu wpływa na aktywność antyoksydacyjną dihydroksy-4-metylokumaryn (DHMC). *Orto*-podstawione DHMC wykazały silniejsze właściwości antyoksydacyjne niż *meta*-pochodne analogi. Zauważono również, że 7,8-DHMC odznaczała się większą efektywnością niż pochodna 6,7-DHMC (rys. 3). Zaproponowano, że różnica ta może być spowodowana większą zdolnością 7,8-DHMC do tworzenia wiązań wewnątrzcząsteczkowych między atomami wodoru, które mogłyby chronić grupy hydroksylowe przed tworzeniem się silnych wiązań międzycząsteczkowych i potencjalnym wychwicaniem atomów wodoru.

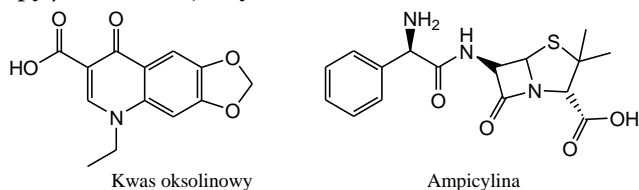


Rysunek 3. Wpływ podstawienia pochodnych kumaryn na ich aktywność

1.3. Kumaryny i właściwości antybakteryjne

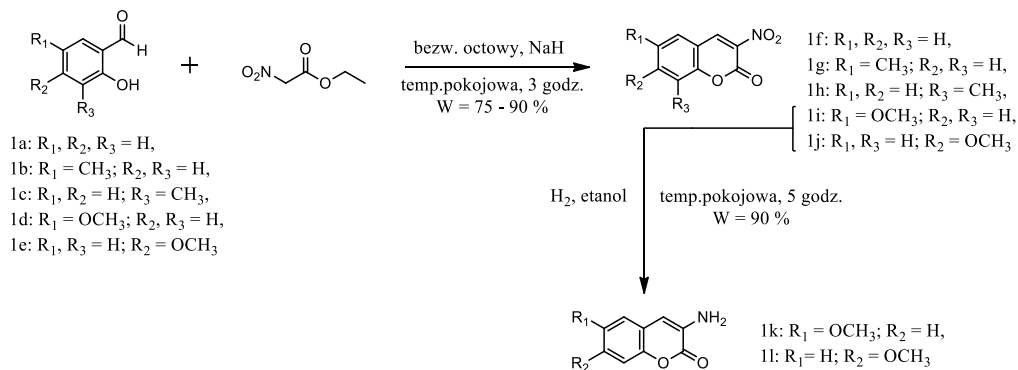
Najpopularniejszą i najskuteczniejszą do tej pory metodą zwalczania drobnoustrojów jest kuracja antybiotykowa. Jednak w przeciągu ostatnich lat naukowcy z niepokojem zauważają coraz większą tendencję bakterii do wykształcania mechanizmów lekooporności. Aktualnie szacuje się, że ponad 700 tysięcy osób zmarło ze względu na infekcję lekoopornymi bakteriami. Jeśli ten trend dalej będzie rósł, to do 2050 liczba ofiar może wzrosnąć nawet do 10 milionów [16].

Kumaryny wykazują silne działanie grzybobójcze i bakteriobójcze. Niektóre pochodne kumaryn, podobne do antybiotyków chinolonowych, mogą wykazywać również obiecujące właściwości. W 2012 roku zbadano szereg pochodnych 3-nitrokumaryny i 3-aminokumaryny względem 2 szczepów bakterii: *E. coli* oraz *S. aureus* [17]. Badania przeprowadzono dla utworzonych siedmiu pochodnych (schemat 1), a jako wskaźnik działania bakteriobójczego wykorzystano antybiotyk chinolowy, kwas oksolinowy oraz ampicylinę (antybiotyk z grupy β -laktamów) – rysunek 4.



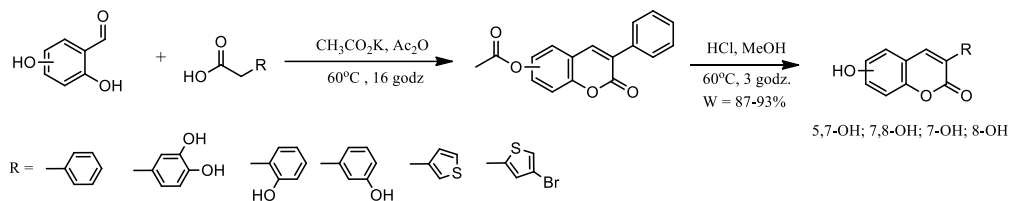
Rysunek 4. Przykłady znanych antybiotyków

Wyniki ukazały, że zsyntezowane pochodne w niektórych przypadkach wykazywały właściwości hamujące wzrost bakterii. Związki **1g** i **1h** z podstawioną grupą metylową odpowiednio w pozycji C-6 oraz C-8 oraz związek **1f**, nieposiadający żadnych podstawników, dawały pozytywny wynik przeciwko obu szczepom bakterii. Związki **1i** oraz **1j** podstawione grupą metoksyłową w pozycji kolejno C-6 oraz C-7 nie wykazały oczekiwanych właściwości przeciwko *E. coli*. Można zatem wywnioskować, że rodzaj podstawnika ma duży wpływ na działanie przeciwko *E. coli*. Związek **1g** podstawiony grupą metylową przy C-6 wykazał o połowę mniejsze minimalne stężenie hamujące względem związku **1h** podstawionego tą samą grupą przy węglu C-7 oraz związku **1f** niepodstawionego wcale.



Schemat 1. Synteza 3-podstawionych pochodnych kumaryny o działaniu bakteriobójczym

W 2019 roku Matos i wsp. otrzymali szereg 3-podstawionych arylowych pochodnych kumaryny [18] (schemat 2). Do syntezy zastosowano dwuetapową reakcję Perkina–Oglialoro. W pierwszym etapie reakcji pochodne aldehydu salicylowego poddano kondensacji z kwasami arylo- i heteroarylooctowymi w obecności octanu potasu w kwasie octowym. Otrzymane acetylowe pochodne kumaryn poddano następnie hydrolizie w środowisku kwaśnym, otrzymując docelowe związki z wydajnością końcową do 93% (schemat 2). Związki przebadano pod względem działania przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*), jak i Gram-ujemnym (*E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*).



Schemat 2. Synteza 3-podstawionych arylokumaryn

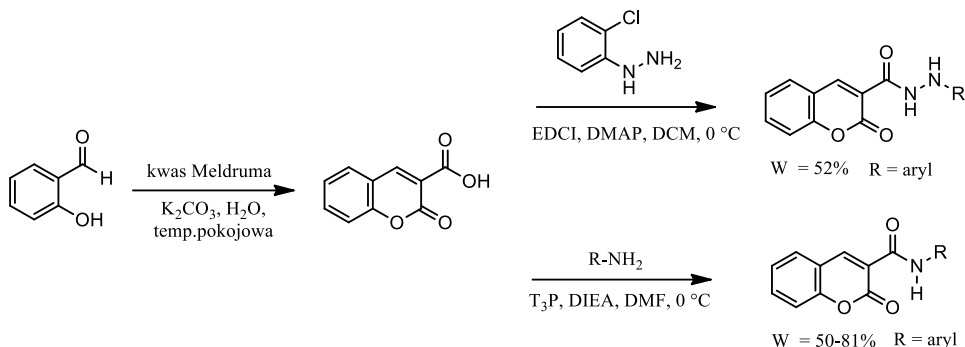
Wykazano, że obecność grup hydroksylowych w podstawniku arylowym obniżała aktywność antybakteryjną kumaryn. Kluczowe w działaniu antybakteryjnym okazały się grupa fenylowa przy C-3 oraz dwie grupy hydroksylowe w pozycjach C-5 oraz C-7. Pochodne te wydają się być dobrymi kandydatami do dalszych badań pod kątem poszukiwania nowych antybiotyków.

1.4. Właściwości przeciwrzybicze kumaryn

Większość poważniejszych infekcji grzybiczych u człowieka jest wywołana przez jeden z trzech głównych gatunków grzyba: *Candida*, *Cryptococcus* i *Aspergillus* [18]. Powierzchnowe infekcje grzybicze są łatwe do zdiagnozowania i możliwe jest skuteczne leczenie. Zagrożeniem są powikłania po nieleczonych zakażeniach, które mogą prowadzić nawet do śmierci pacjenta. Bardzo podatne na infekcje grzybicze są osoby będące w trakcie chemioterapii, przygotowujące się do zabiegu transplantacji, jak osoby chore na zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS) [19, 20].

Grzyby, podobnie do bakterii, zaczęły wykształcać coraz bardziej skomplikowane mechanizmy obronne, w wyniku czego kolejna grupa patogenów zyskała lekooporność.

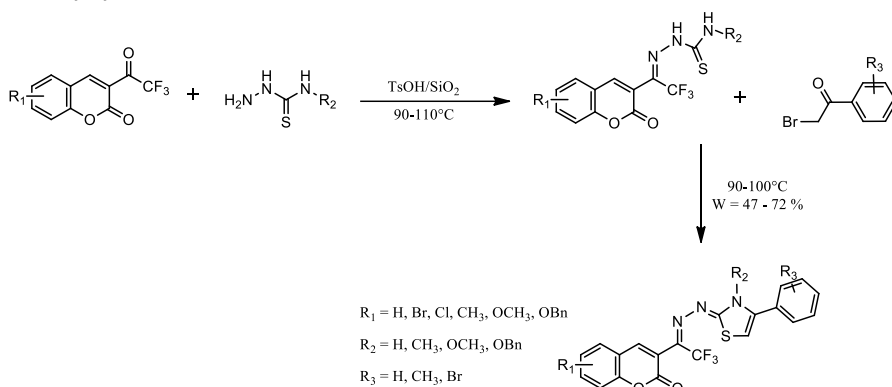
Sklania to naukowców do bezustannych poszukiwań nowych skutecznych leków również w grupie kumaryn. W trakcie poszukiwań skutecznych związków grzybobójczych zwrócono uwagę na pochodne amidowe oraz hydrazydowe kumaryny [21] (schemat 3).



Schemat 3. Synteza amidowych i hydrazydowych pochodnych kumaryny

Nowo otrzymane związki na bazie kumaryny wykazywały bardzo wysoką aktywność przeciwko szerokiej grupie grzybów. Chociaż ciężko było stwierdzić dokładną relację pomiędzy strukturą nowych kumaryn a ich aktywnością biologiczną, to wykazano, że grzybobójcze właściwości są silniej reprezentowane przez pochodne posiadające wiązanie hydrazynowe niż przez te z amidowym.

Niedawno grupa Yanga zaprezentowała triazolowe pochodne kumaryn [22]. Tiazole znane są ze swoich licznych aktywności biologicznych, w tym: antibakteryjnych, przeciwzapalnych i antynowotworowych. Nowe hybrydy kumaryny i tiazoli otrzymano w 2-etapowej syntezie przedstawionej na schemacie 4. Związki zostały poddane badaniu aktywności przeciwko *F. moniliforme*, *F. graminearum* i *C. lunata*. Spośród szeregu otrzymanych pochodnych na szczególną uwagę zwracały związki podstawione halogenem w pozycji C-6 kumaryny.



Schemat 4. Synteza tiazolowych pochodnych kumaryny

1.5. Właściwości antywirusowe

Wirusy stanowią globalne zagrożenie, a także powodują wiele medycznych oraz socjalnych problemów dla ludzkości (tab. 1). Są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za wiele mniejszych i większych wybuchów epidemii czy pandemii, jak było to w przypadku HIV, eboli, MERS, świńskiej i ptasiej grypy, dengi, a również COVID-19.

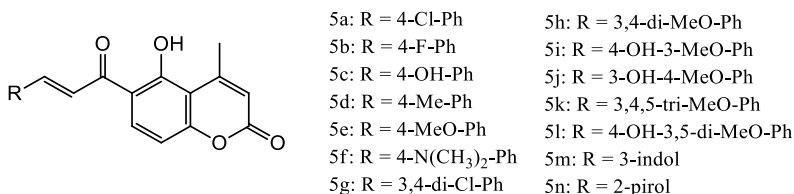
Pomimo że na przestrzeni lat odkryto całkowicie lub w pewnym stopniu skuteczne szczepionki oraz leki na wspomniane wyżej choroby, to tempo, z jakim wirusy są w stanie budować oporność na nowe farmaceutyki oraz mutować, zmusza do ciągłego poszukiwania nowych skutecznych metod ich zwalczania [23].

Tabela 1. Przegląd statystyk dotyczących śmierci wywołanych przez wybrane choroby wirusowe

Choroba	Okres występowania	Szacowana liczba zgonów	Źródło
Grypa „hiszpanka”	1918-1919	50-100 mln	[24]
Świńska grypa	2009-2010	ok. 285 tys.	[25]
Ptasia grypa	2003-2022	456	[26]
Grypa sezonowa	corocznie	0,29-0,65 mln	[27]
Zapalenie wątroby typu B i C	corocznie	1,11 mln (dane na 2019 rok)	[28]
HIV	1981-2022	40,1 mln	[29]
Denga	corocznie	25 tys.	[30]
COVID-19	2020-2023	6,85 mln	[31]

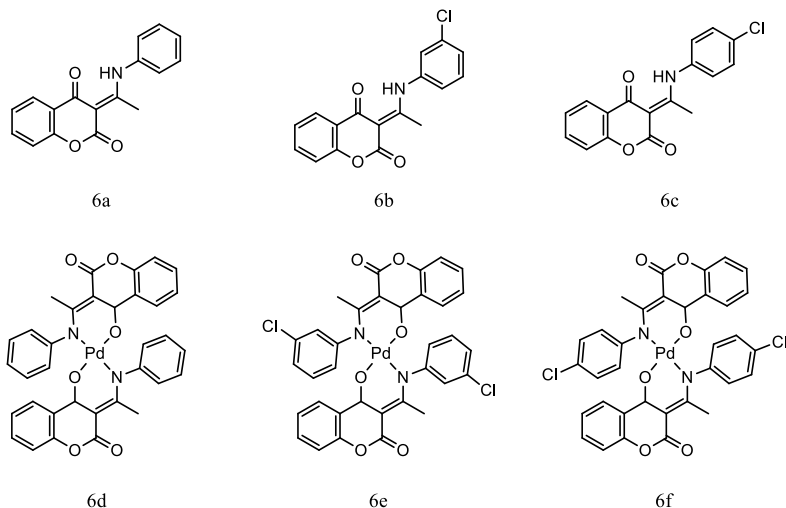
Większość z obecnych leków przeciwwirusowych blokuje wewnątrzkomórkowo syntezy konkretnych białek i kwasów nukleinowych niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wirusa. Cykl replikacyjny wirusa składa się z kilku etapów, do których zaliczamy m.in.: adsorpcję wirusa, połączenie z komórką, odwrotną transkrypcję, integrację, translację, podział proteolityczny, glikolizę oraz uwolnienie komórek wirusa [23]. Lek otrzymuje miano antywirusowego, jeśli skutecznie zaburza co najmniej jeden z wymienionych etapów. Wśród wielu naturalnych związków roślinnych oraz ekstraktów te z roślin kumaryny stanowią jeden ze szkieletów wiodących [32].

Do najgroźniejszych chorób zaliczany jest AIDS – wywołany przez wirus HIV. AIDS to ostatnie stadium infekcji tym wirusem. Pierwsza wzmianka oraz związany z nią wybuch epidemii AIDS w latach 80. w Stanach Zjednoczonych wzbudził panikę na masową skalę. Osoby zarażone wirusem HIV stopniowo podupadały na zdrowiu, a w wyniku osłabienia lub całkowitego zaniku układu odpornościowego umierały po zetknięciu się z jakimkolwiek patogenem. Nauka w tamtym momencie była bezsilna, mechanizm retrowirusa był na tyle skomplikowany, że do tej pory nie udało się stworzyć leku czy szczepionki, która na stałe usunęłaby HIV z organizmu. Jak się później okazało, główną przyczyną była zdolność wirusa do bardzo częstych mutacji, w wyniku czego farmaceutyk testowany na cząsteczce wirusa przed mutacją nie był nieskuteczny przeciwko nowej formie. Obecnie prowadzonych jest wiele badań i testów klinicznych w tym kierunku. Jedną z obiecujących terapii jest HAART (ang. *highly active antiretroviral therapy*) [33], która polega na przyjmowaniu kombinacji trzech różnych leków antyretrowirusowych, przez co obniża szansę na wykształcenie oporności wirusa. I chociaż terapia ta wykazuje pozytywne efekty względem obniżenia aktywności wirusa oraz wydłużenia życia pacjenta, to stosowane leki w dużym stopniu obciążają organizm. W związku z tym uwagę skupiono na poszukiwaniu naturalnych i mniej szkodliwych związków, które wykazałyby efektywne działanie przeciwko HIV. Kumaryna ze względu na swoje szerokie spektrum właściwości farmakologicznych została włączona do wielu badań anty-HIV. Wiele raportów potwierdziło, że pochodne kumaryny wykazywały aktywność inhibicji antyretrowirusowych enzymów (np. odwrotnej transkryptazy, proteazy, integrazy). W jednej z ostatnich prac naukowych postanowiono sprawdzić skuteczność pochodnych kumaryny podstawionych w pozycji C-5 i C-6 (rys. 5) [34]. Związki nie wykazały cytotoksyczności względem komórek ludzkich. Kumaryny oznaczone na rysunku 5 jako **5a**, **5g** i **5h** działały silnie przeciwwirusowo.



Rysunek 5. Kumaryny o potencjalnym działaniu anti-HIV

Przez ostatnie trzy lata doświadczyliśmy wybuchu pandemii, z jakim większość osób nigdy wcześniej nie miała do czynienia. Chaos, panika i straty pod względem ekonomicznym, jakie wywołał ten wirus, zmusiły do jak najszybszej reakcji obronnej w postaci wynalezienia leku lub szczepionki. Ludzkie koronawirusy to patogeny posiadające bardzo długie nici RNA, które powodują szeroki zakres chorób poprzez liczne mechanizmy [35]. Dostyc szybko odkryto, że białko S wirusa jest kluczowe, aby wniknął on do ludzkiego organizmu, ponadto okazało się, że białko to przyjmuje różne formy w konkretnej odmianie koronawirusa [36]. Kolejnym odkryciem było rozszyfrowanie podobnej do 3-chymotrypsyny SARS-CoV-2 proteazy odpowiedzialnej za cykl życiowy, replikację i transkrypcję wirusa. Te wydarzenia otworzyły wiele możliwych sposobów na walkę z nowym patogenem. Po kilku miesiącach intensywnych badań FDA zatwierdziła pierwszy lek (favilavir) do leczenia COVID-19. W kolejnych miesiącach przetestowano 2 związki o udowodnionych wcześniej właściwościach wirusobójczych: chlorochinę oraz cynanserynę, obydwa wykazały wysoki potencjał przeciwko SARS-CoV-2 [37]. Pochodne kumaryn, ze względu na swoje strukturalne podobieństwo względem wymienionych wyżej związków, zostały również przebadane pod kątem powinowactwa do wiązania proteazy koronawirusa. Badanie przeprowadzono na 3 pochodnych kumaryny oraz trzech kompleksach tych kumaryn z palladem(II) – rysunek 6 [35]. Wykazano, że pochodne kumaryn oraz ich palladowe kompleksy posiadają większe powinowactwo wiązania proteazy koronawirusa niż chlorochina i cynanseryna. Najbardziej stabilnym kompleksem okazał się kompleks **6b**. Wyniki wykazały również mniejszą toksyczność zarówno związku **6b**, jak i jego kompleksu **6e** w porównaniu do zatwierdzonych przez FDA leków.

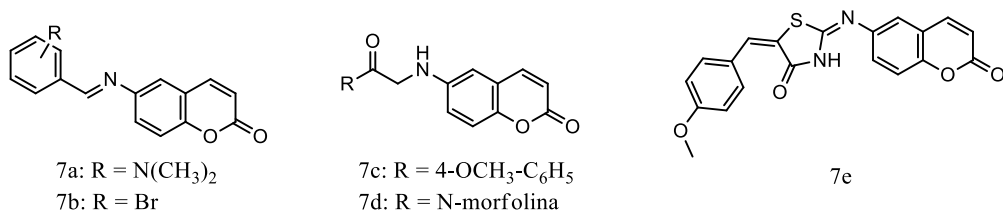


Rysunek 6. Pochodne kumaryn oraz ich kompleksy z palladem

1.6. Kumaryny i schorzenia neurodegeneracyjne

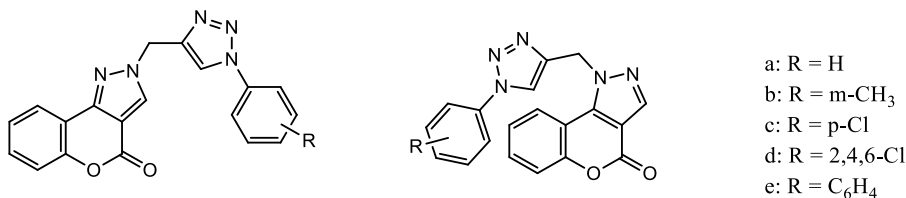
Choroby neurodegeneracyjne są bezpośrednio powiązane z wszelkiego rodzaju zaburzeniami związanymi z mózgiem oraz układem nerwowym. W przeciągu ostatniego stulecia zauważono drastyczny wzrost tych schorzeń, co w dużym stopniu wpłynęło na sektory medyczne, jak i również społeczne. W chorobach neurodegeneracyjnych obserwuje się utratę komórek nerwowych zarówno w mózgu, jak i w rdzeniu kręgowym. Utrata ta bezpośrednio prowadzi do zaburzenia funkcji sensoryczno-poznawczych (demencja) lub ich kompletnego zaniku (ataksja). Zaburzenia mitochondrialne, stres oksydacyjny, nieodpowiednia konformacja białek i apoptoza są głównymi czynnikami powodującymi takie choroby jak np. choroba Parkinsona, Alzheimer, stwardnienie rozsiane czy stwardnienie zanikowe boczne [38]. Obecnie komercyjnie dostępne oraz zatwierdzone leki związane z tymi chorobami tylko tymczasowo łagodzą objawy i nie zatrzymują w większym stopniu dalszej progresji choroby. Rozwija się wiele innowacyjnych terapii, do których efektywnego działania potrzebne jest znalezienie odpowiedniego związku z wieloma aktywnymi ligandami, które będą w stanie działać w szerokim spektrum objawów, a w najlepszym przypadku zatrzymają progres choroby.

Choroba Alzheimer jest odpowiedzialna za od 60% do 70% przypadków demencji, przy czym wg danych na 2022 rok łączna liczba osób dotkniętych wszystkimi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi wynosiła ok. 55 milionów [39]. Symptomy tej choroby związane są z problemami z pamięcią, wyrażaniem się, nietypowym zachowaniem oraz częściową lub całkowitą utratą zdolności motorycznych w ostatnim stadium. Szacowana długość życia pacjenta wynosi od 3 lat do 9 lat, w zależności od stadium oraz szybkości postępowania choroby. W ostatnim czasie sprawdzano potencjał kumaryn przeciwko chorobie Alzheimer [40]. Zbadano aktywność szeregu pochodnych 6-aminokumaryn przeciwko acetylcholinoestrazie (AChE) – rysunek 7. Największy potencjał względem leczenia choroby Alzheimer wykazywał związek **7d** i został on skierowany do dalszych badań.



Rysunek 7. Potencjalne inhibitory acetylcholinoestrazy

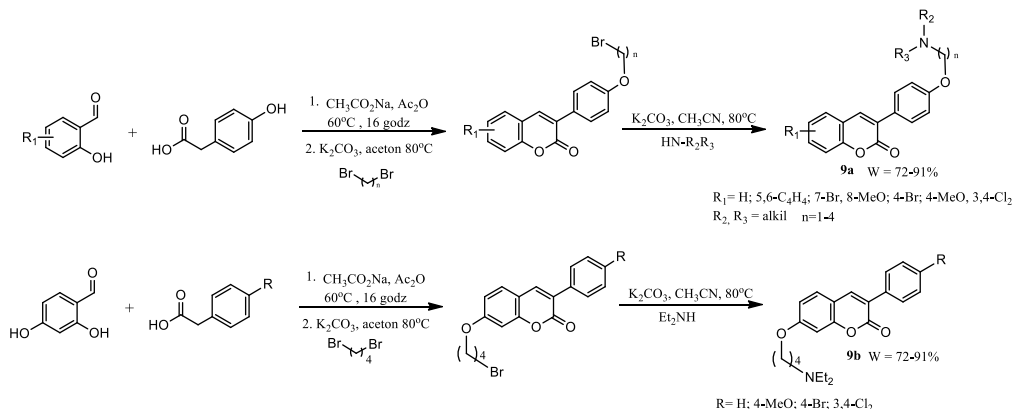
Przeprowadzono również badania w kierunku skuteczności kumaryn zawierających pierścienie triazolowy i pirazolowy [41]. Nowe kumaryny przetestowano zarówno pod względem aktywności przeciwko acetylcholinoestrazie oraz 5-lipoksygenazie. Największą efektywność spośród zsyntezowanych związków wykazywały pochodne posiadające podstawnik aryłowy z 3 atomami chloru (rys. 8).



Rysunek 8. Triazolowe i pirazolowe kumaryny

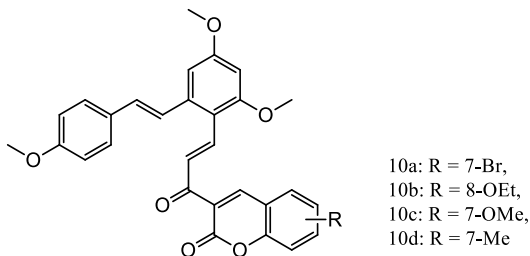
- a: R = H
- b: R = m-CH₃
- c: R = p-Cl
- d: R = 2,4,6-Cl
- e: R = C₆H₄

Obecność pierścieni heterocyklicznych w strukturze kumaryny wzmacnia ich biologiczne właściwości, podobnie jak pierścień aromatyczny. Potwierdziła to grupa Foroumadi [42]. Otrzymali oni łącznie 25 pochodnych (rys. 9), z których bardzo dobre właściwości hamujące acetylocholinoesterazę (AChE) wykazały związki zawierające grupę aminoalkoksylową w pozycji C-7 szkieletu kumaryny (**9b**). Wśród tych pochodnych dodatkowo kumaryny posiadające podstawniki 4-Br oraz 3,5-Cl₂ w pierścieniu fenyłowym wykazały właściwości protekcyjne przeciwko nadtlenkowi wodoru. Z kolei kumaryny zawierające podstawnik aminoalkoksylowy w grupie fenyłowej (**9a**) wykazywały dobrą aktywność przeciwko butyrylocholinoesterazie (BChE).



Rysunek 9. 3-Arylkumaryny o potencjalnych właściwościach inhibitujących przeciwko AChE i BChE

Ważnym enzymem, którego inhibicja potencjalnie opóźniłaby postępowanie choroby Alzheimera, jest monoaminooksydaza typu A i B (MAO-A i MAO-B). Selektywne inhibitory enzymu MAO-B są obecnie szczególnie badane, ponieważ zarówno choroba Alzheimera, jak i choroba Parkinsona są bezpośrednio związane z podwyższonym poziomem tego enzymu w mózgu. W tym kierunku testowano aktywność nowych 3-podstawionych kumaryn (rys. 10) [43].



Rysunek 10. Inhibitory monoaminooksydazy

W przypadku inhibicji enzymu MAO-A najaktywniejsze okazały się związki **10a** oraz **10b**, natomiast przeciwko MAO-B najlepsze rezultaty wykazały związki **10c** oraz **10d** (nawet wyższe wartości inhibitujące niż materiał odniesienia – selegilina).

2. Podsumowanie

Kumaryny należą do grupy związków organicznych o szerokim spektrum właściwości biologicznie czynnych. Ich prostota w budowie, właściwości chemiczne i wydajność dróg syntezy pozwalają otrzymywać różne pochodne. Nowe pochodne kumaryny są niezwykle atrakcyjne przede wszystkim w chemii medycznej. W niniejszym rozdziale przedstawiliśmy zbiór najnowszych prac, które podkreślają szeroki zakres działań farmakologicznych przypisywanych kumarynom (przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe i przeciwneurodegeneracyjne).

Literatura

1. Hoult J.R.S., Paya M., *Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential*, General Pharmacology: The Vascular System, 27, 1996, s. 713-722.
2. Stefanachi A., Leonetti F., Pisani L., Catto M., Carotti A., *Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds – literature review*, Molecules, 23, 2018, s. 250.
3. Srikrishna D., Godugu C., Dubey P.K., *A review on pharmacological properties of coumarins*, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 18, 2018, s. 113-141.
4. Cohen S.M., Ellwein L.B., *Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis*, Cancer Research, 1991, s. 6493-6505.
5. Fitzmaurice C., Dicker D., Pain A., Hamavid H., Moradi-Lakeh M., MacIntyre M.F., Allen C., Hansen G., Woodbrook R., Wolfe C., *Global burden of disease cancer collaboration. The global burden of cancer 2013*, JAMA Oncology, 2015, s. 505-527.
6. Pavlopoulou A., Spandidos D.A., Michalopoulos I., *Human cancer databases (review)*, Oncology Reports, 2015, s. 3-18.
7. Alderfer R.A., Hall M.D., Hambley T.W., *The discovery and development of cisplatin*, Journal of Chemical Education, 2006, s. 728-734.
8. Gigant B., Wang C., Ravelli R.B.G., Roussi F., Steinmetz M.O., Curmi P.A., Sobel A., Knossow M., *Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine*, Nature, 2005, s. 519-522.
9. Annunziata F., Pinna C., Dallavalle S., Tamborini L., Pinto A., *An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities*, International Journal of Molecular Sciences, 21(13), 2020, s. 4618, <https://doi.org/10.3390/ijms21134618>.
10. Sumorek-Wiadro J., Zając A., Langner E., Skalicka-Woźniak K., Maciejczyk A., Rzeski W., Jakubowicz-Gil J., *Antiglioma potential of coumarins combined with sorafenib*, Molecules, 2020, s. 5192.
11. Al-Majedy Y., Al-Amiery A., Kadhum A.A., Mohamad A.B., *Antioxidant activity of coumarins*, Systematic Reviews in Pharmacy, 8, 2017, s. 24-30.
12. Bubols G.B., Vianna D.R., Medina-Remon A., von Poser G., Lamuela-Raventos R.M., Eiffler-Lima V.L., Garcia S.C., *The antioxidant activity of coumarins and flavonoids*, Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2013, s. 318-334.
13. Malinowska M., Bielawska K., *Metabolizm i właściwości antyoksydacyjne kumaryny*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2013, s. 393-403.
14. Binda C., Milczek E.M., Bonivento D., Wang J., Mattevi A., Edmondson D.E., *Lights and shadows on monoamine oxidase inhibition in neuroprotective pharmacological therapies*, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2011, s. 2788-2796.

15. Sassetti E., Clausen M.H., Laraia L., *Small-molecule inhibitors of reactive oxygen species production*, Journal of Medicinal Chemistry, 2021, s. 5252-5275.
16. Limmathurotsakul D., Dunachie S., Fukuda K., Feasey N.A., Okeke I.N., Holmes A.H., Moore C.E., Dolecek C., van Doorn H.R., Shetty N., Lopez A.D., Peacock S.J., *Improving the estimation of the global burden of antimicrobial resistant infections*, Lancet Infectious Diseases, 2019, s. 392-398.
17. Matos M.J., Vazquez-Rodriguez S., Santana L., Uriarte E., Fuentes-Edfuf C., Santos Y., Muñoz-Crego A., *Looking for new targets: simple coumarins as antibacterial agents*, Medicinal Chemistry, 2012, s. 1140-1145.
18. Pisano M.B., Kumar A., Medda R., Gatto G., Pal R., Fais A., Era B., Cosentino S., Uriarte E., Santana L., Pintus F., Matos M.J., *Molecules*, 2019, s. 2815.
19. Prusty J.S., Kumar A., *Coumarins: antifungal effectiveness and future therapeutic scope*, Molecular Diversity, 2020, s. 1367-1383.
20. Al-Amiery A.A., Kadhum A.A., Mohamad A.B., *Antifungal activities of new coumarins*, Molecules, 2012, s. 5713-5723.
21. Yu X., Teng P., Zhang Y.L., Xu Z.J., Zhang M.Z., Zhang W.H., *Design, synthesis and antifungal activity evaluation of coumarin-3-carboxamide derivatives*, Fitoterapia, 2018, s. 387-395.
22. Yang G., Shi L., Pan Z., Wu L., Fan L., Wang C., Xu C., Liang J., *The synthesis of coumarin thiazoles containing a trifluoromethyl group and their antifungal activities*, Arabian Journal of Chemistry, 2021, s. 102880.
23. Hassan M.Z., Osman H., Ali M.A., Ahsan M.J., *Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents*, European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, s. 236-255.
24. Morens D.M., Taubenberger J.K., Harvey H.A., Memoli M.J., *The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future*, Critical Care Medicine, 2010, s. 10-20.
25. Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P.Y., Bandaranayake D., Breiman R.F., Brooks W.A., Buchy P., Feikin D.R., *Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study*, Lancet Infectious Diseases, 2012, s. 687-695.
26. [www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a\(h5n1\)-reported-to-who-2003-2022-27-june-2022](http://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a(h5n1)-reported-to-who-2003-2022-27-june-2022) [data dostępu: 23.02.2023].
27. www.who.int/news/item/13-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year [data dostępu: 23.02.2023].
28. World Health Organization, *Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections*, 2021.
29. www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids [data dostępu: 23.02.2023].
30. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75303/9789241504034_eng.pdf [data dostępu: 23.02.2023].
31. <https://covid19.who.int/table> [data dostępu: 23.02.2023].
32. Mishra S., Pandey A., Manvati S., *Coumarin: An emerging antiviral agent*, Heliyon, 2020, s. 3217.
33. Lu D.Y., Wu H.Y., Yarla N.S., Xu B., Ding J., Lu T.R., *HAART in HIV/AIDS treatments, future trends*, Infectious Disorders – Drug Targets, 2018, s. 15-22.
34. Srivastav V.K., Tiwari M., Zhang X., Yao X.-J., *Synthesis and antiretroviral activity of 6-acetyl-coumarin derivatives against HIV-1 infection*, Indian Journal Pharmaceutical Sciences, 2018, s. 108-117.
35. Milenković D.A., Dimić D.S., Avdović E.H., Marković Z.S., *Several coumarin derivatives and their Pd(II) complexes as potential inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2, an in silico approach*, RSC Advances, 2020, s. 35099-35108.

36. Hu B., Zeng L.P., Lou Yang X., Ge X.Y., Zhang W., Li B., Xie J.Z., Shen X.R., Zhang Y.Z., Wang N., Luo D.S., Zheng X.S., Wang M.N., Daszak P., Wang L.F., Cui J., Shi Z.L., *Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus*, PLoS Pathogens, 2017, s. 1006698.
37. Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., Shi Z., Hu Z., Zhong W., Xiao G., *Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro*, Cell Research, 2020, s. 269-271.
38. Jameel E., Umar T., Kumar J., Hoda N., *Coumarin: A privileged scaffold for the design and development of antineurodegenerative agents*, Chemical Biology & Drug Design, 2016, s. 21-38.
39. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia [data dostępu: 23.02.2023].
40. Mahmoud W.R., Nissan Y.M., Elsawah M.M., Refaey R.H., Ragab M.F., Amin K.M., *Neurobehavioral investigation and acetylcholinesterase inhibitory activity study for some new coumarin derivatives*, European Journal of Medicinal Chemistry, 2019, s. 111651.
41. Chekir S., Debbabi M., Regazzetti A., Dargère D., Laprèvote O., Ben Jannet H., Gharbi R., *Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,2,3-triazole linked coumarinopyrazole conjugates as potent anticholinesterase, anti-5-lipoxygenase, anti-tyrosinase and anti-cancer agents*, Bioorganic Chemistry, 2018, s. 189-194.
42. Abdshahzadeh H., Golshani M., Nadri H., Saberi Kia I., Abdolahi Z., Forootanfar H., Ameri A., Tüylü Küçükkılınc T., Ayazgok B., Jalili-Baleh L., Sadat Ebrahimi S.E., Moghimi S., Haririan I., Khoobi M., Foroumadi A., *3-Aryl coumarin derivatives bearing aminoalkoxy moiety as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease*, Chemistry & Biodiversity, 2019, s. 1800436.
43. Ruan B.-F., Cheng H.-J., Ren J., Li H.-L., Guo L.-L., Zhang X.-X., Liao C., *Novel 2H-chromen-2-one derivatives of resveratrol: Design, synthesis, modeling and use as human monoamine oxidase inhibitors*, European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, s. 185-190.

Postępy w syntezie i potencjalnie bioaktywne kumaryny

Streszczenie

Kumaryny oferują szeroką gamę możliwości projektowania nowych związków biologicznie aktywnych. Ich szkielet można spotkać w budowie wielu powszechnie używanych leków stosowanych przeciwko różnym schorzeniom. Dobrym przykładem jest stosowanie warfaryny, acenokumarolu i fenprocumonu w leczeniu i profilaktyce chorób zakrzepowo-zatorowych. Pomimo wykazywania znacznej ilości działań biologicznych przez kumaryny, ich zastosowanie na rynku farmaceutycznym nie jest jeszcze powszechne. Konieczne jest zatem podjęcie dalszych badań w kierunku uzyskania leków charakteryzujących się doskonałymi właściwościami farmakokinetycznymi, wysoką skutecznością i niskim profilem toksyczności – na bazie pochodnych kumaryn. W niniejszej pracy zostały przedstawione najnowsze osiągnięcia z zakresu projektowania i zastosowania nowych pochodnych kumaryn jako potencjalnych związków do syntezy leków.

Słowa kluczowe: kumaryny, antygrzybicze, nowotwór, antybakteryjne

Advances in synthesis and potentially bioactive coumarins

Abstract

Coumarins are a valuable source of inspiration in the design of new biologically active compounds. This natural backbone is present in many available drugs used to treat a variety of diseases. Examples include the use of warfarin, acenocoumarol and fenprocoumon in the treatment and prevention of thromboembolic diseases. Although coumarin derivatives show an impressive number of biological activities, their presence among commercially available drugs is not yet widespread. Further efforts are therefore needed to obtain coumarin-based compounds with excellent pharmacokinetic properties, high efficacy and low toxicity profile. In this paper, we discuss the latest developments in the design and application of new coumarin derivatives, which can be a valuable contribution to further drug design.

Keywords: coumarins, antifungal, cancer, antibacterial

Sondy fluorescencyjne oparte na szkielecie kumaryny do wykrywania biologicznych tioli

1. Sondy fluorescencyjne jako czujniki biomolekuł – wprowadzenie

Możliwości „zagłądania do wnętrza ciała” lub „zagłądania do komórek” są niezbędne w diagnostyce i leczeniu chorób, a także w badaniach podstawowych procesów życiowych. Pożądane jest, aby stosowane metody nie były inwazyjne, tzn. nie wymagały nacinania powłok ciała lub izolowania składników komórkowych. Dlatego coraz większego znaczenia w naukach biomedycznych nabierają techniki wizualizacji fizjologicznych zmian w organizmie i komórkach za pomocą sond fluorescencyjnych.

Sondy fluorescencyjne to cząsteczki, które absorbują światło o określonej długości fali i emitują światło o innej, zazwyczaj dłuższej długości fali (fluorescencja). Cząsteczki te, znane również jako fluorofory, mogą być dołączone do cząsteczki docelowej i działać jako znacznik do analizy za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.

Zastosowanie cząsteczek fluorescencyjnych w badaniach biologicznych ma kluczowe znaczenie w wielu aplikacjach. Sondy fluorescencyjne w połączeniu z nowoczesną technologią obrazowania bioluminescencji pozwalają na detekcję składników biologicznych w organizmach *in vitro* oraz *in vivo* na poziomie komórkowym lub zwierzęcym. Wśród niektórych zastosowań sond fluorescencyjnych można wymienić wykorzystanie do wykrywania lokalizacji i aktywacji białek, identyfikacji tworzenia kompleksów białkowych, monitorowania procesów biologicznych, wykrywania i ilościowego oznaczania jonów. W ostatnich latach obserwuje się bardzo duże zaangażowanie naukowców w opracowanie odpowiednich czujników chemicznych do wykrywania i monitorowania zmian chorobowych związanych z poziomem biologicznych tioli. Jedną z prostych molekuł stosowanych jako sondy fluorescencyjne do wykrywania biotiole są pochodne kumaryny.

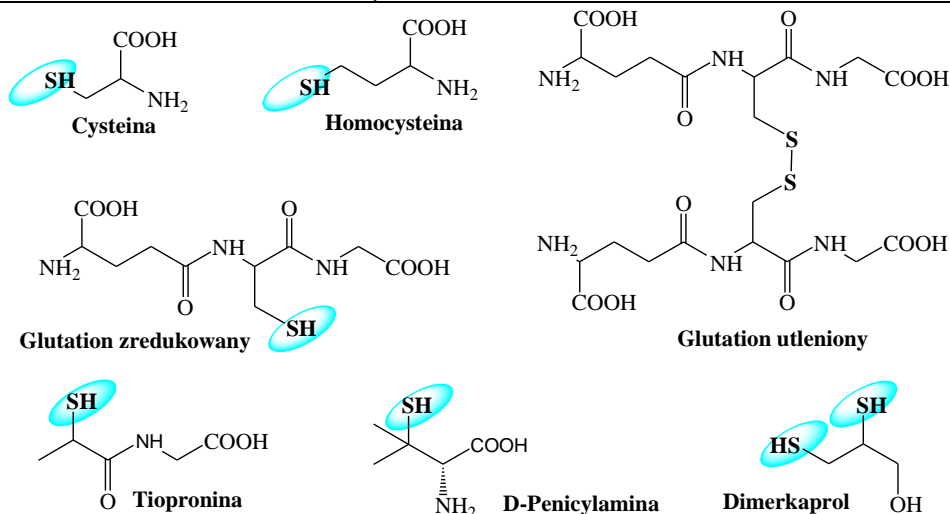
W niniejszej pracy przedstawimy kumaryny, które w ostatnich latach miały istotne znaczenie jako sondy chemiczne do wykrywania grup tiolowych. Zaprezentujemy metody ich syntezy, sposoby detekcji tioli oraz mechanizm działania w żywych układach pozwalający na rejestrowanie zmian procesów biologicznych.

2. Związki tiolowe w diagnostyce chorób

Związki zawierające grupy tiolowe odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych [1, 2]. Najbardziej powszechnymi i niezwykle istotnymi związkami zawierającymi grupy tiolowe są aminokwasy takie jak cysteina (Cys), homocysteina (Hcy) oraz glutation (GSH). Spośród tioli Cys, Hcy i GSH występują w największym stężeniu w organizmach żywych w zakresie od 240 μM do 360 μM (Cys), od 12 μM do 15 μM (Hcy) i od 1 μM do 10 mM (GSH) [3]. Cysteina i homocysteina posiadają te same aktywne grupy funkcyjne, tj. $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ i $-\text{COOH}$, natomiast glutation występuje zwykle w formie utlenionej i zredukowanej. Należy również wspomnieć o tiolach takich jak tiopronina, dimerkaprol i penicylamina stosowanych w leczeniu wielu chorób [4] (rys. 1).

¹ katarzyna.szwaczko@umcs.pl, Katedra Chemii Organicznej i Krystalochemii Instytutu Nauk Chemicznych UMCS w Lublinie.

² kamil.dziuba@umcs.pl, Katedra Chemii Organicznej i Krystalochemii Instytutu Nauk Chemicznych UMCS w Lublinie.



Rysunek 1. Wybrane tiole o znaczeniu biologicznym

W ostatnich latach liczne badania potwierdziły, że reaktywne formy siarki, takie jak tiole, odgrywają ważną rolę w komórkach roślinnych i zwierzęcych. W roślinach utrzymują one homeostazę redoks, wpływają na fotosyntezę i procesy transdukcji sygnału, a także zwiększają tolerancję roślin na stres oksydacyjny [5]. Glutathion z kolei występuje najobficiej w komórkach zwierzęcych, a zmiany jego poziomu mogą być przyczyną poważnych problemów zdrowotnych serca, a nawet nowotworów [6, 7]. Stwierdzono również związek między nieprawidłowym poziomem cysteiny a uszkodzeniem wątroby, zmianami skórными oraz AIDS [8, 9]. Z kolei nieprawidłowe stężenie homocysteiny w ludzkim osoczu zostało powiązane z chorobami sercowo-naczyniowymi, chorobą Alzheimera, schorzeniami neuropsychiatrycznymi, udarem mózgu [10-13]. Wykrywanie biotiole w próbkach biologicznych jest zatem bardzo ważne. W tym celu pożądane są szybkie, czułe i dokładne metody ich detekcji.

3. Mechanizm działania sond fluorescencyjnych

Cząsteczki fluorescencyjne reagują na światło w sposób odmienny niż inne zwykłe cząsteczki. Foton światła wzbudzającego jest absorbowany przez elektron cząsteczki fluorescencyjnej, co podnosi poziom energetyczny elektronu do stanu wzbudzonego. Podczas tego okresu wzbudzenia część energii jest rozpraszana przez zderzenia molekularne lub przekazywana do bliższej cząsteczki, a pozostała energia jest emitowana jako foton, aby sprowadzić elektron z powrotem do stanu podstawowego. Emitowany foton zwykle niesie mniejszą energię i dlatego ma większą długość fali niż foton wzbudzający, a emitowaną fluorescencję można odróżnić od światła wzbudzającego. Wzbudzenie i emisja fotonów z cząsteczki odbywa się cyklicznie i może być ona wielokrotnie wzbudzana. Fluorofory mogą więc emitować liczne fotony w cyklu wzbudzenia i emisji, dlatego są wykorzystywane w szerokim zakresie zastosowań badawczych [14].

Zarówno długość fali wzbudzenia jak i emisji są cechami charakterystycznymi dla każdego fluoroforu. Cechą każdego fluoroforu i kluczowym aspektem w wykrywaniu emitowanej fluorescencji w zastosowaniach biologicznych jest przesunięcie Stokesa. Przesunięcie Stokesa (*Stokes shift*) jest to przesunięcie maksimum pasma absorpcji

względem pasma emisji dla tego samego stanu wzbudzonego. Fluorofory z dużym przesunięciem Stokesa są łatwe do odróżnienia ze względu na dużą separację pomiędzy długością fali wzbudzenia i emisji [15].

Postęp technologiczny pozwala obecnie na wykrywanie fluoroforów poza granicami widma widzialnego i w zakresach ultrafioletu (UV) oraz podczerwieni (IR) widma elektromagnetycznego. Oferuje to większą zmienność, wszechstronność i możliwość nowych aplikacji.

Technika wykorzystania sond fluorescencyjnych w obrazowaniu bazuje przede wszystkim na zmianie właściwości fotofizycznych cząsteczki sondy przed i po specyficznym związaniu z analitem, tak aby wykryć zmianę sygnału fluorescencji podczas wykrywania różnych cząsteczek lub jonów w organizmie lub środowisku. Na rysunku 2 przedstawiono sondę fluorescencyjną opartą na szkielecie kumaryny, która posłużyła do detekcji jonów Al^{3+} [16]. Kumaryna w postaci niezwiązanej wykazywała słabą fluorescencję. Po związaniu jonów glinu następowało przesunięcie pasma emisji batochromowe i 24-krotne wzmocnienie początkowo słabego pasma fluorescencji przy λ_{max} 453 nm do 461 nm. Co ważne, za pomocą sondy możliwe było obrazowanie jonów Al^{3+} w obszarze wewnątrzkomórkowym żywych ludzkich komórek raka szyjki macicy.



Rysunek 2. Sonda fluorescencyjna na bazie kumaryny do wykrywania jonów glinu oraz obrazowania komórek nowotworowych; źródło [16]

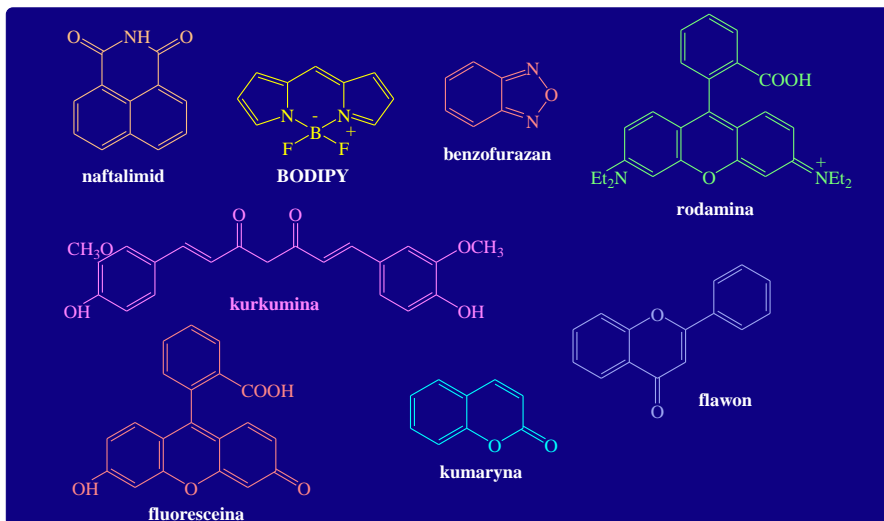
4. Sondy do monitorowania związków tiolowych

Znanych jest wiele różnych metod detekcji tioli, które nadają się do rutynowych badań klinicznych i naukowych. Wśród nich można wymienić wysokosprawną chromatografię ciekową (HPLC/UV), spektrometrię mas (MS), HPLC-MS, testy kolorymetryczne, testy enzymatyczne, elektroforezę kapilarną i żelową [17-21]. Większość z tych metod wymaga skomplikowanego i długotrwałego etapu przygotowania próbki oraz uprzednio procesu homogenizacji w celu rozbicia komórek lub tkanek przed zastosowaniem metody analitycznej. Ze względu na niestabilność chemiczną tioli, etap przygotowania próbki dość często może wprowadzać potencjalne artefakty i powodować utratę analitu.

W ciągu ostatnich dwóch dekad jednym z najbardziej popularnych podejść rozwijanych w celu analizy analitu w żywych komórkach było wykorzystanie techniki obrazowania fluorescencyjnego poprzez zastosowanie sond fluorescencyjnych [22]. Obrazowanie fluorescencyjne wyróżnia się prostotą, wysoką czułością i możliwością wizualizacji analitów w żywych komórkach w sposób nieinwazyjny, umożliwiając określenie wewnątrzkomórkowej dystrybucji i dynamicznego ruchu analitu w jego nienaruszonym środowisku natywnym.

Dotychczas skonstruowano wiele sond fluorescencyjnych opartych na prostych szkieletach związków organicznych lub ich kompleksach z metalami. Wśród najlepiej znanych

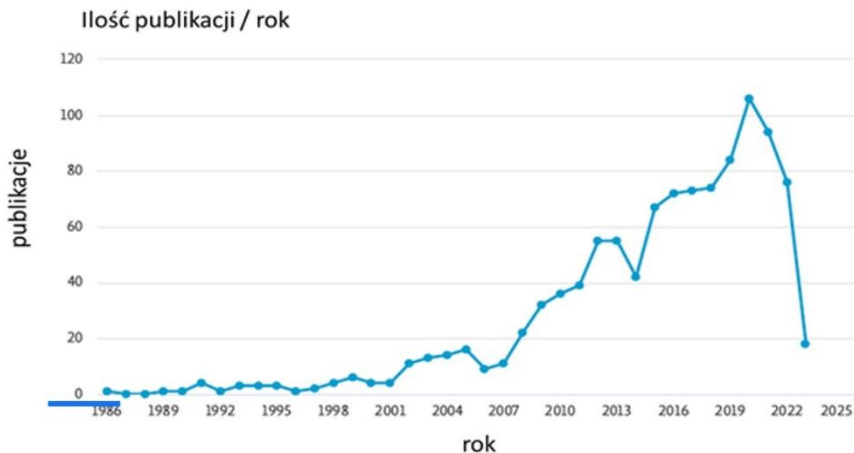
fluoroforów wykorzystywanych do otrzymywania sensorów służących do obrazowania związków tiolowych należy wymienić fluoresceinę, rodaminę, BODIPY (4,4-difluoro-4-borata-3*a*,4*a*-diaz-a-indaken), naftalimid, flawon, kurkuminę, benzofurazan oraz kumaryny [23-35] (rys. 3).



Rysunek 3. Przykłady fluoroforów wykorzystywanych do detekcji biotoli

W ostatnich latach wiele uwagi przyciągają sondy fluorescencyjne oparte na prostym i łatwo dostępnym chemicznie szkielecie kumaryn. W licznych publikacjach przeglądowych dokładnie zebrano i opisano ogromne właściwości aplikacyjne kumarynowych sond fluorescencyjnych [36-42].

Przeglądając i analizując statystyki z bazy Scopus z użyciem słów kluczowych „coumarin and probe” można być pod dużym wrażeniem liczby opublikowanych prac naukowych; ponad 1000 artykułów naukowych i 36 500 wyników patentowych od 1986 roku. Najważniejsza jest jednak, obserwowana od 2008 roku, wzrostowa linia trendu dotycząca ilości opublikowanych prac naukowych (rys. 4).

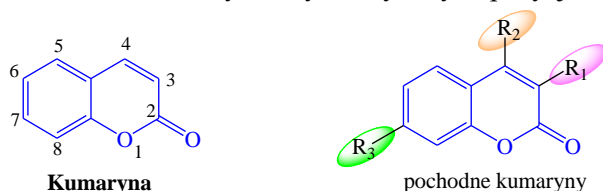


Rysunek 4. Ilość prac naukowych na przestrzeni lat dotycząca sond na bazie kumaryn. Wygenerowano 26.01.2023 z www.scopus.com

Ilość publikacji jednoznacznie wskazuje, że badania te są bardzo ważne, a pozycja kumaryn wykorzystywanych jako sondy fluorescencyjne jest już mocno ugruntowana w nauce.

5. Właściwości fizykochemiczne prostych kumaryn

Proste kumaryny to połączenie szkieletu 2*H*-piran-2-onu z pierścieniem benzenowym. To organiczne związki heterocykliczne należące do podgrupy laktonów o szkielecie benzo- α -pironu (2*H*-1-benzopiran-2-onu), których nomenklatura systematyczna została ustalona przez IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) [43]. Wiązanie C=C w kumarynach jest stale w konformacji *cis* i przyczynia się do silnej emisji fluorescencji oraz dobrej fotostabilności związków. Chociaż wszystkie miejsca C-H (6 miejsc) i wiązanie C=C są podatne na postfunkcjonalizację, najbardziej reaktywne chemicznie są pozycje C-3 i C-4. Co ciekawe, większość naturalnych kumaryn posiada tlenowy podstawnik w pozycji C-7, podczas gdy najważniejsze fluorescencyjne kumaryny mają podstawnik aminowy lub hydroksylovowy w pozycji C-7 (rys. 5).

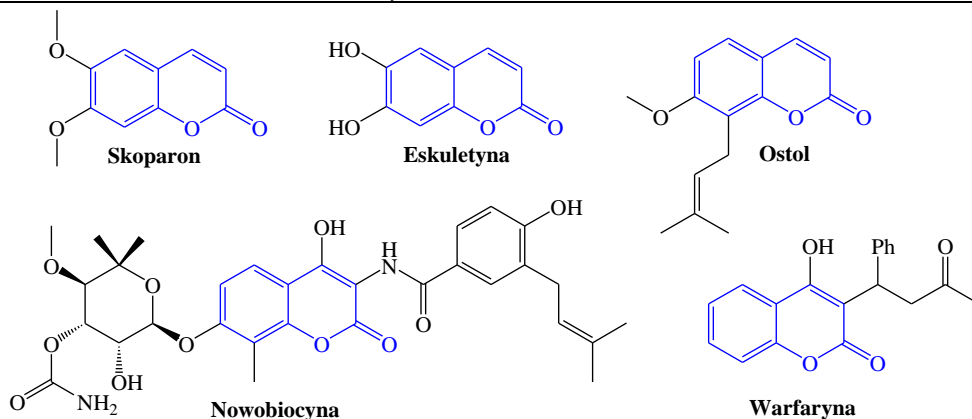


Rysunek 5. Prosta kumaryna oraz najczęstsze modyfikacje szkieletu kumaryny

Naturalna kumaryna jest pozyskiwana z bobu tonka – nasion drzew tonkowca wonnego, które rosną m.in. w Wenezueli, Kolumbii, Gujanie i Brazylii. Szacuje się, że obecnie znanych jest ponad 1300 naturalnych kumaryn wyizolowanych z roślin, grzybów i bakterii. W przyrodzie kumaryny są wtórnymi metabolitami i często pełnią rolę ochronną, hamując różne procesy biologiczne.

Z chemicznego punktu widzenia kumaryny to cząsteczki o kilku atrakcyjnych cechach, takich jak mała masa cząsteczkowa, prosta struktura, wysoka biodostępność, dobra rozpuszczalność w większości rozpuszczalników organicznych oraz niska toksyczność. Cechy te, wraz z szerokim spektrum aktywności biologicznej, przyczyniają się do ich znaczącej roli jako związków wiodących w badaniach nad potencjalnymi lekami [44, 45].

Szeroki i różnorodny obszar zastosowania kumaryn w naukach medycznych, badaniach biomedycznych oraz w wielu gałęziach przemysłu, w tym w perfumerii, jest imponujący. Profil farmakologiczny tych fitochemikaliów obejmuje ich działanie przeciwbakteryjne (agasylina), przeciwzapalne (kumaryna), przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, antyoksydacyjne (eskuletyna), przeciwgrzybicze, przeciwzakrzepowe (warfaryna), anti-HIV (rys. 6) [46-51].



Rysunek 6. Przykłady pochodnych kumaryny wykorzystywanych w medycynie

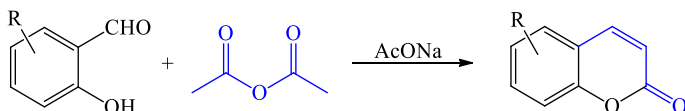
6. Metody syntezy szkieletu kumaryny

Dotychczas w literaturze opisano szereg efektywnych metod syntezy pochodnych kumaryny z wykorzystaniem dobrze znanych protokołów reakcji takich jak reakcja Perkina, reakcja Pechmanna, przegrupowanie Claisena, reakcja Knoevenagela, reakcja sprzęgania Kostaneckiego–Robinsona, reakcja Reformatskiego, reakcja Wittiga, addycja Michaela oraz reakcja Baylisa–Hillmana, które przebiegają w obecności homogenicznych lub heterogenicznych układów katalitycznych na bazie zasad, ale również kwasów Lewisa lub kompleksów metali przejściowych. W celu zademonstrowania użyteczności syntetycznej tych podstawowych metod otrzymywania szerokiej gamy pochodnych kumaryny przedstawiamy poniżej ich najważniejsze przykłady.

6.1. Reakcja Perkina

W 1968 roku po raz pierwszy Perkin zademonstrował metodę syntezy kumaryny w reakcji kondensacji prostego aldehydu salicylowego z bezwodnikiem octowym w obecności octanu sodu.

Generalnie reakcja Perkina jest przykładem reakcji aldolowej prowadzącej w pierwszym etapie do utworzenia z pochodnych aldehydu salicylowego i bezwodnika octowego odpowiednich aromatycznych α,β -nienasyconych kwasów karboksylowych, które następnie preferencyjnie ulegają wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do odpowiednich kumaryny (schemat 1) [52].

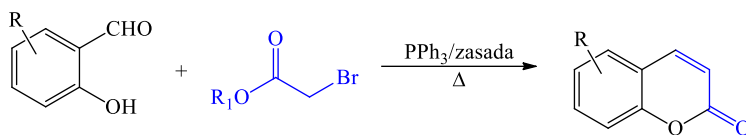


Schemat 1. Synteza pochodnych kumaryny w reakcji Perkina

6.2. Reakcja Wittiga

W 1979 roku niemiecki chemik Georg Wittig otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za odkrycie preparatywnie użytecznej metody otrzymywania olefin, która umożliwiła syntezę wielu produktów naturalnych oraz farmakologicznie aktywnych związków. Reakcja Wittiga została również z powodzeniem wykorzystana do syntezy pochodnych kumaryny w reakcji różnorodnych aldehydów posiadających w pozycji *orto* grupę

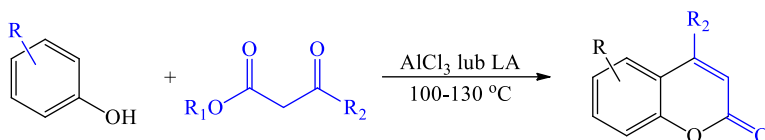
karbonylową z alkilideno fosforanami generowanymi *in situ* z udziałem trifenylfosfiny w obecności zasady (schemat 2) [53].



Schemat 2. Synteza pochodnych kumaryn w reakcji Wittiga

6.3. Reakcja Pechmanna

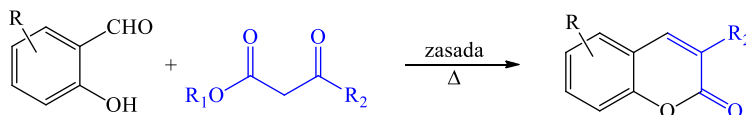
Kolejnym ważnym przykładem syntezy kumaryn jest odkryta przez Pechmanna w 1883 roku reakcja kondensacji aktywowanych fenoli z acetylooctanem etylu w środowisku kwaśnym. Reakcja Pechmanna jest jedną z najbardziej znanych i rozpowszechnionych metod preparatywnego otrzymywania 4-podstawionych kumaryn z dużej i łatwo dostępnej puli bloków budulcowych, jak pochodne fenolu i β -ketoestrów (schemat 3) [54]. Dotychczas w tej reakcji przetestowano szereg katalizatorów, w tym kwas siarkowy, kwas trifluorooctowy, pięciotlenek fosforu oraz kwasy Lewisa, tj. $ZrCl_4$ oraz $TiCl_4$, które umożliwiły tworzenie się kumaryn w reakcji Pechmanna z bardzo dobrą wydajnością.



Schemat 3. Synteza 4-podstawionych kumaryn w reakcji Pechmanna

6.4. Reakcja Knoevenagela

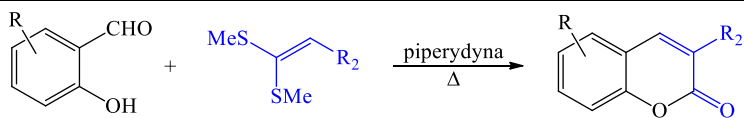
Reakcja Knoevenagela pozwala selektywnie uzyskać szereg 3-podstawionych pochodnych kumaryny na bazie łatwo dostępnych pochodnych aldehydu salicylowego. W celu otrzymania kumaryn z dobrą wydajnością reakcje 2-hydroksybenzaldehydów z odczynnikami sprzęgającym, posiadającym aktywną grupę metylenową, należy prowadzić w obecności zasady w podwyższonej temperaturze (schemat 4) [55].



Schemat 4. Synteza 3-podstawionych kumaryn w reakcji Knoevenagela

6.5. Addycja Michaela

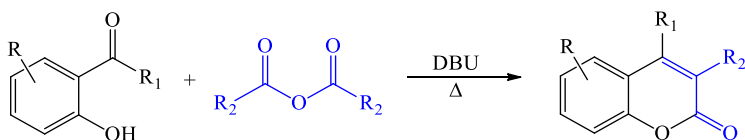
Efektywne przeprowadzenie syntezy pochodnych 3-kumaryny jest możliwe również z wykorzystaniem reakcji Michaela. Reakcja przebiega dwuetapowo, początkowo poprzez addycję 2-hydroksybenzaldehydu do α,β -nienasyconych ditioacetaloaryloketonów, a następnie przejściowy addukt ulega wewnątrzcząsteczkowej kondensacji aldolowej w obecności zasady, tj. piperydyny, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika z utworzeniem 3-podstawionych pochodnych kumaryn z dobrą wydajnością (schemat 5) [56].



Schemat 5. Synteza 3-podstawionych kumaryn w reakcji Michaela

6.6. Reakcja kondensacji Kostaneckiego

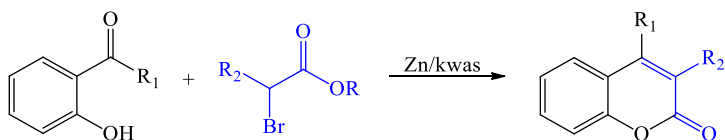
Reakcja Kostaneckiego była wykorzystana do syntezy podstawionych kumaryn i chromonów z 2-hydroksybenzaldehydów i bezwodników alifatycznych w zasadowym środowisku, jednak sprawiała dużo kłopotów syntetycznych: duży nadmiar odczynników, trudne warunki reakcji oraz niska wydajność. Okazało się, że zastosowanie DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en) jako zasady pozwoliło uzyskać z bardzo dobrą wydajnością szeroki dostęp do 3,4-podstawionych kumaryn w reakcji łatwo dostępnych 2-hydroksybezofenonów z alifatycznymi bezwodnikami w stosunkowo łagodnych warunkach (schemat 6) [57].



Schemat 6. Synteza 3,4-podstawionych kumaryn w reakcji Kostaneckiego

6.7. Reakcja Reformatskiego

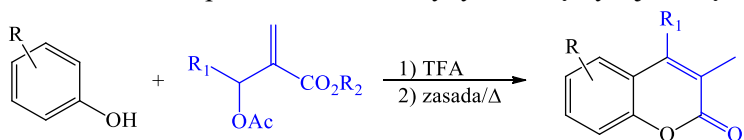
Zasadniczo reakcja Reformatskiego jest jedną z najbardziej przydatnych procedur tworzenia wiązań C-C pomiędzy związkiem karbonylowym a aktywowanym w obecności cynku halogenkiem alkilowym, która stosowana jest w syntezie organicznej do syntezy β -hydroksyestrów. W warunkach reakcji Reformatskiego 2-hydroksyalkilo- lub aryloketony mogą być łatwo przekształcane w reakcji z α , β -nienasyconymi estrami w odpowiednie 3,4-podstawione pochodne kumaryny z dobrą wydajnością (schemat 7) [58].



Schemat 7. Synteza 3,4-podstawionych kumaryn w reakcji Reformatskiego

6.8. Przegrupowanie Claisena

Dipodstawione kumaryny można również otrzymać w reakcji przegrupowania Claisena z wykorzystaniem kwasu trifluorooctowego (TFA) jako homogenicznego promotora (schemat 8) [59]. W reakcji pochodnych fenolu z zabezpieczonymi α -hydroksyalkiloakrylanami w obecności TFA w wyniku przegrupowania 3,3-sigmatropowego powstają w łagodnych warunkach 3,4-podstawione kumaryny z dobrą wydajnością.



Schemat 8. Synteza 3,4-podstawionych kumaryn w reakcji Claisena

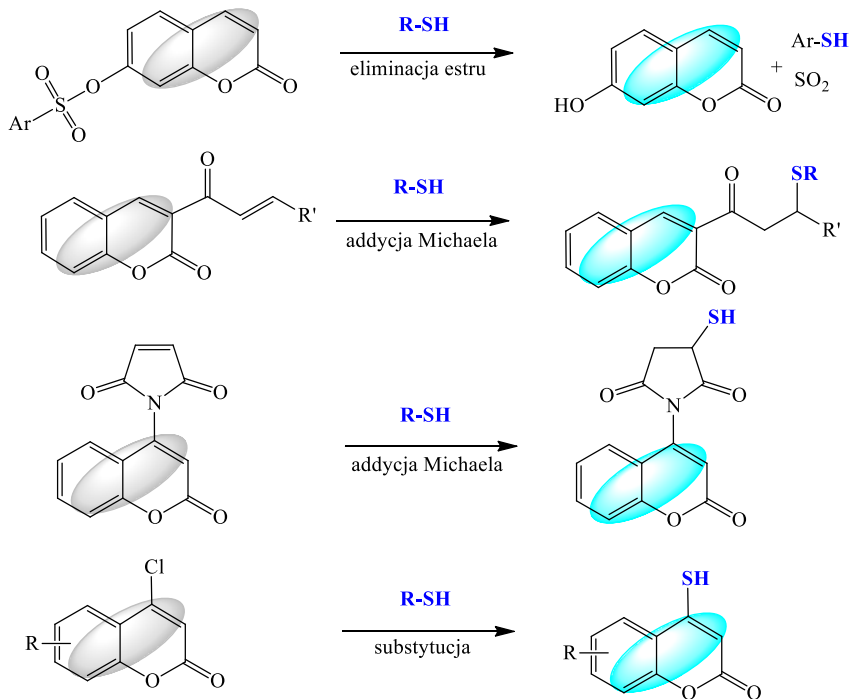
7. Kumarynowe sondy do detekcji biotoli – przegląd literatury od roku 2017

Kumaryny są grupą barwników fluorescencyjnych charakteryzujących się dużą wydajnością kwantową emisji. Posiadają sprzężony układ wiązań π o dużej gęstości elektronicznej, wrażliwy na obecność podstawników o charakterze elektronodonorowym i elektroakceptorowym. Prosta kumaryna wykazuje bardzo słabą fluorescencję, ale odpowiednio zaprojektowane pochodne dają intensywną fluorescencję i są szeroko stosowane jako barwniki i sondy. Ważną klasę emiterów stanowią kumaryny podstawione grupami elektronodonorowymi przy C-7 (-OH, -NH₂, -N(Et)₂) i odbierającymi elektron przy C-3 (jak np. grupa acetylowa). Zaobserwowano również, że podstawniki alkilowe w pozycji C-4 tłumią intensywność fluorescencji do minimum, natomiast w przypadku 7-aminokumaryn zmiana położenia podstawnika z pozycji C-7 na C-6 powoduje, że emisja jest słaba i wykazuje przesunięcie batochromowe w porównaniu z kumarynami podstawionymi w pozycji C-7 [60].

7.1. Mechanizm detekcji tioli

Przy projektowaniu sond fluorescencyjnych do selektywnego oznaczania tioli należy brać pod uwagę przede wszystkim reaktywność chemiczną analitów.

Odróżnienie glutationu od cysteiny i homocysteiny pozostaje wyzwaniem ze względu na podobieństwo struktury i reaktywność chemiczną GSH do Cys/Hcy. Większość sond tiolowych nie jest w stanie odróżnić GSH od innych tioli, w tym Cys i Hcy, ponieważ ulegają podobnym reakcjom i podobnym zmianom emisji po reakcji z analitem. Jednakże, jak wspomniano wcześniej, jest mniej prawdopodobne, że Cys lub Hcy będą przeszkadzać w wykrywaniu GSH, ponieważ wewnątrzkomórkowy poziom glutationu jest znacznie wyższy.



Schemat 9. Strategie detekcji tioli biologicznych

Mając na uwadze silny nukleofilowy charakter grupy tiolowej, reakcje takie jak: addycja Michaela, substytucja nukleofilowa i eliminacja sulfonamidów, estrów sulfonianowych oraz disulfidów to główne strategie wykorzystywane do detekcji grup –SH (schemat 9). Chociaż we wszystkich tych reakcjach preferowana jest reakcja z tiolem, inne nukleofile, jak –OH, czy –NH, mogą być również zaangażowane i wpływać na obrazowanie tioli, zwłaszcza ilościowe obrazowanie analitów.

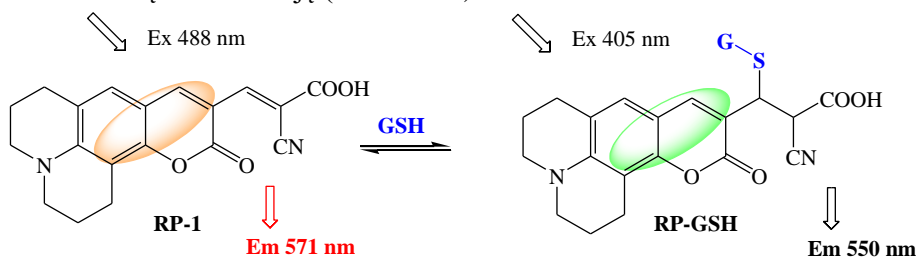
Uwzględniając chemiczny charakter grup tiolowych – sondy oparte na kumarynie posiadają różne receptory funkcjonalne. Gdy detekcja tioli wykorzystuje reakcję addycji Michaela, kumaryny zwykle zawierają wiązania α,β -nienasycone, natomiast gdy mechanizm ma związek z substytucją nukleofilową, cząsteczka sondy zawiera grupy opuszczające takie jak: halogen, grupa eterowa czy tioeterowa. Często w pozycji C-7 występują grupy aminowa lub hydroksylowa w celu wzmocnienia fluorescencji sondy.

Sondy są zaprojektowane tak, aby zapewnić zmiany w odpowiedzi fluorescencji, gdy sonda jest wystawiona na działanie tioli. Niektóre kumaryny są słabymi fluoroforami przed związaniem analitu, dopiero po interakcji obserwuje się silną fluorescencję i reakcję typu *turn-ON*.

7.1.1. Detekcja tioli na drodze reakcji addycji Michaela

Reakcja addycji Michaela charakteryzuje się wysoką selektywnością w wykrywaniu grup tiolowych. Sondy fluorescencyjne, które opierają się na wykorzystaniu tej reakcji, najłatwiej uzyskać poprzez wprowadzenie fragmentu α,β -nienasyconego, grupy aldehydowej, ketonowej, estrowej czy fragmentu *N*-etylomaleimidu. Reakcja addycji może zachodzić również z innymi nukleofilami, takimi jak –OH, NH₂, czy –COOH.

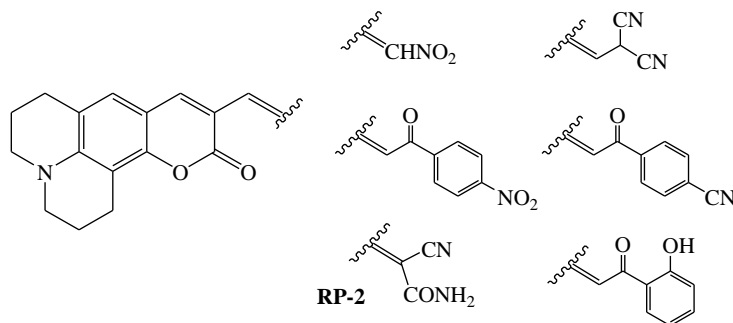
W 2019 roku Jiang i wsp. zaprezentowali odwracalną sondę fluorescencyjną **RP-1** opartą na reakcji addycji Michaela do obrazowania glutationu w komórkach HeLa [61]. Do struktury sondy wprowadzono grupę karboksylową, której obecność poprawiała rozpuszczalność w wodzie. Dwa sześcioczłonowe pierścienie piperydyny zostały dodane w celu poprawy fotostabilności i wydajności kwantowej fluorescencji. Co więcej, w tym samym czasie wprowadzono jednostkę metinową (–CH=CH–) łączącą szkielet kumarynowy z grupami cyjanowymi (–CN) i grupą karboksylową (–COOH), co spowodowało rozszerzenie π -koniugacji i tym samym przesunięcie batochromowe z maksimum emisji fluorescencji (E_m 571 nm). Po dodaniu GSH w wyniku reakcji addycji **RP-GSH** emitował zieloną fluorescencję (schemat 10).



Schemat 10. Mechanizm działania sondy do wykrywania glutationu

Sondę fluorescencyjną wykorzystano do wykrycia zmian komórkowego GSH w żywych komórkach HeLa, a obrazy fluorescencji uzyskano za pomocą laserowej skaninowej mikroskopii konfokalnej (LSCM).

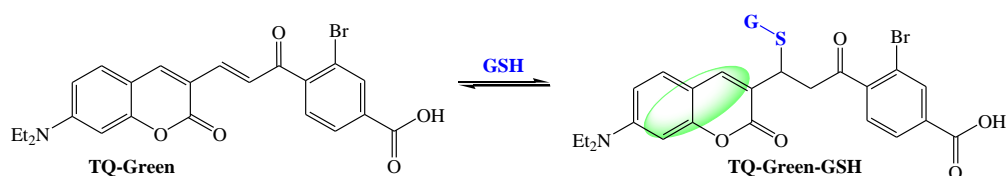
Rok później ta sama grupa naukowców do wykrywania glutationu zaprezentowała nowe sondy fluorescencyjne oparte na szkielecie kumaryny z różnymi grupami funkcyjnymi przy węglu C-3 (rys. 7) [62].



Rysunek 7. Pochodne kumaryn zaprezentowane przez grupę Jiang i wsp.

Wstępne analizy spektroskopowe wykazały, że sonda **RP-2** ma najlepsze wyniki w detekcji GSH oraz jest w stanie odróżnić glutation od innych naturalnych aminokwasów rozpuszczalnych w wodzie. Niezwykle szybkie tempo reakcji kumaryny z glutationem (około 6 s) pozwoliło na obrazowanie w czasie rzeczywistym glutationu w żywych komórkach. W przyszłości badania takie jak te mogą być skutecznym narzędziem do obrazowania fluorescencyjnego w celu zrozumienia funkcji wewnątrzkomórkowego GSH.

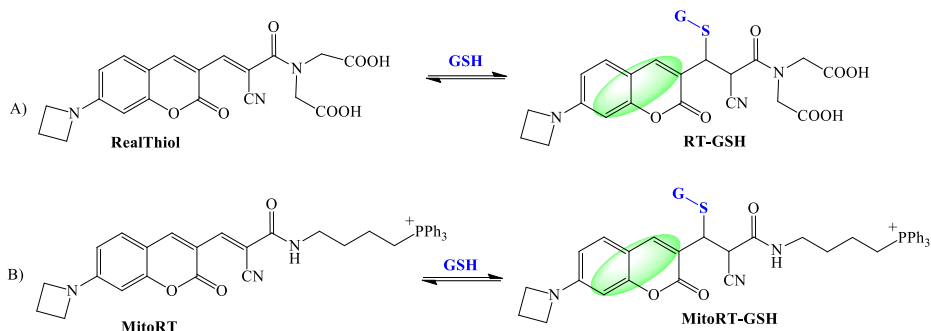
Ostatnio grupa Jin Wanga intensywnie poszukiwała odpowiednich sond fluorescencyjnych do wykrywania i monitorowania wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu w układach żywych (schemat 11) [63]. Prekursorem odpowiedniej sondy fluorescencyjnej był odpowiedni ester, który w żywych komórkach (w ciągu około 1 min) ulegał całkowitej hydrolizie do właściwej sondy **TQ-Green**. Autorzy po raz pierwszy wykorzystali sondę kumarynową do ilościowego oznaczania poziomu GSH w żywych komórkach i wykazali, że sonda **TQ-Green** może być z powodzeniem stosowana w wysokorozdzielczym obrazowaniu w mikroskopie konfokalnym.



Schemat 11. Mechanizm detekcji glutationu za pomocą **TQ-Green**

Dwa lata później Jin Wang wykorzystał odwracalną reakcję Michaela do zaprojektowania kolejnej sondy fluorescencyjnej **RealThiol** (schemat 12A) [64]. W sondzie wprowadzona grupa cyjanowa w pozycji α przyspieszała kinetykę reakcji z tiolem, natomiast 4-członowy pierścień azetydyny poprawiał wydajność kwantową i fotostabilność kumaryny. Grupy karboksylowe zapewniały wprawdzie dobrą rozpuszczalność sondy w wodzie, ale utrudniały wiązanie sondy z błoną komórkową. W celu zwiększenia przepuszczalności komórek sonda została wcześniej przekształcona w pochodną diesterową, która łatwo hydrolizowała wewnątrz komórek w obecności esterazy, uwalniając grupy karboksylowe. Sonda **RealThiol** umożliwiła naukowcom badanie dynamiki i transportu glutationu w żywych komórkach w czasie rzeczywistym. Dzięki jej zastosowaniu można

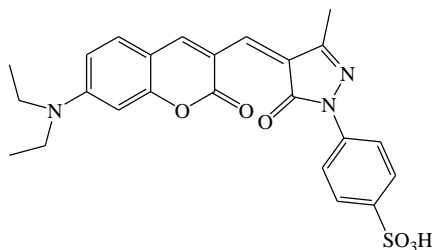
było zaobserwować zwiększoną pojemność antyoksydacyjną aktywowanych neuronów oraz zmiany stężenia glutationu podczas procesu ferroptozy.



Schemat 12. Sondy RealThiol i MitoRT zaprezentowane przez grupę Wang'a

W 2017 roku zsyntezowano specyficzną dla mitochondriów sondę glutationową o nazwie **Mito-RealThiol** (schemat 12B) [65]. Sonda umożliwiła monitorowanie w czasie rzeczywistym dynamiki mitochondrialnego glutationu. Do sondy wprowadzono grupę tryfenylofosfoniową (TPP), która preferencyjnie trafiała w błony mitochondrium. Po reakcji z glutationem **MitoRT-GSH** wykazywała maksima fluorescencji przy 567 i 488 nm przy długości fali wzbudzenia odpowiednio 488 i 405 nm.

Grupa Sabota przedstawiła rozpuszczalną w wodzie sondę fluorescencyjną opartą na pochodnej 7-aminokumaryny (rys. 8) [66]. Kumaryna sprzężona została z pierścieniem pirazolu i zawierała grupę sulfonową.



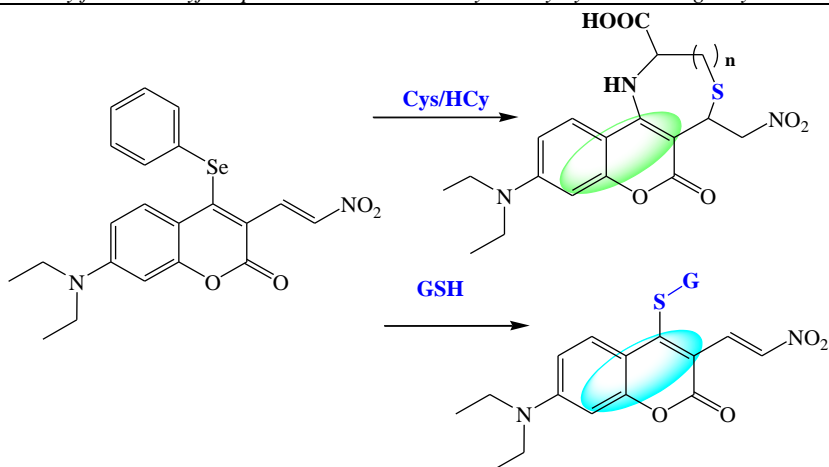
Rysunek 8. Rozpuszczalna w wodzie sonda do detekcji tioli

Po dodaniu biotiołu w roztworze o pH = 7,4 następowała szybka i odwracalna addycja Michaela objawiająca się dramatyczną zmianą koloru roztworów z purpurowego na niebieski.

7.1.2. Detekcja tioli na drodze reakcji substytucji

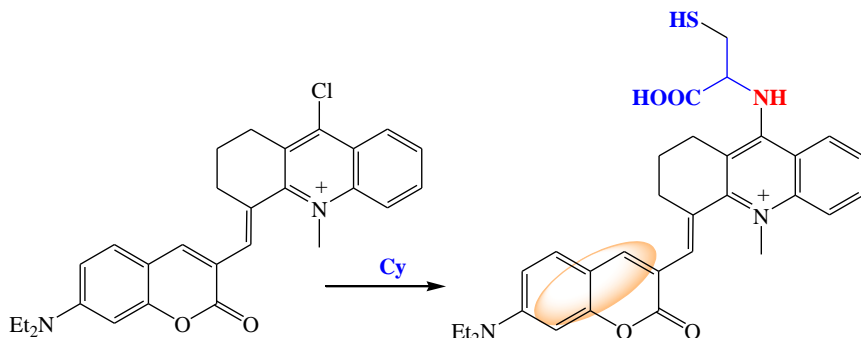
Wprowadzenie grupy opuszczającej do cząsteczki kumaryny jest kolejną strategią w projektowaniu sond fluorescencyjnych do detekcji biotiołu.

Do wykrywania Cys, Hcy i GSH opracowano prostą sondę opartą na szkielecie kumaryny sprzężonej z nitroolefiną [67]. Dzięki wprowadzeniu do cząsteczki podstawnika 4-fenyloselenowego sonda była zdolna do wykrywania tioli w podwójnych kanałach fluorescencyjnych i możliwe było rozróżnienie Cys/Hcy i GSH (schemat 13). Sonda wykazywała wysoką czułość i dawała szybką odpowiedź. Została z powodzeniem zastosowana do wykrywania egzogennych i endogennych tioli w żywych komórkach.



Schemat 13. Selektywna sonda do wykrywania grup tiolowych

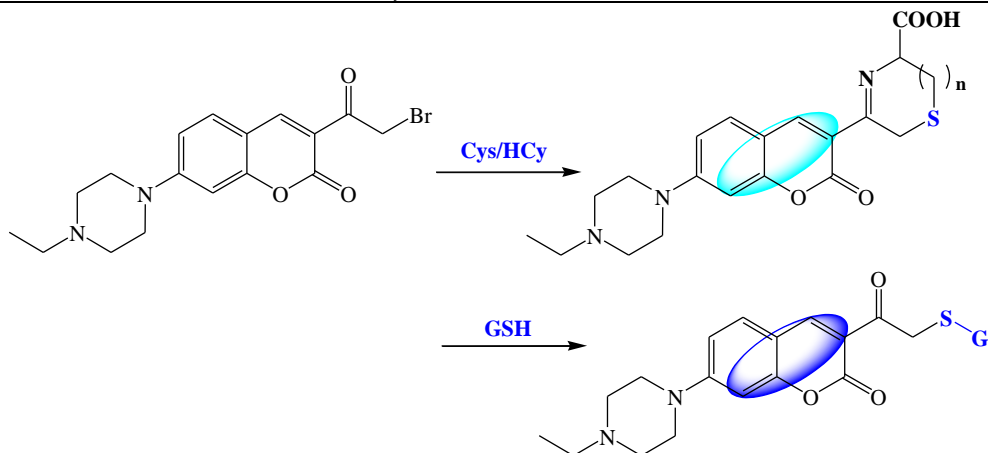
Do detekcji Cys i Hcy zaprojektowano również cząsteczkę będącą hybrydą kumaryny i soli tetrahydro-akrydyny (schemat 14) [68]. Sonda wykazała wysoką czułość, szybki czas odpowiedzi, dawała „włączoną” odpowiedź emisyjną w bliskiej podczerwieni z dużym przesunięciem Stokesa (około 200 nm). Intensywność fluorescencji sondy przy 674 nm szybko rosła wraz z upływem czasu i osiągnęła maksymalne wartości dla cysteiny i homocysteiny odpowiednio w ciągu 3 i 15 min.



Schemat 14. Sonda wykorzystywana do detekcji cysteiny i homocysteiny

Mechanizm reakcji kumarynowej sondy z tiolami wykazał, że atom chloru w sondzie był łatwo zastępowany przez grupę -SH. Następnie zachodziła wewnątrzcząsteczkowa reakcja substytucji, w wyniku której powstawał *N*-podstawiony produkt. Sonda została z powodzeniem wykorzystana do wykrywania Cys/Hcy w żywych komórkach myszy noszących guz A549. Sygnały o wysokiej intensywności fluorescencji obserwowano wokół tkanki nowotworowej, natomiast słabą fluorescencję rejestrowano w obszarze tkanki prawidłowej.

W ostatnim czasie zsyntezowano sondę, której szkielet kumarynowy podstawiono przy C-7 piperazyną. Sonda wykazywała bardzo słabą fluorescencję ze względu na obecność w cząsteczce ciężkiego atomu bromu [69].

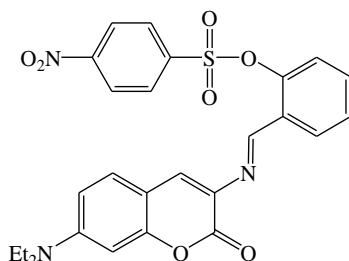


Schemat 15. Sonda wykorzystana do wykrywania nadekspresji GSH w ludzkich próbkach raka przełyku

Kiedy w obecności analitu brom został zastąpiony grupą tiolową, dochodziło do znacznego wzmocnienia fluorescencji. Istotna różnica w mechanizmie reakcji kumaryny z Cys/Hcy pozwoliła na ich odróżnienie od GSH (schemat 15). Sonda została z powodzeniem zastosowana do wykrywania nadekspresji GSH w ludzkich próbkach raka przełyku.

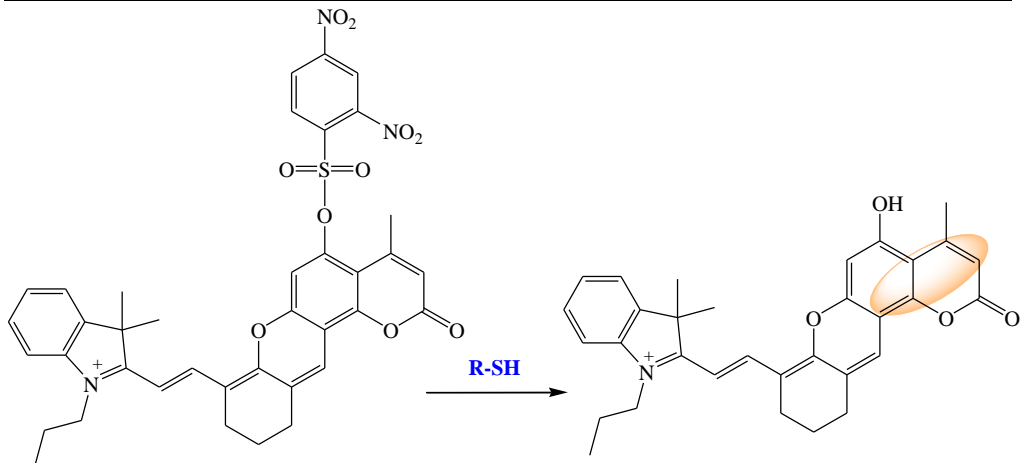
7.1.3. Inne metody detekcji biotoli

W 2022 roku zsyntezowano nową sondę do wykrywania cysteiny opartą na rozszczepieniu estru sulfonianowego jako mechanizmie detekcji tioli (rys. 9) [70]. Po dodaniu biotoli (Hcy/Cys/GSH) fragment kumarynowy wykazywał silne wzmocnienie emisji i wykazywał żółtozieloną fluorescencję po naświetleniu lampą UV przy 365 nm. Sonda stanowiła skuteczne narzędzie do wykrywania biotoli w czasie rzeczywistym, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*.



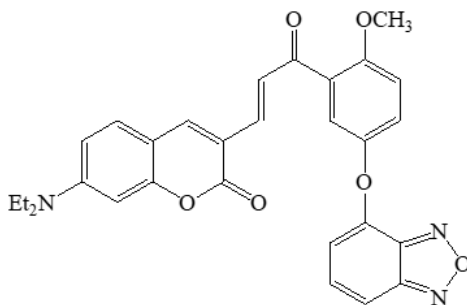
Rysunek 9. Pochodna kumaryny do wykrywania tioli

Sonda do detekcji tioli o odpowiedzi fluorescencyjnej w zakresie bliskiej podczerwieni, składająca się z cyjaniny i kumaryny, została opracowana przez Chena i wsp. [71]. Sonda szybko reagowała z biotiolami (<5 s), czerwone pasmo absorpcji przesunęło się z 556 nm do 723 nm, a intensywność fluorescencji natychmiast wzrosła przy 751 nm po dodaniu analitu (schemat 16). Obrazowanie konfokalne ujawniło, że sonda mogła celować w mitochondria i selektywnie obrazować biotiole (GSH, Cys i Hcy) w warunkach *in vitro*.



Schemat 16. Kumaryna reagująca na tiole w bliskiej podczerwieni

W 2022 roku Shuang Shaomin i wsp. opisali sondę fluorescencyjną do obrazowania Cys, Hcy i dwutlenku siarki (SO_2) – rysunek 10 [72]. Sonda oparta była na pochodnej kumaryny z cząsteczką NBD (nitrobenzoksadiazol). Sonda nie wykazywała fluorescencji. W obecności Cys/Hcy następowało rozerwanie wiązania eterowego i ujawnienie pomarańczowej fluorescencji przy 590 nm. Sonda mogła rozróżniać Cys/Hcy i SO_2 , wykazywała dobrą selektywność i szybkość reakcji. Zastosowano ją do obrazowania Cys/Hcy i SO_2 w komórkach HepG-2 i ryb (danio przegowany).



Rysunek 10. Sonda fluorescencyjna do obrazowania Cys, Hcy i dwutlenku siarki

8. Podsumowanie

Kumaryny, jako rodzina związków, stanowią jedną z najbardziej uniwersalnych i łatwych do zastosowania rodzin sond fluorescencyjnych, o szerokim zakresie zastosowań. W pracy przedstawiono przykłady fluorescencyjnych sond kumarynowych, mechanizm ich działania oraz zastosowanie w biochemii. Odpowiednio zmodyfikowane chemicznie kumaryny posiadają specyficzne właściwości fotofizyczne i spektroskopowe, co pozwala je selektywnie stosować w wykrywaniu różnych grup tiolowych, ale jednocześnie wykazują szeroki zakres tolerancji na różne parametry środowiska. Chociaż synteza sond fluorescencyjnych poczyniła ogromne postępy w ostatnich latach, wydaje się, że możliwość kolejnych modyfikacji i właściwości fotochemiczne kumaryn otwierają drogę do kolejnych aplikacji tych atrakcyjnych związków w biomedycynie.

Literatura

1. Alvarez B., Comini M., Salinas G., Trujillo M., *The redox chemistry and biology of thiols*, 1st ed., Academic Press, 2022.
2. Poole L.B., *The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry*, Free Radic. Biol. Med., 80, 2015, s. 148-157.
3. Forman H.J., Zhang H., Rinna A., *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*, Mol. Aspects Med., 30(1-2), 2009, s. 1-12.
4. Pfaff A.R., Beltz J., King E., Ercal N., *Medicinal thiols: current status and new perspectives*, Mini Rev. Med. Chem., 20(6), 2020, s. 513-529.
5. Künstler A., Gullner G., Ádám A.L., Nagy J.K., Király L., *The versatile roles of sulfur-containing biomolecules in plant defense. A road to disease resistance*, Plants, 9(12), 2020, s. 1705-1708.
6. Balendiran G.K., Dabur R., Fraser D., *The role of glutathione in cancer*, Cell Biochem. Funct., 22(6), 2004, s. 343-52.
7. Rashdan N.A., Shrestha B., Pattillo C.B., *S-glutathionylation, friend or foe in cardiovascular health and disease*, Redox Biol., 37, 2020, s. 101693.
8. Stipanuk M.H., Coloso R.M., García R.A., Banks M.F., *Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulphate and taurine in rat hepatocytes*, J. Nutr., 122, 1992, s. 420-427.
9. Plaza C.N., García-Galbis M.R., Martínez-Espinosa R.M., *Effects of the usage of l-cysteine (l-Cys) on human health*, Molecules, 23(3), 2018, s. 575.
10. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W.F., Wolf P.A., *Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease*, Engl. J. Med., 346, 2002, s. 476-483.
11. Smith A.D., Refsum H., Bottiglieri T., Fenech M., Hooshmand B., McCaddon A., Miller J.W., Rosenberg I.H., Obeid R., *Homocysteine and dementia: an international consensus statement*, J. Alzheimers Dis., 62(2), 2018, s. 561-570.
12. Wang Q., Zhao J., Chang H., Liu X., Zhu R., *Homocysteine and folic acid: risk factors for Alzheimer's disease-an updated meta-analysis*, Front. Aging Neurosci, 13, 2021, s. 665114.
13. Ganguly P., Alam S.F., *Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease*, Nutr J., 14, 2015, s. 6.
14. Lakowicz J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., Springer, 2006.
15. Valeur B., Berberan-Santos M.N., *Molecular fluorescence: principles and applications*, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012.
16. Sen B., Sheet S.K., Thounaojam R., Jamatia R., Pal A.K., Aguan K., Khatua S., *A coumarin based Schiff base probe for selective fluorescence detection of Al³⁺ and its application in live cell imaging*, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2017, s. 537-543.
17. Toyooka T., *Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples*, J. Chromatogr. B, 28, 2009, s. 3318-3330.
18. Monostori P., Wittmann G., Karg E., Turi S., *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review*, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 877, 2009, s. 3331-3346.
19. Torano S.W., Ramautar R., de Jong G., *Advances in capillary electrophoresis for the life sciences*, J. Chromatogr. B, 1118-1119, 2019, s. 116-136.
20. Lačná J., Foret F., Kubán P., *Capillary electrophoresis in the analysis of biologically important thiols*, Electrophoresis, 38(1), 2016, s. 203-222.
21. Suna Y., Yao T., Guo X., Peng Y., Zheng J., *Simultaneous assessment of endogenous thiol compounds by LC-MS/MS*, J. Chromatogr. B, 1029-1030, 2016, s. 213-221.
22. Rao J., Dragulescu-Andrasi A., Yao H., *Fluorescence imaging in vivo: recent advances*, Curr. Opin. Biotechnol., 18, 2007, s. 17-25.

23. Liu Y., Xiang K., Tian B., Zhang J., *A fluorescein-based fluorescence probe for the fast detection of thiol*, *Tetrahedron Lett.*, 57, 2016, s. 2478-2483.
24. Huo F., Kang J., Yin C., Zhang Y., Chao J., *A turn-on green fluorescent thiol probe based on the 1,2-addition reaction and its application for bioimaging*, *Sens. Actuators B Chem.*, 207, 2015, s. 139-143.
25. Li Z., Xiong W., He X., Qi X., Ding F., Shen J., *A novel strategy for rhodamine B-based fluorescent probes with a selective glutathione response for bioimaging in living cells*, *Analyst*, 145, 2020, s. 4239-4244.
26. Shibata A., Furukawa K., Abe H., Tsuneda S., Ito Y., *Rhodamine-based fluorogenic probe for imaging biological thiol*, *Bioorg Med Chem Lett.*, 18(7), 2008, s. 2246-2249.
27. Tang B., Xing Y., Li P., Zhang N., Yu F., Yang G., *A Rhodamine-based fluorescent probe containing a Se-N bond for detecting thiols and its application in living*, *Cells. J. Am. Chem. Soc.*, 129(38), 2007, s. 11666-11667.
28. Chio T.I., Grimaldi A.J., Radford T.I., Bane S.L., *A BODIPY-based probe enables fluorogenicity via thiol-dependent modulation of fluorophore aggregation*, *Molecules*, 27, 2022, s. 2455.
29. Zhang J., Wang N., Ji X., Tao Y., Wang J., Zhao W., *BODIPY-based fluorescent probes for biothiols*, *Chem. A Eur. J.*, 26(19), 2020, s. 4172-4192.
30. Cheng G.-J.-S., Qin J.-M., Li X., Cao Q.-Y., *A naphthalimide-based fluorescent probe with mitochondria targeting for GSH sensing and cancer cell recognition*, *Dyes Pigm.*, 211, 2023, s. 111089.
31. Zhou P., Yao J., Hu G., Fang J., *Naphthalimide scaffold provides versatile platform for selective thiol sensing and protein labeling*, *ACS Chem. Biol.*, 11(4), 2016, s. 1098-1105.
32. Lazarus L.S., Esquer H.J., Benninghoff A.D., Berreau L.M., *Sense and release: a thiol-responsive flavonol-based photonically driven carbon monoxide-releasing molecule that operates via a multiple-input AND logic gate*, *J. Am. Chem. Soc.*, 139(28), 2017, s. 9435-9438.
33. Zhang X., Shi C., Ji P., Jin X., Liu J., Zhu H., *A red-emitting fluorescent probe based on flavone for hydrazine detection and its application in aqueous solution*, *Anal. Methods*, 8, 2016, s. 2267-2273.
34. Wu L., Tian X., Groleau R.R., Wang J., Han H.-H., Reeksting S.B., Sedgwick A.C., He X.-P., Bull S.D., James T.D., *Coumarin-based fluorescent probe for the rapid detection of peroxynitrite 'AND' biological thiols*, *RSC Adv.*, 10, 2020, s. 13496-13499.
35. Katritzky A.R., Ibrahim T.S., Tala S.R., Abo-Dya N.E., Abdel-Samii Z.K., El-Feky S.A., *Synthesis of coumarin conjugates of biological thiols for fluorescent detection and estimation*, *Synthesis*, 9, 2011, s. 1494-1500.
36. Kaushik R., Nehra N., Novakova V., Zimcik P., *Near-infrared probes for biothiols (cysteine, homocysteine, and glutathione): a comprehensive review*, *ACS Omega*, 8, 2023, s. 98-126.
37. Xie J., Wang L., Su X., Rodrigues J., *Coumarin-based fluorescent probes for bioimaging: recent applications and developments*, *Curr. Org. Chem.*, 25, 2021, s. 1-13.
38. Wang S., Huang Y., Guan X., *Fluorescent probes for live cell thiol detection*, *Molecules*, 26, 2021, s. 3575.
39. Zeng X., Chen W., Liu C., Yin Y., Yang G.-F., *Fluorescence probes for reactive sulfur species in agricultural chemistry*, *J. Agric. Food Chem.*, 69, 2021, s. 13700-13712.
40. Sun X.-Y., Liu T., Sun J., Wang X.-J., *Synthesis and application of coumarin fluorescence probes*, *RSC Adv.*, 10, 2020, s. 10826-10847.
41. Cao D., Liu Z., Verwilt P., Koo S., Jangjili P., Kim J.S., Lin W., *Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors*, *Chem. Rev.*, 119(18), 2019, s. 10403-10519.
42. Bugaenko D.I., Karchava A.V., Yunusova Z.A., Yurovskaya M.A., *Fluorescent probes on the basis of coumarin derivatives for determining biogenic thiols and thiophenols*, *Chem. Heterocycl. Compounds*, 55(6), 2019, s. 483-489.

43. Favre H.A., Powell W.H., *Nomenclature of organic chemistry: IUPAC recommendations and preferred names 2013*, Royal Society of Chemistry, London, UK, 2014.
44. Srikrishna D., Godugu C., Dubey P.K., *A review on pharmacological properties of coumarins*, Mini Rev. Med. Chem., 18, 2018, s. 113-141.
45. Balewski Ł., Szulca S., Jalińska A., Kornicka A., *A mini-review: recent advances in coumarin-metal complexes with biological properties*, Front. Chem., 9, 2021, s. 781779.
46. Peng X.-M., Damu G.L.V., Zhou C.-H., *Current developments of coumarin compounds in medicinal chemistry*, Curr. Pharm. Des., 19, 2013, s. 3884-3930.
47. El-Naggar A.M., Ahmed F.S., Abd El-Salam A.M., Rady M.A., Latif M.S.A., *Synthesis and biological activity of some new 3-and 6-substituted coumarin amino acid derivatives. Part I*, J. Heterocycl. Chem., 18, 1981, s. 1203-1207.
48. Grover J., Jachak S.M., *Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development*, RSC Adv., 5, 2015, s. 38892-38905.
49. Emami S., Dadashpour S., *Current developments of coumarin based anti-cancer agents in medicinal chemistry*, Eur. J. Med. Chem., 102, 2015, s. 611-630.
50. Thakur A., Singla R., Jaitak V., *Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies*, Eur. J. Med. Chem., 101, 2015, s. 476-495.
51. Akkol E.K., Genç Y., Karpuz B., Sobarzo-Sánchez E., Capasso R., *Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer*, Cancers, 12, 2020, s. 1959.
52. Johnson J.R., *Perkin reaction and related reactions*, Org. React., 1, 1942, s. 210-265.
53. Harayama T., Nakatsuka K., Nishioka H., Murakami K., Hayashida N., Ishii H., *Convenient synthesis of a simple coumarin from salicylaldehyde and Wittig reagent. II: Synthesis of bromo- and methoxycarbonylcoumarins*, Chem. Pharm. Bull., 42, 1994, s. 2170.
54. Heravil M.M., Khaghaninejad S., Mostofi M., *Pechmann reaction in the synthesis of coumarin derivatives*, Advances in Heterocyclic Chemistry, 112, 2014, s. 1-50.
55. Vekariya R.H., Patel H.D., *Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives via Knoevenagel condensation: a review*, Synth. Commun., 44, 2014, s. 2756-2788.
56. Rao H.S., Sivakumar S., *Condensation of α -aroylketene dithioacetals and 2-hydroxyarylaldehydes results in facile synthesis of a combinatorial library of 3-aroylcoumarins*, Journal of Organic Chemistry, 71, 2006, s. 8715-8723.
57. Hwang I.T., Lee S.A., Hwang J.S., Lee K.I., *A facile synthesis of highly functionalized 4-arylcoumarins via Kostanecki reactions mediated by DBU*, Molecules, 16, 2011, s. 6313-6321.
58. Fall Y., Terán C., Teijeira M., Santana L., Uriarte E., *Synthesis of new 4-cyclohexylcoumarin derivatives*, Synthesis, 5, 2000, s. 643-645.
59. Drewes S.E., Emslie N.D., Karodia N., Loizou G., *Synthesis of useful intermediates from the Claisen-rearrangement of α -hydroxy alkyl acrylate precursors*, Synth. Commun., 20, 1990, s. 1437-1443.
60. Górski K., Deperasińska I., Baryshnikov G.V., Ozaki S., Kamada K., Ågren H., Gryko D.T., *Quadrupolar Dyes Based on Highly Polarized Coumarins*, Org. Lett., 23(17), 2021, s. 6770-6774.
61. Tian M., Yang M., Liu Y., Jiang F.-L., *Rapid and reversible reaction-based ratiometric fluorescent probe for imaging of different glutathione levels in living cells*, ACS Appl. Bio Mater., 2(10), 2019, s. 4503-4514.
62. Tian M., Liu X.-Y., He H., Ma X.-Z., Liang C., Liu Y., Jiang F.-L., *Real-time imaging of intracellular glutathione levels based on a ratiometric fluorescent probe with extremely fast response*, Anal. Chem., 92, 2020, s. 10068-10075.
63. Jiang X., Yu Y., Chen J., Zhao M., Chen H., Song X., Matzuk A.J., Carroll S.C., Tan X., Sizovs A., Cheng N., Wang M.C., Wang J., *Quantitative Imaging of Glutathione in Live Cells Using a Reversible Reaction-Based Ratiometric Fluorescent Probe*, ACS Chem. Biol., 10, 2015, s. 864-874.

64. Jiang X., Chen J., Bajić A., Zhang C., Song X., Carroll S.L., Cai Z.-L., Tang M., Xue M., Cheng N., Schaaf C.P., Li F., MacKenzie K.R., Ferreon A.C.M., Xia F., Wang M.C., Maletić-Savatić M., Wang J., *Quantitative real-time imaging of glutathione*, Nature Commun., 2017, s. 16087.
65. Chen J., Jiang X., Zhang C., MacKenzie K., Stossi F., Palzkill T., Wang M.C., Wang J., *A reversible reaction-based fluorescent probe for real-time imaging of glutathione dynamics in mitochondria*, ACS Sens., 2(9), 2017, s. 1257-1261.
66. Renault K., Renard P.-Y., Sabot C., *Detection of biothiols with a fast-responsive and water-soluble pyrazolone-based fluorogenic probe*, Eur. J. Org. Chem., 2018, s. 6494-6498.
67. Chen X.-G., Mei Y., Song Q.-H., *A 3-(2'-nitro vinyl)-4-phenylselenyl coumarin as a fluorescent probe for distinguishing detection of Cys/Hcy and GSH*, Dyes Pigm., 203, 2022, s. 110312.
68. An S., Lin Y., Wang J., Ye T., Mao Y., Zhang J., Guo L., Li L., Qian Z., Liu H., *Near-infrared mitochondria-targeted fluorescent probe with a large Stokes shift for rapid and sensitive detection of cysteine/homocysteine and its bioimaging application*, Sens. Actuators B Chem., 374, 2023, s. 132799.
69. Ma J., Xu Y., Wang Y., Li J., Liu L., Si W., Hou J., Zhang Z., *Piperazine-coumarin based fluorescence probe with enhanced brightness and solubility for bio-thiol detection and esophageal carcinoma diagnosis*, Bioorg. Chem., 116, 2021, s. 105391.
70. Ding G., Wang X., Luo D., Meng S., Zhou L., Fan Y., Ling-hu C., Meng J., Si W., Chen Q., Bi R., *A simple ESIPT combines AIE character „turn on” fluorescent probe for Hcy/Cys/GSH detection and cell imaging based on coumarin unit*, Dyes Pigm., 208, 2022, s. 110762.
71. Lin X., Hu Y., Yang D., Chen B., *Cyanine-coumarin composite NIR dye based instantaneous-response probe for biothiols detection and oxidative stress assessment of mitochondria*, Dyes Pigm., 174, 2020, s. 107956.
72. Zhang M., Zhang Y., Huo F., Chao J., Shuang S., *A two-site fluorescent probe for Cys/Hcy and SO₂ detection and its application in cells and zebrafish*, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 430, 2022, s. 113959.

Sondy fluorescencyjne oparte na szkielecie kumaryn do wykrywania biologicznych tioli

Streszczenie

Kumaryna i jej pochodne to ważne związki naturalne o różnorodnej aktywności biologicznej, w tym przeciwbakteryjnej, przeciwnowotworowej, przeciwzapalnej, przeciwutleniającej i przeciwdepresyjnej, co czyni je atrakcyjnymi kandydatami do zastosowań medycznych. Kumaryny, heterocykliczne benzo- α -pirony o naturalnych właściwościach fotochemicznych, odpowiednio zmodyfikowane są często wykorzystywane jako sondy do detekcji biotioli. W artykule przedstawiono przykłady sond fluorescencyjnych opartych na szkielecie kumaryny, mechanizm detekcji tioli oraz zastosowania w obrazowaniu żywych komórek.

Słowa kluczowe: kumaryny, tiole, sondy fluorescencyjne

Fluorescent probes based on the coumarin backbone for the detection of biological thiols

Abstract

Coumarin and its derivatives are important natural substances with a variety of biological activities, including antibacterial, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, and antidepressant, making them attractive therapeutic candidates. Coumarins, a heterocyclic benzo- α -pyrone with a photochemical nature have fluorescent properties, when modified appropriately are often used as probes for biothiol detection. Examples of the fluorescent probe based on coumarin skeleton, thiol detection mechanism, and applications in live cell imaging are also all presented.

Keywords: coumarin, thiol, fluorescent probe

Charakterystyka ziół i występujących w nich pozostałości pestycydów

1. Wprowadzenie

Zioła są roślinami cenionymi wśród ludzi od bardzo wielu lat, ponieważ zawierają substancje czynne, które korzystnie wpływają na metabolizm człowieka [1, 2]. Grupa ta obejmuje przede wszystkim jednoroczne i dwuletnie rośliny zielne, ale także drzewa, krzewy, warzywa i byliny.

Rośliny zielarskie stanowią źródło związków bioaktywnych i są szeroko stosowane na dużą skalę w różnych sektorach, m.in. w ziołolecznictwie (rośliny lecznicze) jako fitochemikalia, farmaceutyki, nutraceutyki, preparaty ziołowe, suplementy diety, w aromaterapii (rośliny olejkodajne) jako perfumy i kosmetyki, a ponadto jako przyprawy (rośliny przyprawowe), gdyż posiadają szereg związków fitochemicznych [3]. Ich dobroczynne właściwości wynikają z wysokiej zawartości naturalnych składników biologicznie czynnych. Należą do nich związki fenolowe, alkaloidy, flawonoidy, glikozydy, antocyjanidyny, kardenolidy, saponiny, olejki eteryczne czy garbniki [4, 5].

Oprócz tych niezbędnych i cennych substancji zioła mogą zawierać zanieczyszczenia, zwłaszcza pozostałości pestycydów [6, 7]. Występowanie pestycydów jest ściśle związane z szerokim ich stosowaniem we współczesnym rolnictwie w celu minimalizacji strat plonu powodowanych szeregiem agrofagów oraz zapewnienia zwiększonej produkcji roślinnej, co może mieć niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka [8]. Obecność pestycydów jest krytycznym wyznacznikiem jakości i bezpieczeństwa żywności [9, 10], ponieważ niektóre wykazują działanie toksyczne dla człowieka, m.in. mutagenne, teratogenne, rakotwórcze czy uczulające, a ponadto mogą być trwałe w środowisku (trudno ulegają rozkładowi, mają możliwość bioakumulacji i migracji) [11]. Wraz z rosnącą popularnością i stosowaniem ziół, które z racji swoich właściwości nie powinny zawierać jakichkolwiek zanieczyszczeń, istotną rolę pełni monitorowanie szkodliwych substancji w nich występujących [6, 11-14].

Ze względu na powszechne stosowanie surowców ziołowych w medycynie tradycyjnej i w diecie, w stanie świeżym i suszonym, jako całe rośliny lub ich fragmenty (liście, kora, nasiona, owoce, kwiaty czy korzenie), wrasta ich komercjalizacja [15, 16]. Chociaż wiele roślin zielarskich jest nadal zbieranych w stanie dzikim, komercyjna uprawa nabiera coraz większego rozpędu ze względu na rosnącą świadomość konsumentów i zapotrzebowanie na surowce roślinne o wysokiej jakości [17].

W celu zapewnienia bezpieczeństwa surowców zielarskich, w zależności od ich przeznaczenia (wyroby farmaceutyczne, żywność), zostały ujednolicone najwyższe dopuszczalne poziomy pozostałości – NDP (MRLs, ang. *maximum residue levels*) przez różne organizacje międzynarodowe tworzące spisy substancji czynnych, leków, takie jak m.in.

¹ m.jankowska@iorpib.poznan.pl, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Terenowa Stacja Doświadczalna w Białymstoku, ul. Chełmońskiego 22, 15-195 Białystok, www.ior.bialystok.pl.

² b.lozowicka@iorpib.poznan.pl, jw.

Farmakopea Europejska (EP, ang. *European Pharmacopoeia*), Kodeks Żywnościowy (CA, ang. *Codex Alimentarius*) i Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, ang. *European Food Safety Authority*) [18-20].

Celem niniejszej pracy była ogólna charakterystyka ziół i ich korzystnych dla zdrowia właściwości oraz prezentacja występujących pozostałości pestycydów w roślinach zielarskich w odniesieniu do obecnego stanu wiedzy. W pracy dokonano przeglądu tekstów naukowych dotyczących pozostałości pestycydów powstałych w ciągu ostatniej dekady (w latach od 2011 do 2023).

2. Charakterystyka ziół

2.1. Podział ziół

Zioła z uwagi na szeroki zakres działania mają bardzo wiele zastosowań, dlatego można je w różny sposób kwalifikować. Jednym z najbardziej znanych podziałów ziół jest podział na rośliny lecznicze, przyprawowe i olejkodajne.

Rośliny lecznicze to rośliny, z których pozyskuje się surowce zielarskie zawierające substancje czynne stosowane w medycynie i ziołolecznictwie, tzw. fitofarmaceutyki. Preparaty wyrabia się z roślin świeżych i suszonych (z korzeni, np. kozłka lekarskiego; łodyg i liści, np. mięty pieprzowej; kwiatów, np. rumianku pospolitego) w postaci maceratów, naparów, odwarów, nalewek, wyciągów, soków, tabletek, granulatów, olejków itp.

Do roślin przyprawowych należą rośliny i ich części (korzenie, kłącza, cebule, kora, kwiaty, owoce, nasiona) w stanie świeżym, wysuszonym lub po obróbce mechanicznej, stosowane jako przyprawy. Ze względu na specyficzny smak i aromat używane są jako dodatki do pożywienia w celu poprawienia smaku, nierzadko przypisuje się im równocześnie działanie lecznicze (np. bazylika, oregano, rozmaryn, rukola, tymianek itp.).

Rośliny olejkodajne są roślinami zawierającymi powyżej 0,01% olejku eterycznego o przyjemnym zapachu oraz specyficznym smaku, zwykle gorzkim i palącym. Olejki są mieszaninami różnych związków chemicznych: aldehydów, estrów, ketonów, alkoholi czy węglowodorów. Rośliny olejkodajne stosowane są jako przyprawy kuchenne wzmagające apetyt i poprawiające trawienie, jako rośliny lecznicze, a także w przemyśle perfumeryjnym, kosmetycznym i do wyrobu mydeł. Przykłady roślin olejkodajnych: arnika górską, rumianek pospolity, melisa lekarska, mięta pieprzowa, szaflwia lekarska, kminek zwyczajny, kolendra, lubczyk ogrodowy.

Wiele cennych informacji dotyczących przynależności do poszczególnych rodzin botanicznych konkretnych gatunków ziół oraz substancji wchodzących w ich skład można odnaleźć w botanicznym raporcie EFSA [21].

2.2. Właściwości wybranych gatunków roślin zielarskich

Rośliny zielarskie w zależności od gatunku zapewniają szeroki wachlarz dobroczynnych właściwości na organizm ludzki, m.in. antybakteryjnych, antywirusowych, wzmacniających odporność, dzięki czemu chętnie stosuje się je w przeziębieniach i grypie. Przygotowane z nich napary, nalewki, soki lub oleje usuwają szkodliwe produkty przemiany materii, regulują pracę narządów wewnętrznych, oczyszczają, odkażają i łagodzą.

W tabeli 1 zestawiono wybrane gatunki roślin leczniczych, przyprawowych i olejkodajnych, ze wskazaniem zawartych w nich związków bioaktywnych, oraz podano przykłady działania na człowieka.

Z uwagi na fakt, iż Polska jest jednym z głównych i cenionych producentów oraz eksporterów surowców zielarskich (udział w światowej produkcji szacowany jest na ok. 25 tys. ton ziół rocznie), z czego 80% to zioła pochodzące z upraw (ok. 70 gatunków), a pozostałe 20% ziół pochodzi ze stanowisk naturalnych (około 100 gatunków roślin) [22]. W zestawieniu przedstawionym w tabeli 1 wybrano gatunki ziół najczęściej uprawiane w Polsce oraz dominujące gatunki roślin zielarskich pozyskane ze stanu naturalnego [22, 23].

Tabela 1. Wykaz wybranych gatunków roślin zielarskich, ich skład i działanie na człowieka

Nazwa gatunku (nazwa łacińska)	Obecność związków bioaktywnych	Działanie na człowieka
Babka lancetowata (<i>Plantago lanceolata</i>)	flawonoidy, pektyny, śluz, garbniki, kwasy organiczne oraz witaminy A, C, K	bakteriobójcze, na układ trawienny, moczowy i oddechowy
Bazylika pospolita (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	olejek eteryczny, garbniki, flawonoidy, saponiny, sole mineralne, witaminy	ułatwia trawienie, przeciwdepresyjne, zewnętrznie pomaga pozbyć się obrzęków i opuchlizn
Bez czarny (<i>Sambucus nigra</i> L.)	olejki eteryczne, flawonoidy, kwasy organiczne, garbniki, sole mineralne, antocyjany, pektyny, kwasy organiczne, witaminy, karotenoidy, garbniki i sole mineralne	gorączka przeziębienie, grypa, układ odpornościowy, infekcja układu moczowego
Cząber (<i>Satureja hortensis</i> L.)	olejek eteryczny, garbniki, żywice, śluz, sole mineralne	olejek zwalcza wiele chorobotwórczych bakterii i grzybów
Dziurawiec zwyczajny (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	związki antonoidowe, glikozydy flawonoidowe, garbniki katechinowe	moczopędne, wzmacniające naczynia włosowate, przeciwzapalne, żółciopędne
Glistnik jaskółcze ziele (<i>Chelidonium majus</i> L.)	alkaloidy benzyloizochinolinowe, kwasy fenolowe	olejek do walki z kurczawkami, leczenie brodawek, łuszczycy, łupieżu oraz trądziku i łojotoku
Jeżówka purpurowa (<i>Echinacea purpurea</i> L.)	polisacharydy, flawonoidy, polifenolokwasy, alkilamidy, poliacytleny	pobudza działanie układu odpornościowego, zwalcza infekcje wirusowe i bakteryjne
Kminek lekarski (<i>Carum</i> L.)	żelazo, witamina A i C	zwiększa odporność, pomaga w astmie, cukrzycy, zapaleniu oskrzeli
Kolendra (<i>Coriandrum</i> L.)	olejek eteryczny, żywice, olej tłusty, związki białkowe i cukrowe, fitosterole, pektyny, skrobię i mikroelementy	przeciwskurczowe, działanie uspokajające i wzmacniające, właściwości grzybobójcze i bakteriobójcze
Koper ogrodowy (<i>Anethum graveolens</i> L.)	limonen, sole mineralne, fosfor, żelazo, witamina C, D, E, K, H oraz różne odmiany witaminy B	dobrze wpływa na pracę żołądka, niestrawność, wzdęcia i kolki
Kozieradka pospolita (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)	olejek eteryczny, substancje śluzowe (m.in. krzem i fosfor), cholina i alkaloid trygonelina, żywice, gorycze, sole mineralne (kobalt, potas, sód, miedź, magnez, wapń, mangan, żelazo, siarkę, cynk), cukry, witamina A, B, D, PP i flawonoidy	pobudza wydzielanie śliny i soków – żołądkowego i trzustkowego, ułatwia trawienie pokarmów
Kozłek lekarski (<i>Valeriana officinalis</i>)	walepotriaty, olejek eteryczny, związki terpenowe	na bezsenność, działanie uspokajające

Charakterystyka ziół i występujących w nich pozostałości pestycydów

Krwawnik pospolity (<i>Achillea millefolium</i> L.)	flawonoidy, olejek eteryczny, cholina, garbniki, sole mineralne (magnez, cynk, azot, potas, fosfor), witamina C	przeciwwkrwotoczne, usuwające szkodliwe produkty przemiany materii, przeciwzapalne i pobudzające apetyt
Lawenda wąskolistna (<i>Lavandula angustifolia</i> L.)	olejek, garbniki, kumaryny, fitosterole, antocyjany, kwasy organiczne	znieczulające i uspokajające, ma działanie bakteriobójcze i grzybobójcze
Lubczyk ogrodowy (<i>Levisticum officinale</i>)	olejek eteryczny, cukry, kwasy organiczne, kumaryny, skrobia, fitosterole, sole mineralne i witaminy	właściwości moczopędne
Majeranek ogrodowy (<i>Origanum majorana</i> L.)	olejek, flawonoidy, garbniki, saponiny, białka, witaminy i sole mineralne	przeciwwgrzybicze, antybakteryjne, przeciwbólowe, moczopędne
Melisa lekarska (<i>Melissa officinalis</i> L.)	olejek eteryczny, flawonoidy, fenolokwasy, triterpeny, śluzu, gorycze, sole mineralne, witamina C	uspokajające, pobudza trawienie, antyseptyczne, rozkurczowe
Mięta pieprzowa (<i>Mentha × piperita</i> L.)	olejek eteryczny, garbniki, gorycze, flawonoidy, kwasy organiczne, sole mineralne	bakteriobójcze, przeciwskurczowe, przeciwzapalne, żółciotwórcze i żółciopędne, poprawia apetyt i obniża ciśnienie krwi
Miłorząb japoński (<i>Ginkgo biloba</i> L.)	flawonoidy, terpeny, kwasy organiczne	przy miażdżycy i chorobie wieńcowej, pomaga likwidować szumy uszne, zawroty głowy, ośpienie umysłowe oraz poprawia słuch
Mniszek lekarski (<i>Taraxacum officinale</i>)	witamina C, D, A oraz witaminy z grupy B, garbniki, flawonoidy, potas, magnez, krzem, żelazo, związki triterpenowe inulina, kwasy polifenolowe, karotenoidy, cholina i asparagina	przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwwgrzybicze
Nagietek lekarski (<i>Calendula officinalis</i>)	olejek eteryczny, gorycze, śluz, kwasy organiczne, karoteny, żywice, garbniki	w chorobach skórnych, owrzodzeniach, żylakach odbytu, odmrożeniach, oparzeniach
Ostropest plamisty (<i>Silybum marianum</i>)	witamina B2, D, E, K, karotenoidy, flawonoidy, sylimaryna, olejki eteryczne, sacharoza, galaktoza, arabinoza, gorycze, sole mineralne	regeneracyjne na wątrobę, ochraniające i wzmacniające
Pokrzywa zwyczajna (<i>Urtica dioica</i> L.)	karotenoidy, flawonoidy, chlorofil, garbniki, węglowodany, tłuszcze, białka, witamina C, A, K, B2, sole mineralne, takie jak wapń, żelazo, potas	wzmacniające, uzupełnia niedobory żelaza, moczopędne, przeciwbiegunkowe
Prawoślaz lekarski (<i>Althaea officinalis</i> L.)	polisacharydy, flawonoidy	powlekające, przeciwsładowe i osłonowe (m.in. błony śluzowe jamy ustnej i gardła)
Rokitnik zwyczajny (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.)	witamina A, B1, B2, B6, bogactwo witaminy C	przy przeziębieniu, stanach zapalnych górnych dróg oddechowych, chorobach reumatycznych oraz skórnych
Rozmaryn lekarski (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	olejek eteryczny, kwasy organiczne, garbniki, terpeny, flawonoidy i fitosterole	przeciwzapalne, przeciwwutleniające, żółciopędne i rozluźniające

Rumianek pospolity (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	olejek eteryczny, flawonoidy, kumaryny, terpeny, kwasy organiczne, gorycze, cholina, witamina C i sole mineralne	przeciwalergiczne, napotne, przeciwzapalne w stanach zapalnych dróg moczowych, w leczeniu biegunki i zaburzeń trawiennych
Skrzyp polny (<i>Equisetum arvense</i> L.)	flawonoidy, substancje mineralne, związki krzemu	moczopędne, wzmacniające, przeciwkrwotoczne, uszczelniające naczynia krwionośne, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne
Szałwia lekarska (<i>Salvia officinalis</i> L.)	garbniki pirokatechionowe, kwasy wielofenolowe, olejek eteryczny, witamina A, PP, B, C, sole mineralne	przeciwpotne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, korzytnie działa na układ pokarmowy
Tymianek pospolity (<i>Thymus vulgaris</i>)	olejek eteryczny, garbniki, kwasy organiczne, gorycze	wykrztuśne, przeciwzapalne, przeciwskurczowe, bakteriobójcze i przeciwgrzybicze
Wiesiołek (<i>Oenothera</i> L.)	olej zawiera nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT) omega-6	w leczeniu i łagodzeniu objawów atopowego zapalenia skóry, przeciwzapalne, przeciwastmatyczne

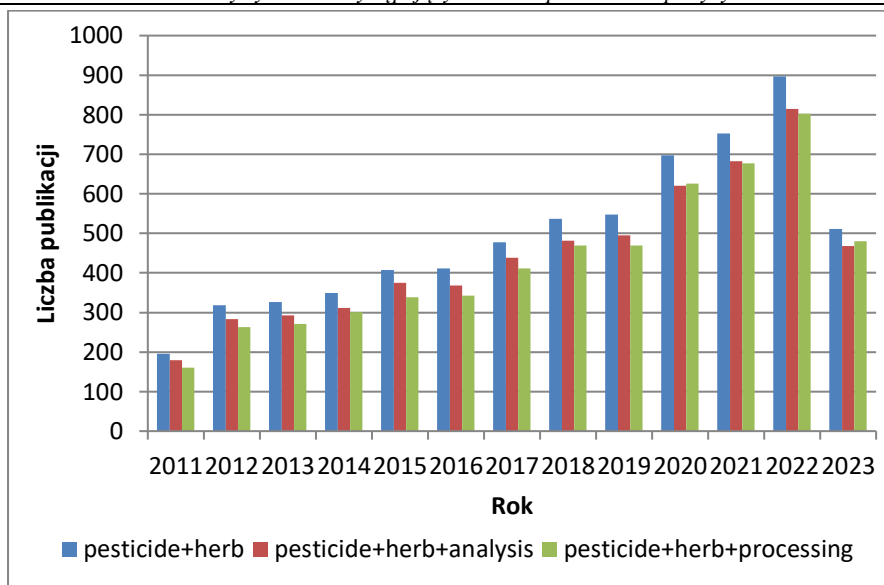
Źródło: opracowanie własne na podstawie [21, 24].

3. Charakterystyka pestycydów w ziołach

3.1. Stan wiedzy

Na całym świecie prowadzone są liczne badania w celu określenia występowania pozostałości pestycydów w ziołach zarówno surowych, jak i przetworzonych. W pracy dokonano przeglądu prac naukowych, opublikowanych w bazie Science Direct w latach od 2011 do 2023 (stan na dzień 11.05.2023), dotyczących pozostałości pestycydów w ziołach, wpisując następujące słowa kluczowe: „herb” i „pesticide”, a także w połączeniu z hasłami „analysis” oraz „processing”, a wyniki posortowano według filtru „trafność” (ang. *relevance*).

Jak wynika z przeprowadzonego przeglądu, obecny stan wiedzy na ten temat jest dość bogaty, czego dowodem jest rosnąca liczba publikacji (rys. 1). Zainteresowanie badaczy tą tematyką jest stale aktualne, ponieważ łącznie ukazało się ponad 6 tys. rekordów (6425) po wpisaniu hasła „herb+pesticide” (rys. 1), z czego najwięcej opublikowano w 2022 roku. Oryginalne prace badawcze stanowiły większość, bo 3005 artykułów, prace o charakterze przeglądowym to 1195 artykułów, a rozdziały w książkach stanowiły 1534 artykuły. Najwięcej prac opublikowano w obszarze nauk rolniczych i biologicznych (2767 prac), nauk o środowisku (1524 prace), farmakologii, toksykologii i nauk farmaceutycznych (884 prace) oraz chemii (776 prac).



Rysunek 1. Liczba publikacji dotycząca pozostałości pestycydów w ziołach w latach od 2011 do 2023 [opracowanie własne]

W literaturze można odnaleźć 5809 doniesień dotyczących metod przygotowywania próbek i oznaczania pestycydów, wpisując w bazie Science Direct słowa kluczowe „pesticide+herb+analysis” (rys. 1).

Oznaczanie pozostałości pestycydów w roślinach zielarskich jest dość problematyczne. Stanowi to wyzwanie analityczne, gdyż zioła należą do złożonych matryc zawierających różne substancje o podobnych właściwościach fizykochemicznych, przeszkadzających w analizie. Dlatego też współcześni naukowcy skupiają się nad opracowywaniem wielopozostałościowych metod analitycznych w celu oznaczania możliwie jak największego spektrum substancji czynnych w jednym toku analitycznym w różnych gatunkach ziół [25-28], bazując w głównej mierze na technice QuEChERS [29-33] z wykorzystaniem chromatografii gazowej [34-36] i cieczowej [29, 30, 37] sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS oraz LC-MS), których dynamiczny rozwój można zaobserwować na przestrzeni ostatnich lat.

Surowce zielarskie ze względu na krótką trwałość i sezonowość są poddawane różnorodnym procesom technologicznym, stąd też zainteresowanie wśród badaczy sposobem zachowania substancji czynnych środków ochrony roślin w trakcie przetwarzania z zastosowaniem różnych czynników [13, 38-41]. W wyniku przeglądu literaturowego po wpisaniu „pesticide+herb+processing” ukazało się 5612 prac (rys. 1).

Jest to obiecujący kierunek badań, gdyż procesy technologiczne zmieniają nie tylko właściwości chemiczne i fizyczne produktu roślinnego, ale również wpływają na zmianę stężenia pozostałości środków ochrony roślin, powodując ich zmniejszenie w produkcie końcowym, w szczególnych przypadkach zwiększenie, w porównaniu do stężeń w surowcu nieprzetworzonym [42, 43], a jest to uzależnione w dużym stopniu od właściwości fizykochemicznych pestycydu.

3.2. Występowanie pozostałości pestycydów w ziołach

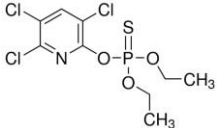
Jak wynika z danych przedstawionych w corocznych raportach Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności [44-46] dotyczących pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych badanych w Unii Europejskiej (UE) w latach od 2018 do 2020, ok. 44-53% nieprzetworzonych próbek ziół zawierało pozostałości pestycydów.

Wśród badanych matryc można wymienić m.in. kolendrę, bazylię, rukolę, szczypierek, tymianek, liście herbaty czy papryczki chilli. Maksymalne dopuszczalne poziomy pozostałości, według obowiązującego unijnego rozporządzenia 396/2005 [20], przewyższało ok. 17% próbek. Wskaźnik przekroczeń granicznych limitów w 2020 roku (5,1%) wzrósł w porównaniu z 2019 (3,9%) i 2018 (4,5%). Przekroczenia NDP zgłoszono dla niezatwierdzonych substancji:

- antrachinon w herbatach;
- chlorany w rukoli i roszponce;
- chloropiryfos w liściach herbaty;
- chlorfenapyr, karbendazym i tricyklazol w próbkach papryki chili.

W ramach krajowej urzędowej kontroli, w odniesieniu do danych publikowanych przez Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy na przestrzeni ostatnich 3 lat (od 2018 do 2020), przekroczenia NDP określone przez UE stwierdzono w ok. 1-2% próbek i wiązały się one głównie ze stosowaniem niedozwolonych substancji. W przypadku ziół nieprawidłowości dotyczyły wycofanego chloropiryfosu w próbkach rukoli i kopru [47], którego maksymalny okres karencji minął 16 kwietnia 2020 roku. Chloropiryfos charakteryzuje się wysoką toksycznością dla organizmu człowieka. Szkodliwy wpływ tej substancji na zdrowie ludzi przestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wpływ chloropiryfosu na zdrowie człowieka

Wzór chemiczny i strukturalny	Wpływ na zdrowie człowieka
$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ 	Substancja zaburzająca funkcjonowanie układu hormonalnego Działanie neurotoksyczne Inhibitor enzymu acetylocholinoesterazy Szkodliwy wpływ na rozwój człowieka i reprodukcję

Źródło: opracowanie własne na podstawie [48].

W literaturze naukowej spośród różnych grup pestycydów badacze często odnotowywali w próbkach ziół obecność pozostałości pestycydów takich jak:

- insektycydy chloroorganiczne (OCP, ang. *organochlorine pesticides*), np. analogi DDT (*p*, *p'*-DDD, *p*, *p'*-DDE, *o*, *p'*-DDT i *p*, *p'*-DDT) [49], izomery HCB (α , β , γ , i δ -HCB) i HCH w różnych ziołach [50, 51], indyjskich preparatach ziołowych [52] i liściach herbaty [53], a także endosulfan [54];
- insektycydy fosforoorganiczne (Ops, ang. *organophosphorus pesticides*), np. malation i diazinon w rumianku, mięcie pieprzowej i nasionach kminku [55], chloropiryfos w skrzypie polnym [9], koprze i natce pietruszki [56], dichlorfos w nagietku [36], chlorfenwinfos i fozalon w rozmarynie oraz etion w oregano [57], dimetoat w tymianku [58] i acefat w różnych ziołach [47];

- insektycydy z grupy pyretroidów (Pys, ang. *pyrethroids*), np. bifentryna, λ -cyhalotryna, cypermetryna i fenwalerat w herbatach [54], deltametryna w kolendrze [36];
- insektycydy z grupy neonikotynoidów (NDs, ang. *neonicotinoids*), np. acetamipryd w kolendrze [36], imidachlopyrd w różnych ziołach [59, 60] czy nasionach lnu [58];
- fungicydy, np. difeniloamina, tebukonazol w babce lancetowatej [9], flusilazol w kolendrze [36], azoksystrobina, karbendazym i piraklostrobina w tymianku [58];
- herbicydy, np. alachlor w rozmarynie [57], linuron w tymianku [58] oraz symazyna w różnych ziołach [50].

Obecność pozostałości pestycydów w roślinach zielonych może wynikać z niewłaściwych praktyk rolniczych [44-47], mogą się gromadzić podczas uprawy roślin zielarskich, tzn. przed zbiorem, po zbiorze lub podczas zabiegów, np. poprzez immisję środków ochrony roślin z sąsiadujących poletek, oprysk niezarejestrowanym preparatem do zwalczania chorób i szkodników w ochronie danego gatunku, a także w wyniku uprawy ziół na glebach skażonych trwałymi w środowisku zanieczyszczeniami (POPs, ang. *persistent organic pollutants*) stosowanymi w przeszłości, charakteryzującymi się bardzo długim okresem rozkładu, np. DDT, czy korzystanie ze skażonych źródeł wody [49, 51, 52, 55, 56]. Zanieczyszczenia mogą się pojawić także w trakcie transportu, przetwarzania i przechowywania ziół, np. poprzez podawanie fumigantów, a w konsekwencji mogą być obecne w produktach zielonych [42, 43].

4. Wnioski/Podsumowanie

1. W pracy zestawiono wybrane gatunki roślin leczniczych, przyprawowych i olejko-dajnych powszechnie uprawianych w Polsce i pozyskiwanych ze stanowisk naturalnych. Wskazano obecność substancji bioaktywnych w ziołach i ich działanie na człowieka.
2. Przegląd literatury prac naukowych dotyczących pozostałości pestycydów z ostatniej dekady (od 2011 do 2023) wskazał na stale rosnące zainteresowanie badaczy tematyką pozostałości pestycydów w ziołach (w dużej mierze związany z dynamicznym rozwojem analityki na przestrzeni ostatnich lat).
3. Wskazano związki najczęściej występujące w ziołach (głównie insektycydy chloroorganiczne i fosforoorganiczne) oraz potencjalne przyczyny ich zanieczyszczenia.
4. Liczne przypadki wykryć pozostałości pestycydów w różnych roślinach zielarskich świadczą o tym, że niezbędny jest ciągły ich monitoring oraz opracowanie ograniczeń regulacyjnych, co jest kluczowe dla zapewnienia ich wysokiej jakości i bezpieczeństwa zdrowia człowieka.

Literatura

1. Jiang T.A., *Health benefits of culinary herbs and spices*, Journal of AOAC International, 102, 2019, s. 395-411.
2. Al-Kuraishy H.M., Al-Fakhrany O.M., Elekhrawy E., Al-Gareeb A.I., Alorabi M., De Waard M., Albogami S.M., Batiha G.E., *Traditional herbs against COVID-19: back to old weapons to combat the new pandemic*, European Journal of Medical Research, 27, 2022, s. 186-191.
3. Guldiken B., Ozkan G., Catalkaya G., Ceylan F.D., Ekin Yalcinkaya I., Capanoglu E., *Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects*, Food and Chemical Toxicology, 119, 2018, s. 37-49.
4. Cassileth B.R., Heitzer M., Wesa K., *The public health impact of herbs and nutritional supplements*, Pharmaceutical Biology, 47, 2009, s. 761-767.

5. Lozano A., Rajski Ł., Belmonte-Valles N., Uclés A., Uclés S., Mezcuca M., Fernández-Alba A.R., *Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: validation and pilot survey in real samples*, *Journal of Chromatography A*, 1268, 2012, s. 109-122.
6. Shaban N.S., Abdou K.A., El-Houda N., Hassan Y., *Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal products*, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 2016, s. 102-106.
7. Tripathy V., Basak B.B., Varghese T.S., Saha A., *Residues and contaminants in medicinal herbs – A review*, *Phytochemistry Letters*, 14, 2015, s. 67-78.
8. Andersson H., Tago D., Treich N., *Pesticides and health: a review of evidence on health effects, valuation of risks, and benefit cost analysis*, *Risk Management*, 24, 2014, s. 203-295.
9. Malinowska E., Jankowski K., *Pesticide residues in some herbs growing in agricultural areas in Poland*, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 2015, s. 775.
10. Obiedziński M.W., Korzycka-Iwanow M., *Zanieczyszczenia chemiczne żywności – krytyczne wyróżniki jakości i bezpieczeństwa żywności*, *Przemysł Spożywczy*, 59, 2005, s. 10-13.
11. Łozowicka B., Rutkowska E., Jankowska M., Hrynko I., Kaczynski P., *Toxicological evaluation of multi-class pesticide residues in vegetables and associated human health risk study for adults and children*, *Human and Ecological Risk Assessment*, 22, 2016, s. 1480-1505.
12. Farag R.S., Abdel Latif M.S., Abd El-Gawad A.E., Dogheim S.M., *Monitoring of pesticide residues in some Egyptian herbs, fruits and vegetables*, *International Food Research Journal*, 18, 2011, s. 659-665.
13. Feng C., Xu Q., Qiu X., Jin Y., Ji J., Lin Y., Le S., Xue L., Chen Y., She J., Xiao P., Lu D., Wang G., *Profiling of pesticides and pesticide transformation products in Chinese herbal teas*, *Food Chemistry*, 383, 2022, s.132431.
14. Russo K., Lucchetti D., Triolone D., Di Giustino P., Mancuso M., Delfino D., Neri B., *Pesticides and mycotoxins evaluation in medicinal herbs and spices from EU and non-EU countries*, *Phytochemistry Letters*, 46, 2021, s. 153-161.
15. Muyumba N.W., Mutombo S.C., Sheridan H., Nachtergaeel A., Duez P., *Quality control of herbal drugs and preparations: The methods of analysis, their relevance and applications*, *Talanta Open*, 4, 2021, s. 100070.
16. WHO, *Traditional medicine strategy: 2014–2023*, World Health Organization, Geneva 2013.
17. WHO, *Guidelines on good manufacturing practices (GMP) for medicinal medicines*, World Health Organization, Geneva 2007.
18. EP, *European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care*, European Pharmacopoeia, 8th edition, Strasbourg, France 2014.
19. CA, *Codex pesticides residues in food online database*, Codex Alimentarius, <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pstres/pesticides/en/> [data dostępu: 22.04.2023].
20. EC, *Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC*, Official Journal of the European Union, L70, 2005, s.1-16, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396&from=EN> [data dostępu: 10.03.2023].
21. EFSA, *Botanical report – effect description, toxicity*, European Union, <https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/botanical-summary-report> [data dostępu: 24.04.2023].
22. Osińska E., Pióro-Jabrucka E., *Uprawa i przetwórstwo roślin zielarskich*, Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Brwinów 2022, <https://poznan.cdr.gov.pl/catalog/uploads/2022-UPRAWA-PRZETWORSTWO-ROSLIN-ZIELARSKICH.pdf> [data dostępu: 15.06.2023].

23. Kucharski W.A., Mordalski R., Praczyk M., *Rozwój gospodarstw w oparciu o rodzime surowce zielarskie – przygotowanie materiałów dla beneficjenta interwencji na potrzeby PS WPR 2023-2027*, Raport przygotowany w ramach obszaru nr 3 dotacji celowej: Wsparcie prac związanych z przygotowaniem planu strategicznego WPR na lata 2023-27, finansowanej przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w roku 2022, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – Państwowy Instytut Badawczy.
24. Senderski M.E., *Prawie wszystko o ziołach i ziołolecznictwie*, Mateusz E. Senderski, Podkowa Leśna 2019, s. 656.
25. Parrilla Vázquez P., Ferrer C., Martínez Bueno M.J., Fernández-Alba A.R., *Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques*, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 115, 2019, s.13-22.
26. Yang Y., Zheng K., Guo L.P., Wang C.X., Zhong D.B., Shang L., Nian H.J., Cui X.M., Huang S.J., *Rapid determination and dietary intake risk assessment of 249 pesticide residues in Panax notoginseng*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 233, 2022, s. 113348.
27. Łozowicka B., Jankowska M., Rutkowska E., Hrynko I., Kaczynki P., Miciński J., *The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography*, Journal of Natural Medicines, 68, 2014, s. 95-111.
28. Rao M.M., Kumar Meena A., Galib E., *Detection of toxic heavy metals and pesticide residue in herbal plants which are commonly used in the herbal formulations*, Environmental Monitoring and Assessment, 181, 2011, s. 267-271.
29. Wu X., Ding Z., *Evaluation of matrix effects for pesticide residue analysis by QuEChERS coupled with UHPLC-MS/MS in complex herbal matrix*, Food Chemistry, 405, 2023, s. 134755.
30. Li R.X., Li M.M., Wang T., Wang T.L., Chen J.Y., Francis F., Fan B., Kong Z.Q., Dai X.F., *Screening of pesticide residues in Traditional Chinese Medicines using modified QuEChERS sample preparation procedure and LC-MS/MS analysis*, Journal of Chromatography B, 1152, 2020, s. 122224.
31. Nantia E.A., Moreno-González D., Manfo F.P.T., Gámiz-Gracia L., García-Campaña A.M., *QuEChERS-based method for the determination of carbamate residues in aromatic herbs by UHPLC-MS/MS*, Food Chemistry, 216, 2017, s. 334-341.
32. Liu X.Q., Li Y.F., Meng W.T., Li D.X., Sun H., Tong L., Sun G.X., *A multi-residue method for simultaneous determination of 74 pesticides in Chinese material medica using modified QuEChERS sample preparation procedure and gas chromatography tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, 1015-1016, 2016, s.1-12.
33. Słowik-Borowiec M., *Validation of a QuEChERS-based gas chromatographic method for multiresidue pesticide analysis in fresh peppermint including studies of matrix effects*, Food Analytical Methods, 8, 2015, s. 1413-1424.
34. Gérez García N., Zinola G., Macías G., Cesio M.V., Heinzen H., *Straightforward sample preparation method for the analysis of pesticide residues in ginger (Zingiber officinale Rosc.) using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, Microchemical Journal, 178, 2022, s. 107349.
35. Fu Y., Dou X., Zhang L., Qin J., Yang M., Luo J., *A comprehensive analysis of 201 pesticides for different herbal species-ready application using gas chromatography-tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS*, Journal of Chromatography B, 1125, 2019, s. 121730.
36. Rutkowska E., Łozowicka B., Kaczyński P., *Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry*, Food Chemistry, 279, 2019, s. 20-29.
37. Ghadeer A.E., Hala E.Z., Lobna M.A.E.H., Hany H.M., *LC-MS/MS determination and quantitation of some pesticides residues in thyme and guava leaves extracts: application of QuEChERS protocol*, Microchemical Journal, 185, 2023, s. 108218.

38. Jankowska M., Kaczyński P., Łozowicka B., *Metabolic profile and behavior of clethodim and spirotetramat in herbs during plant growth and processing under controlled conditions*, Scientific Reports, 10, 2020, s.1323.
39. Jankowska M., Kaczyński P., Łozowicka B., *Dissipation kinetics and processing behavior of boscalid and pyraclostrobin in greenhouse dill plant (Anethum graveolens L.) and soil*, Pest Management Science, 77, 2021, s. 3349-3357.
40. Wang X., Zhou L., Zhang X., Luo F., Chen Z., *Transfer of pesticide residue during tea brewing: Understanding the effects of pesticide's physico-chemical parameters on its transfer behavior*, Food Research International, 121, 2019, s. 776-784.
41. Xiao J.J., Duan J.S., Xu X., Li S.N., Wang F., Fang Q.K., Liao M., Cao H.Q., *Behavior of pesticides and their metabolites in traditional Chinese medicine Paeoniae Radix Alba during processing and associated health risk*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 161, 2018, s. 20-27.
42. Kaushik G., Satya S., Naik S.N., *Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review*, Food Research International, 42, 2009, s. 26-40.
43. Holland P.T., Hamilton D., Ohlin B., Skidmore M.W., *Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products*, Pure and Applied Chemistry, 66, 1994, s. 335-356.
44. EFSA, *The 2018 European Union report on pesticide residues in food*, EFSA Journal, 18, 2020, s. 6057.
45. EFSA, *The 2019 European Union report on pesticide residues in food*, EFSA Journal, 19, 2021, s. 6491.
46. EFSA, *The 2020 European Union report on pesticide residues in food*, EFSA Journal, 20, 2022, s. 7215.
47. Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, *Sprawozdanie roczne za 2018, 2019 i 2020 rok. Zadanie 1.7. Analiza pozostałości środków ochrony roślin i mikotoksyn w płodach rolnych pochodzących z produkcji pierwotnej oraz w wodach podziemnych i powierzchniowych w pobliżu miejsc produkcji*, Poznań 2018, 2019 i 2020.
48. PPDB, *Pesticide properties database 2020*, University of Hertfordshire, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> [data dostępu: 15.06.2023].
49. Storelli M.M., *Evaluation of toxic metal (Hg, Cd, Pb), polychlorinated biphenyl (PCBs), and pesticide (DDTs) levels in aromatic herbs collected in selected areas of southern Italy*, Environmental Science and Pollution Research, 21, 2014, s. 946-953.
50. Chien M.Y., Yang C.M., Chen C.H., *Organochlorine pesticide residue in Chinese herbal medicine*, Journal of Pesticide Science, 47, 2022, s. 30-34.
51. Tong H., Tong Y., Xue J., Liu D., Wu X., *Multi-residual pesticide monitoring in commercial Chinese herbal medicines by gas chromatography – triple quadrupole tandem mass spectrometry*, Food Analytical Methods, 7, 2014, s. 135-145.
52. Rai V., Kakkar P., Misra C., Ojha S.K., Srivastava N., Mehrotra S., *Metals and organochlorine pesticide residues in some herbal ayurvedic formulations*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 79, 2007, s. 269-272.
53. Witczak A., Abdel-Gawad H., Zalesak M., Pohoryło A., *Tracking residual organochlorine pesticides (OCPs) in green, herbal, and black tea leaves and infusions of commercially available tea products marketed in Poland*, Food Additives & Contaminants: Part A, 35(3), 2018, s. 479-486.
54. Zhu P., Miao H., Du J., Zou J., Zhang G., Zhao Y., Wu Y., *Organochlorine pesticides and pyrethroids in Chinese tea by screening and confirmatory detection using GC-NCI-MS and GC-MS/MS*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, 2014, s. 7092-7100.
55. Sarkhail P., Yunesian M., Ahmadvaniha R., Sarkheil P., Rastkari N., *Levels of organophosphorus pesticides in medicinal plants commonly consumed in Iran*, Daru, 20, 2012, s. 9.

56. Dyjak K., Michota-Katuliska E., Zegan M., *Pilotażowe badania pozostałości pestycydów w wybranych świeżych ziołach i warzywach przyprawowych zakupionych w krajowych supermarketach*, Żywność: Nauka – Technologia – Jakość, 24, 2017, s. 126-138.
57. Di Bella G., Potorti A.G., Ben Tekaya A., Beltifa A., Ben Mansour H., Sajja E., Bartolomeo G., Naccari C., Dugo G., Lo Turco V., *Organic contamination of Italian and Tunisian culinary herbs and spices*, Journal of Environmental Science and Health, Part B, 54, 2019, s. 345-356.
58. Kowalska G., *Pesticide residues in some polish herbs*, Agriculture, 10, 2020, s. 154.
59. Wang Y., an Qin J., Lu Q., Tian J., Ke T., Guo M., Luo J., Yang M., *Residue detection and correlation analysis of multiple neonicotinoid insecticides and their metabolites in edible herbs*, Food Chemistry: X, 17, 2023, s. 100603.
60. Wang Y., an Qin J., Zhang J., Jin Z., Luo J., Yang M., *Rapid screening of imidacloprid residue in grains and medicinal herbs: A newly designed hapten and monoclonal antibody*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 219, 2022, s. 114931.

Charakterystyka ziół i występujących w nich pozostałości pestycydów

Streszczenie

Zioła są stosowane od wielu lat m.in. w ziołolecznictwie, jako składniki farmaceutyków i nutraceutyków, preparaty ziołowe, suplementy diety, w aromaterapii, jako perfumy i kosmetyki oraz jako przyprawy. Rośliny zielarskie charakteryzują się wysoką obecnością związków bioaktywnych, takich jak związki fenolowe, alkaloidy, flawonoidy, glikozydy, antocyjanidyny, kardenolidy, sponiny, olejki eteryczne czy garbniki, korzystnie wpływają na metabolizm człowieka, niemniej mogą zawierać zanieczyszczenia, zwłaszcza pozostałości pestycydów.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka ziół i ich właściwości oraz prezentacja występujących w nich pozostałości pestycydów w odniesieniu do obecnego stanu wiedzy. Zestawiono wybrane gatunki roślin leczniczych, przyprawowych i olejkodajnych, ich skład i działanie na człowieka.

Przegląd literatury na przestrzeni ostatniej dekady (od 2011 do 2023) dostarczył dowodów na stale rosnące zainteresowanie badaczy tematyką pozostałości pestycydów w ziołach. Wskazano związki najczęściej występujące w ziołach (głównie insektycydy chloroorganiczne i fosforoorganiczne) oraz potencjalne przyczyny ich zanieczyszczenia. Liczne przypadki wykryć pozostałości pestycydów w różnych roślinach zielarskich świadczą o tym, że niezbędny jest ciągły ich monitoring oraz opracowanie ograniczeń regulacyjnych, co jest kluczowe dla zapewnienia ich wysokiej jakości i bezpieczeństwa zdrowia człowieka.

Słowa kluczowe: pozostałości pestycydów, rośliny zielarskie, występowanie, bezpieczeństwo żywności, zdrowie człowieka

Herbs characterization and their pesticide residues occurrence

Abstract

Herbs have been used on a large scale in various sectors, e.g. in herbal medicine, pharmaceuticals, nutraceuticals, herbal preparations, dietary supplements, aromatherapy as perfumes and cosmetics and spices. Herbal plants exhibit a number of bioactive compounds such as phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, glycosides, anthocyanidins, cardenolides, sponins, essential oils or tannins, having a positive effect on human metabolism, however can contain impurities, especially pesticide residues.

The aim of this work was to characterize the herbs and their properties as well as to present the pesticide residues present in them in relation to the current state of knowledge. Selected species of medicinal, spice and oleaginous plants were listed including their composition and effect on humans.

The review of the literature over the last decade (2011-2023) showed the constantly growing interest of researchers in the pesticide residues in herbs. The most common compounds found in herbs (mainly organochlorine and organophosphorus insecticides) and potential causes of their contamination were indicated. Numerous cases of pesticide residues detection in various herbal plants proved that it is necessary to monitor them continuously and develop regulatory restrictions which are crucial to ensure their high quality and human health safety.

Keywords: pesticide residues, herbal plants, occurrence, food safety, human health

Zastosowanie wybranych biostymulatorów w rolnictwie

1. Wprowadzenie

Dzisiejsze podejście do rolnictwa ukierunkowane jest przede wszystkim na poprawę i zwiększenie jakości plonów w celu poprawy rentowności gospodarstw. Zwiększona produkcja rolna oraz nastawienie na produkcję ekologiczną wymusza na producentach żywności zastosowanie naturalnego podejścia do swoich upraw. Rośliny narażone są na liczne stresy środowiskowe, związane m.in. ze zmianami temperatury, deficytem lub nadmiarem wody czy chociażby nadmiernym promieniowaniem słonecznym. Wszystkie te procesy zakłócają fizjologiczną równowagę roślin, a także wpływają na ich wzrost, pobieranie składników pokarmowych z gleby czy procesy zachodzące w samej roślinie. Obecnie dla poprawienia jakości plodów rolnych stosowane są zarówno środki naturalne, jak i te będące wynikiem syntezy chemicznej. Większość z nich jednak uwalnianych jest do środowiska naturalnego, a wprowadzenie ich do obrotu związane jest z licznymi obostrzeniami prawnymi [1]. Dlatego w nowoczesnym rolnictwie coraz częściej poszukuje się takich środków, które będą aktywować nie tylko naturalne procesy obronne, stymulujące wzrost i rozwój roślin, ale jednocześnie przyczynią się do zmniejszenia wpływu negatywnych warunków środowiskowych podczas wegetacji. Jedną z grup takich środków są biostymulatory roślinne. Zgodnie z ustawą z dnia 10 lipca 2007 roku o nawozach i nawożeniu [2] stymulator wzrostu to związek organiczny lub mineralny, lub ich mieszanina, które wpływają korzystnie na rozwój roślin bądź inne procesy życiowe roślin, z wyłączeniem regulatora wzrostu będącego środkiem ochrony roślin w rozumieniu przepisów o ochronie roślin. Jako ten ostatni rozumie się środki wpływające na procesy życiowe roślin, na przykład substancje działające regulująco na roślinę, inne niż substancje odżywcze [3]. Według Europejskiego Stowarzyszenia Producentów Biostymulatorów (EBIC, ang. *European Biostimulants Industry Council*) biostymulator to produkt nawozowy, który niezależnie od zawartości składników pokarmowych zawiera substancję (substancje) czynną bądź mikroorganizmy. Po zastosowaniu na roślinę materiał ten stymuluje naturalne procesy, które prowadzą do poprawy co najmniej jednej z następujących cech rośliny: efektywności wykorzystania składników pokarmowych, tolerancji na stres abiotyczny lub cech jakościowych plonów [4].

Klasyfikację stymulatorów wzrostu roślin przedstawiono na I Światowym Kongresie Naukowym w Strasburgu w 2012 roku. Podział ten obejmował następujące grupy: substancje humusowe, kompleksowe materiały organiczne, składniki pochodzenia mineralnego, sole nieorganiczne (zawierające fosforyn), wyciągi z wodorostów morskich, pochodne chityny i chitozanu, antytranspiranty (substancje stosowane dolistnie ograniczające

¹ dorota.gendaszewska@lit.lukasiewicz.gov.pl, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Łódzki Instytut Technologiczny, www.lit.lukasiewicz.gov.pl.

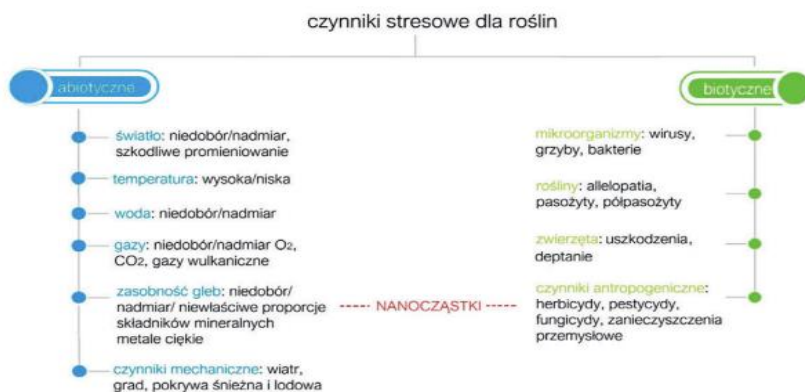
² katarzyna.miskiewicz@lit.lukasiewicz.gov.pl, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Łódzki Instytut Technologiczny, www.lit.lukasiewicz.gov.pl.

³ dorota.wieczorek@lit.lukasiewicz.gov.pl, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Łódzki Instytut Technologiczny, www.lit.lukasiewicz.gov.pl.

transpirację) oraz wolne aminokwasy i inne związki azotowe [4]. Obecnie zarejestrowanych jest ok. 100 środków wspomagających uprawę roślin, a ok. 500 środków działających pośrednio na roślinę poprzez poprawę właściwości gleby. Rozwiązanie w postaci stosowania biostymulatorów staje się coraz bardziej popularne. Pomimo licznych doniesień literaturowych odnośnie do dobroczynnego wpływu preparatów biostymulujących na wzrost i plonowanie roślin sporo aspektów ich działania pozostaje jeszcze nieodkrytych. Dlatego też są one obecnie elementem analiz wielu badaczy. W pracy omówiono czynniki stresogenne roślin, scharakteryzowano najbardziej znane grupy biostymulatorów oraz przedstawiono wstępne wyniki badań w ramach międzynarodowego projektu EUREKA. Celem tego projektu jest wprowadzenie do sprzedaży nowego produktu o podwójnym działaniu, zapewniającego ochronę przed patogenami grzybowymi oraz stymulację wzrostu roślin.

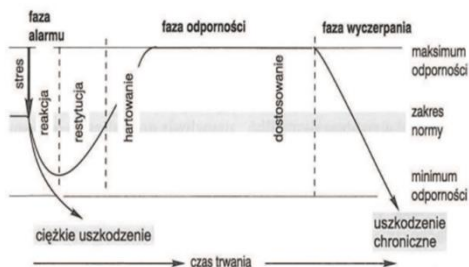
2. Czynniki stresogenne roślin

Terminem „stres” w przypadku roślin określamy wszystkie czynniki, które w odwracalny lub nieodwracalny sposób przyczyniają się do zaburzeń w funkcjonowaniu rośliny bądź jej struktur [5]. Ze względu na okres czasu, w którym skutki stresu pojawiają się w roślinie, stres możemy podzielić na pierwotny i wtórny. Stres pierwotny to pierwotne uszkodzenia rośliny, na przykład strukturalne bądź funkcjonalne, które mogą mieć charakter odwracalny lub nieodwracalny i mogą przyczynić się do śmierci komórki roślinnej. Stresy środowiskowe, przyczyniające się do zamierania części nadziemnych lub podziemnych roślin, zaliczane są do stresów wtórnych [5]. Czynniki stresowe, czyli tzw. stresory, dzielimy na czynniki abiotyczne, biotyczne oraz antropogeniczne. Czynniki abiotyczne to głównie czynniki środowiskowe, tj. światło, temperatura czy odpowiednie nawodnienie. To właśnie na te czynniki rośliny są najbardziej narażone w dobie zmieniającego się klimatu. Gdy warunki nawodnienia czy oświetlenia gleb ulegają zmianie, prowadzi to do wykształcenia odpowiedzi na poziomie komórkowym i w zależności od stopnia natężenia stresu może mieć to nieodwracalne skutki, łącznie z zamieraniem rośliny. Drugą grupą czynników wpływających na wzrost i rozwój roślin są czynniki biotyczne, czyli ożywione, które w sposób pośredni lub bezpośredni oddziałują na roślinę. Do tej grupy zaliczamy m.in.: wirusy, grzyby, bakterie, pasożyty. Mogą one konkurować z rośliną występującą w danym środowisku o składniki pokarmowe, a nawet blokować dostęp do tych składników, co przyczynia się do zamierania rośliny [6]. Trzecią grupą są czynniki antropogeniczne, będące wynikiem działalności człowieka [6]. Podział czynników stresowych działających na rośliny przedstawiono na rysunku 1 [7]. Stresy mogą mieć wpływ nie tylko na produkcję fotosyntetyczną, ale również powodują uruchomienie procesów takich jak aklimatyzacja i adaptacja [8]. Aklimatyzacja polega na niedziedzicznych modyfikacjach strukturalnych i funkcjonalnych (w odpowiedzi na stresor) oraz na sezonowym dostosowaniu się rośliny do niekorzystnych warunków. Adaptacja natomiast dotyczy zmian w genomie. Zwiększa prawdopodobieństwo przeżycia i reprodukcji organizmu w określonym środowisku. Adaptacja zachodzi więc w wyniku zmian ewolucyjnych, może być także wynikiem celowych modyfikacji genetycznych [8]. Ze względu na miejsce działania czynnika stresującego odpowiedź organizmu roślinnego może mieć charakter lokalny, gdy generowana jest w miejscu zadziałania stresora, lub strukturalny, gdy przekazywana jest pomiędzy tkankami czy organami [9].



Rysunek 1. Podział czynników stresowych dla roślin [7]

Wyróżniamy trzy fazy odpowiedzi roślin na działanie stresowych czynników środowiska (rys. 2). Pierwszą fazą jest faza alarmu. Dochodzi do zakłóceń procesów metabolicznych, na przykład destrukcji barwników czy zakłóceń procesu fotosyntezy w roślinie, a procesy kataboliczne zaczynają mieć przewagę nad anabolicznymi. Jeżeli jednak czynnik stresowy działa krótko i jego natężenie jest niewielkie, zmiany te zazwyczaj mają charakter odwracalny. Roślina wchodzi w fazę odporności, w której wykształca szereg mechanizmów obronnych i naprawczych. Jeżeli jednak stresor działa zbyt długo, roślina wchodzi w fazę wyczerpania, co oznacza, że jej organizm nie jest w stanie dłużej walczyć z czynnikiem stresowym. Zmiany funkcjonalne i strukturalne mogą być na tyle duże, że dochodzi do zamierania nadziemnych i podziemnych części rośliny [10].



Rysunek 2. Etapy odpowiedzi na czynniki stresowe w komórce roślinnej [10]

W toku ewolucji rośliny wykształciły wiele barier, zarówno fizycznych, jak i chemicznych, które chronią je przed działaniami stresora, na przykład przed wnikaniem patogenu. Barrierami fizycznymi są między innymi ściana komórkowa, wosk, który uniemożliwia namnażanie patogenów roślinnych, czy substancja wyścielająca ściany komórkowe – lignina, która czyni komórki odpornymi na uszkodzenia mechaniczne i utrudnia wnikanie na przykład patogenów grzybowych oraz ogranicza transport substancji odżywczych z komórek gospodarza [11, 12]. Do barier chemicznych zaliczamy wytwarzanie przede wszystkim różnego rodzaju substancji chemicznych, które zapobiegają wnikaniu patogenów czy skutkom stresu wywołanego przez składniki abiotyczne. Wyczuwanie warunków stresu biotycznego lub abiotycznego indukuje kaskady sygnalizacyjne, które aktywują kanały jonowe, kaskady kinaz, produkcję reaktywnych form tlenu

(ROS) czy akumulację hormonów. Sygnały te ostatecznie indukują ekspresję określonych podzbiorów genów obronnych, które prowadzą do złożenia ogólnej reakcji obronnej. Adaptacja roślin do biotycznych lub abiotycznych warunków stresowych odbywa się za pośrednictwem głębokich zmian w ekspresji genów, które skutkują zmianami w składzie roślinnego transkryptomu, proteomu i metabolomu. Białka są głównymi efektorami odpowiedzi stresowej u roślin, obejmują nie tylko enzymy katalizujące zmiany poziomów metabolitów, ale także składniki maszynierii transkrypcyjnej i translacyjnej [13]. Zarówno stresse abiotyczne, jak i biotyczne przyczyniają się do zmian w funkcjonowaniu i strukturze organizmów roślinnych. Na przykład skutkami suszy mogą być: zmniejszenie tempa podziałów komórkowych, wielkości liści, wydłużenia łodygi i proliferacji korzeni oraz zaburzenia w funkcjonowaniu aparatów szparkowych [14]. Pomimo wykształcenia licznych mechanizmów obronnych, szczególnie gdy stres jest długotrwały, roślina nie jest w stanie poradzić sobie z nim sama. Dlatego w nowoczesnym rolnictwie coraz częściej stosuje się biostymulatory wzrostu roślin.

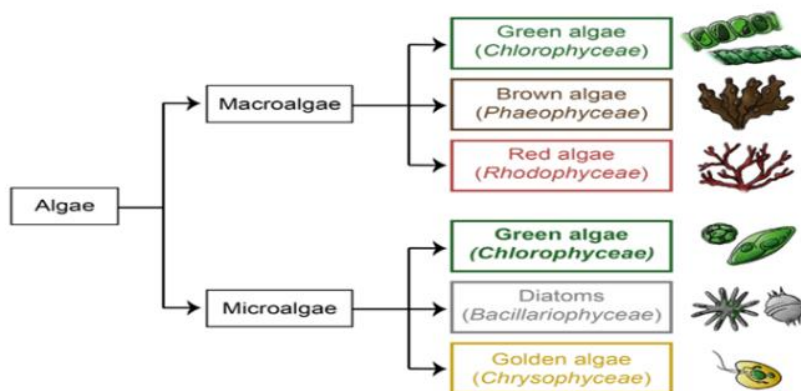
3. Rodzaje biostymulatorów roślin

3.1. Wyciągi z wodorostów morskich

Algi morskie różnią się między sobą składem chemicznym, a przez to także w pewnym stopniu właściwościami. Są one uzależnione od rodzaju, do którego należą, a także od terminu zbioru. Przykładami gromad glonów, które najczęściej stosuje się przy uprawach roślin ze względu na ich biostymulacyjne działanie na rośliny, są krasnorosty (*Corallina mediterranea*, *Jania rubens*, *Pterocladia pinnata*), zielenice (*Cladophora dalmatica*, *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca*) oraz brunatnice (*Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia maxima*, *Sargassum* spp) [15]. Podstawowe gromady glonów przedstawiono na rysunku 3. Największą jednak grupę glonów o udowodnionym działaniu biostymulującym stanowią brunatnice. Liczne doniesienia literaturowe wskazują chociażby na ich znaczenie osmoregulacyjne, stymulujące wzrost roślin, poprawiające właściwości gleby. Są źródłem betainy i proliny, mogą być stosowane do rekultywacji terenów o dużym stopniu zasolenia. Znane są również doniesienia, że niektóre gatunki z rodzaju brunatnic promują wzrost mikroorganizmów glebowych wywierających dobroczynny wpływ na rośliny [16]. Na podstawie przeglądu literaturowego można stwierdzić, że algi stosowane w rolnictwie stanowią bogate źródło substancji mineralnych i odżywczych dla roślin, ale również w znaczący sposób wpływają na ich wzrost i rozwój. Dzięki związkom w nich zawartym rośliny są w stanie rozbudować bardziej swój system korzeniowy, szybciej regenerują się po zadziałaniu czynników stresowych, szybciej aktywują kwitnienie i zawiązywanie owoców. Ich stymulujące działanie zostało wielokrotnie udowodnione naukowo, jednak część substancji aktywnych i mechanizmów działania pozostaje wciąż niewyjaśniona, co stawia przed naukowcami szereg wyzwań [16].

Wyciągi z alg są produktami coraz powszechniej wykorzystywanymi w rolnictwie na całym świecie. Ich znamienna rola obejmuje nie tylko prostą produkcję biomasy na potrzeby przemysłu spożywczego i paszowego, ale także produkcję wartościowych związków do zastosowań ekologicznych. W przypadku większości tych zastosowań rynek wciąż się rozwija, a biotechnologiczne wykorzystanie alg rozszerza się na nowe obszary. Biorąc pod uwagę ogromną różnorodność biologiczną glonów i najnowsze osiągnięcia inżynierii genetycznej, ta grupa organizmów stanowi jedno z najbardziej obiecujących źródeł aktywnych związków do zastosowań przemysłowych [17]. W rolnictwie produkty

pozyskiwane z alg nie tylko ułatwiają pobieranie składników odżywczych, poprawiają wydajność plonów, stan fizjologiczny, ale także przyczyniają się do zwiększenia tolerancji roślin chociażby na abiotyczne czynniki stresowe takie jak susza czy nadmierne zasolenie [18, 19]. Biomasa glonów dodana do gleby, na przykład w postaci nawozu, pozytywnie wpływa na jej strukturę, żyzność, a także sprzyja wzrostowi mikroorganizmów glebowych. Dodatkowo algi dostarczają roślinom niezbędnych mikro- i makroelementów, a poprzez przekształcanie metali ciężkich do formy mniej szkodliwej biorą także udział w procesie bioremediacji. Biomasa alg stanowi zatem cenny surowiec dla rolnictwa ekologicznego, zarówno w postaci biomasy, jak i ekstraktów, z których powstają odpowiednie preparaty [20].



Rysunek 3. Rodzaje gromad glonów [15]

Opracowano różne metody pozyskiwania ekstraktów z mikroalg celem uwolnienia z nich bioaktywnych związków. Techniki obejmują procesy mechaniczne lub fizyczne (na przykład autoklawowanie, sonikacja, mikrofalę i inne), chemiczne (jak szok osmotyczny, zastosowanie określonych kwasów, wodorotlenku sodu) i enzymatyczne (na przykład celulaza, proteaza). Obecnie jednak odchodzi się od nich ze względu na zbyt duże straty substancji bioaktywnych podczas procesu. Coraz częściej stosuje się metody enzymatyczne, co wiąże się z większymi kosztami pozyskiwania ekstraktów. Biomasa mikroalg zawiera w niewielkich ilościach składniki odżywcze, takie jak N, P, K i Ca. Badania wskazują, że mikroalgi zawierają substancje wspomagające wzrost roślin, takie jak auxyny, cytokininy, betainy, aminokwasy, witaminy, poliaminy (spermina i spermidyna) oraz polisacharydy (β -glukan) pochodzące z ich pierwotnego metabolizmu [19]. Substancje czynne z alg mogą stymulować niektóre enzymy roślinne odpowiedzialne za wchłanianie składników mineralnych i ich przemiany w roślinie. Bezpośrednim skutkiem ich działań może być zmiana składu chemicznego roślin. W świetle dotychczasowych badań udowodniono, iż działanie alg w dużym stopniu uzależnione jest od dawki, częstości zabiegu oraz gatunku rośliny [21].

Analiza wpływu biostymulatorów z alg morskich na cechy morfologiczne roślin, wielkość plonu i jego jakość jest tematem wielu prac badawczych. W pracy Dobrzańskiego i wsp. (2008) wykazano, że kondycjonowanie nasion marchwi i pietruszki w 0,5% roztworze biostymulatora AlgaminoPlant poprawiło kiełkowanie oraz przyczyniło się do

zwiększenia plonu handlowego korzeni marchwi [22]. Matysiak i wsp. (2010), badając stymulujące działanie alg morskich z gatunku *Ecklonia maxima* na kiełkowanie rzepaku, wskazali, że niższa dawka ekstraktu z alg (1,5 ml/200 ml H₂O) wykazała bardziej skuteczne działanie w porównaniu z wyższymi dawkami alg (3 ml/200 ml H₂O) [23]. Nieco inne wyniki uzyskali w swoich badaniach Rathore i wsp. (2009). Badając wpływ różnych stężeń ekstraktu z gatunku *Kappaphycus alvarezii* na pobieranie składników pokarmowych, wzrost i plonowanie soi, uzyskali najlepsze wyniki przy zastosowaniu 15% ekstraktu z alg. Wydajność plonowania była o 57% większa niż w grupie kontrolnej [24]. Prajapati i wsp. (2016), oceniając możliwość wykorzystania ekstraktów z *Kappaphycus alvarezii* i *Gracilaria edulis* w uprawie ziemniaka, stwierdzili, że dolistne stosowanie przyczyniło się do uzyskania wyższych roślin oraz większej liczby łodyg w porównaniu z obiektem kontrolnym, gdzie stosowano jedynie wodę. Według autorów było to spowodowane obecnością w biostymulatorach regulatorów wzrostu, tj.: auksyny, cytokiny i gibereliny [25].

3.2. Hydrolizaty białkowe i aminokwasy

Produkty na bazie białka można podzielić na dwie główne kategorie, tj. hydrolizaty białkowe (mieszaniny peptydów i aminokwasów pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego) oraz aminokwasy [26, 27]. Hydrolizaty białkowe stanowią ważną grupę biostymulatorów roślinnych opartych na mieszaninie peptydów i aminokwasów, którym w ostatnich latach poświęca się coraz więcej uwagi [26]. Hydrolizaty białkowe są otrzymywane enzymatycznie, chemicznie lub w wyniku termicznej hydrolizy różnych pozostałości zwierzęcych i roślinnych, w tym zwierzęcych tkanek nabłonkowych lub łącznych [27, 28]. Chemiczna hydroliza białek przez traktowanie kwasem lub zasadą w podwyższonej temperaturze jest drastycznym procesem powodującym całkowitą hydrolizę białek. Niszczony mogą być również wolne aminokwasy. Taki produkt nie będzie miał stymulujących właściwości, a może wręcz ograniczyć metabolizm roślinom i powodować toksyfikację środowiska. Wobec tego bezpieczniejszy wydaje się być proces enzymatycznej proteolizy. Proces ten pozwala na lepszą kontrolę produktu końcowego, który może być stosowany do produkcji biostymulatorów [29]. W pracy Schiavon i wsp. (2008) wykazano, że hydrolizat białka lucerny zastosowany do uprawianej kukurydzy zwiększył aktywność trzech enzymów w cyklu Krebsa oraz pięciu enzymów uczestniczących w redukcji i asymilacji azotu. Natomiast badając wpływ hydrolizatu białkowego na wzrost roślin *Zea mays* (kukurydza zwyczajna), stwierdzono, że traktowanie ich nawet niewielką ilością ekstraktu z lucerny skutkowało zwiększonym wzrostem roślin i akumulacją cukru w liściach. Jednocześnie obniżył się poziom azotanów, podczas gdy procentowy udział azotu całkowitego pozostał niezmienny [30]. Innym ciekawym rozwiązaniem jest zastosowanie hydrolizatów kolagenowych pozyskanych z odpadów garbarskich w procesie powlekania nasion strączkowych. Opracowane otoczki nasion mają na celu zwiększenie odporności na suszę i szkodniki podczas kiełkowania nasion i pojawiania się sadzonek. Ciekawe badania w tym zakresie przeprowadzili Ławińska i wsp. (2019), analizując wpływ otoczkowania nasion grochu, fasoli i soi preparatem na bazie kolagenu wyizolowanego z odpadów garbarskich. Udowodnili oni, że otoczka zawierająca ten preparat zapewniała roślinie korzystne warunki we wczesnej fazie wzrostu poprzez stworzenie bariery chroniącej kielki przed atakiem patogenów. Ponadto uzyskali znacznie

wyższe wartości wzrostu siewek dla nasion powlekanych tym preparatem w porównaniu z nasionami kontrolnymi (niepowlekkanymi) [31].

Aminokwasy pełnią w komórkach roślinnych ważną rolę. Będąc podstawowym budulcem białek roślinnych, nie tylko pozwalają na utrzymanie prawidłowego pH, ale wpływają na metabolizm i procesy transportowe w roślinie. Dodatkowo wpływają na proces oddychania mitochondrialnego i fotosyntezy. Zaletą ich stosowania jako biostymulatorów jest ich mobilność oraz łatwy transport w roślinach [32]. W literaturze można znaleźć wiele badań opisujących dobroczynny wpływ środków aminokwasowych na wzrost roślin. Koukounararas i wsp. (2013) stwierdzili, że dodatek preparatów aminokwasowych do upraw ma znaczący wpływ na plonowanie pomidora szklarniowego, a efektywny sposób ich aplikacji (do korzeni lub dolistnie) zależy od poziomu nawożenia przedsięwzięcia. Traktowanie pomidora preparatem Amino16 (11,3% L-aminokwasów, 4% całkowitego N i 25% materii organicznej) przyczyniło się do znacznego zwiększenia plonu handlowego (przez zwiększenie liczby owoców) [33].

Liczne doniesienia literaturowe wskazują także na zdolność preparatów na bazie aminokwasów do zwiększania odporności na stresy środowiskowe. W pracy Sadak i wsp. (2015) opisano wpływ preparatów aminokwasowych na wzrost bobiku rosnącego w warunkach stresu solnego w wodzie morskiej. Wykazano, że dolistne traktowanie roślin aminokwasami obecnymi w preparacie znacząco poprawiło wszystkie parametry obniżone wskutek stresu związanego z wodą morską [34]. Hammad i Ali (2014) przeprowadzili dwa doświadczenia (w doniczkach i na polu) w celu zbadania wpływu oprysku dolistnego biostymulantami aminokwasowymi na zmniejszenie zagrożenia stresem suszy u pszenicy zwyczajnej. Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie aminokwasów istotnie zwiększyło wszystkie badane pomiary i w znaczący sposób wpłynęło na plonowanie roślin [35]. W badaniu przeprowadzonym przez Botta (2013), w kontrolowanym środowisku, na sałacie poddanej trzem różnym rodzajom stresu zimna, potraktowane rośliny miały wyższą świeżą masę niż rośliny kontrolne, wykazując wyższą przewodność szparkową. Oceniono również tolerancję na stres cieplny życicy trwałej (*Lolium perenne* L.) w kilku reżimach temperaturowych. W wysokiej temperaturze (36°C) życica traktowana preparatem aminokwasowym wykazywała wyższą wydajność fotosyntezy oraz utrzymywała wyższy poziom chlorofili i karotenoidów [36].

Liczne prace wskazują również na ogromną rolę preparatów aminokwasowych w regulacji odpowiedzi roślin na czynniki biotyczne. Wyniki badań Colla i wsp. (2017) potwierdziły, że hydrolizaty białkowe mogą stymulować reakcje obronne roślin i zmniejszać ekspansję mączniaka rzekomego w winogronach poprzez indukcję niektórych genów obronnych, a także mogą przyczyniać się do wzrostu mikroorganizmów, które rywalizując o przestrzeń, wytwarzają szereg związków antagonistycznych hamujących wzrost tego patogenu [37]. Prace Wojdyła i wsp. (2016) potwierdziły natomiast skuteczność preparatów aminokwasowych w stosunku do grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* wywołującego zgniliznę twardzikową fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) [38].

Biostymulatory białkowe stanowią bardzo ważną grupę związków i mogą być stosowane w rolnictwie na szeroką skalę. Poza tym są całkowicie bezpieczne dla środowiska naturalnego oraz dla zdrowia człowieka i zwierząt. Dlatego stosowanie substancji stymulujących wzrost roślin właśnie w tej postaci zyskuje coraz większe grono odbiorców i jest przedmiotem zainteresowania naukowców na całym świecie.

3.3. Inokulanty mikrobiologiczne

Naturalny mikrobiom ryzosfery to zespół mikroorganizmów, w skład których wchodzi zarówno mikroorganizmy wywierające korzystny (PGPR, ang. *plant growth-promoting rhizobacteria*), jak i obojętny lub szkodliwy wpływ na rozwój rośliny [39]. Korzystne oddziaływanie drobnoustrojów na rośliny wyższe odbywa się poprzez udostępnianie im niezbędnych składników pokarmowych, wytwarzanie substancji czynnych, co przyczynia się do przyrostu masy korzeniowej, nagromadzenia biomasy roślin czy poprawy struktury gleby [40]. Mikroorganizmy te mają działanie podobne do nawozów. Szczególne zainteresowanie biotechnologów wzbudza wprowadzanie do gleby mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie i produkcja biopreparatów, które zawierają w swoim składzie mikroorganizmy antagonistyczne lub pasożytnicze w stosunku do patogenów i szkodników roślin [39]. Jest to kolejna grupa biostymulatorów, tzw. inokulanty mikrobiologiczne, które naniesione na ziarno, powierzchnię roślin lub do gleby, wspomagają wzrost roślin [40]. Obecnie znanych jest kilkadziesiąt szczepów PGPR. Bakterie promujące wzrost i rozwój roślin należą do różnych grup filogenetycznych. Najliczniejszą grupę stanowią bakterie z rodzajów *Pseudomonas* (na przykład *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. putida*), *Bacillus* (na przykład *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. laterosporus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*, *E. cloacae*) i *Erwinia* (*E. herbicola*) [39, 41]. Mimo iż mechanizm pobudzania wzrostu roślin przez PGPR nie jest jeszcze w pełni poznany, bakterie te posiadają wiele różnych cech odpowiedzialnych za działania stymulujące wzrost roślin. Bakterie PGPR kolonizują glebę dzięki zdolności adaptacji do różnych warunków środowiska, szybkiemu wzrostowi oraz metabolizowaniu wielu związków. Ze względu na sposób zasiedlenia roślin dzielą się one na dwie grupy: bakterie wewnątrzkomórkowe oraz wolno żyjące bakterie zewnątrzkomórkowe. Wewnątrzkomórkowe bakterie symbiotyczne znajdują się w wyspecjalizowanych strukturach komórek korzenia, takich jak brodawki. Z kolei wolno żyjące bakterie zewnątrzkomórkowe obecne są w ryzosferze, na powierzchni korzeni oraz w przestrzeniach międzykomórkowych kory korzenia [39]. PGPR stymulują wzrost roślin w sposób bezpośredni i pośredni. Pierwszy z nich polega na produkcji fitohormonów stymulujących wzrost, redukowaniu poziomu etylenu oraz ułatwieniu pobierania związków mineralnych. Stymulacja pośrednia opiera się na ochronie przed fitopatogenami [42]. Poprawa odżywienia roślin pod wpływem stosowania inokulantów zachodzi również poprzez zwiększenie puli azotu glebowego pochodzącego z wiązania azotu atmosferycznego przez tzw. bakterie diazotroficzne [41]. Wiele doniesień literaturowych potwierdza, że zaszczepienie roślin uprawnych niektórymi szczepami PGPR we wczesnej fazie rozwoju poprawia plon wyprodukowanej biomasy poprzez bezpośredni wpływ na wzrost korzeni i pędów [43-45]. W pracy omówiono badania nad najczęściej występującymi bakteriami PGPR, tj. z rodzaju *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* i *Erwinia*. Wybrane szczepy pokazano na rysunku 4.



Rysunek 4. Szczepy PGPR na szalkach Petriego, od lewej: *Pseudomonas aeruginosa* [46], *Bacillus cereus* [47], *Enterobacter cloacae* [48], *Erwinia* sp. [49]

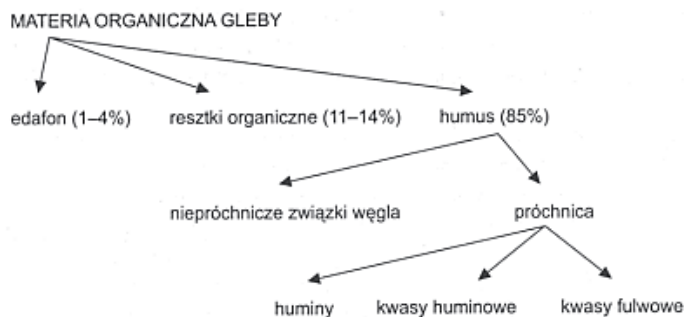
Wśród bakterii z grupy PGPR największe i potencjalnie najbardziej obiecujące okazują się bakterie fluorescencyjne z rodzaju *Pseudomonas*. Wynika to z ich szybkiego wzrostu, prostych wymagań żywieniowych, umiejętności wykorzystania różnorodnych substratów organicznych i ich dużej mobilności. Co więcej, bakterie te produkują związki przeciwgrzybicze o szerokim spektrum działania, działając jak środki biobójcze. Gatunki *Pseudomonas* są wszechobecnymi bakteriami w glebach rolniczych i mają wiele cech, które sprawiają, że mogą być traktowane jak PGPR [50]. W pracy Saharan i Nehra (2011) udowodniono, że szczepienie roślin bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* pozwala złagodzić stresy powodowane czynnikami abiotycznymi oraz przyczynia się do wzrostu plonu roślin [43]. Z kolei Abdul Jaleel i wsp. dowiedli, że szczepienie roślin bakteriami z gatunku *P. fluorescens* zwiększa plon biomasy i zawartość alkaloidów w czasie suszy [51]. W pracy Sandhga i wsp. (2010) stwierdzono wzrost ilości biomasy roślin, zawartości wody oraz zmniejszenie utraty wody przez liście kukurydzy szczepionej *Pseudomonas* spp. [52]. Prace te jednoznacznie pokazują wpływ szczepienia bakteriami *Pseudomonas* na zapobieganie skutkom stresów abiotycznych roślin. Drugą szeroką grupą bakterii PGPR są bakterie z rodzaju *Bacillus*, które mogą przetrwać w glebie trudne warunki środowiskowe z uwagi na zdolność do wytwarzania przetrwalników. W pracy Jabborovej i wsp. (2021) stwierdzono, że istnieje istotny pozytywny wpływ inokulacji *B. subtilis* na wzrost imbiru. Szczep *B. subtilis* może być wykorzystany jako potencjalny środek lub bionawóz do stymulacji wzrostu badanej rośliny [53, 54]. Trzecią istotną grupą bakterii PGPR są bakterie z rodzaju *Enterobacter*. W pracy Khalifa i wsp. (2016) opisano proces izolacji szczepu MSR1 zidentyfikowanego jako *Enterobacter cloacae* z wnętrza korzenia lucerny siewnej (*Medicago sativa*). Badania wykazały, że szczep ten posiadał wiele właściwości sprzyjających wzrostowi roślin, takich jak rozpuszczalność fosforanów, produkcja fitohormonów acetoiny i związków bioaktywnych. Inokulacja *Pisum sativum* MSR1 znacząco poprawiła parametry wzrostu (długość i sucha masa) tej rośliny strączkowej w porównaniu z roślinami nietraktowanymi tym szczepem [55]. Z kolei w innej pracy opisano, że szczep *E. cloacae* znacznie poprawił takie parametry uprawowe roślin jak: świeża masa, długość korzeni, długość pędu i zawartość azotu w zaszczepionych sádzonkach ryżu. Bakterie z rodzaju *Enterobacter* mogą być więc w przyszłości wykorzystane do opracowania przyjaznego dla środowiska bionawozu prawdopodobnie dla wielu ważnych gatunków roślin [55]. Również bakterie z rodzaju *Erwinia* mają potwierdzone zdolności do promocji wzrostu roślin. W pracy Sagar (2018) wykazano, że inokulacja pszenicy gatunkiem *Erwinia* przyczyniła się do znacznego wzrostu zdolności kiełkowania nasion oraz zwiększenia wydłużenia korzeni i pędów w porównaniu z kontrolą. Niniejsze

badanie potwierdza korzystny wpływ zabiegów z wykorzystaniem bakterii *Erwinia* wyizolowanych z gospodarstw ekologicznych na zrównoważoną produktywność pszenicy [56].

Liczba oferowanych preparatów nawozowych pochodzenia naturalnego wzbogaconych o pożyteczne mikroorganizmy, odpowiednich dla ekologicznej uprawy roślin ogrodniczych i rolniczych, jest wciąż niewielka. Natomiast zainteresowanie rynku bioproduktami mikrobiologicznymi dynamicznie wzrasta, co stwarza potrzebę wdrożenia do praktyki rolniczej nowych bioproduktów mikrobiologicznych. W Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach opracowano i wdrożono do praktyki ogrodniczej i rolniczej mikrobiologiczne biopreparaty oraz technologie poprawy jakości gleb. Zaproponowane innowacyjne technologie są przełomowe w kraju i w skali międzynarodowej. Nowe technologie obejmują opracowanie naturalnych bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie, takich jak bionawozy i ulepszacze glebowe, komposty, a także opracowanie metod ich stosowania w zróżnicowanych warunkach uprawy polowej lub szklarniowej różnych gatunków roślin ogrodniczych i rolniczych. Co ciekawe, w Instytucie Ogrodnictwa powstał pierwszy w Polsce i największy w Europie bank symbiotycznych mikroorganizmów SYMBIO BANK, gdzie zgromadzono do 30 gatunków grzybów oraz 1500 szczepów bakterii i grzybów strzępkowych. Wykazano dużą skuteczność mikroorganizmów zgromadzonych w tych zasobach w stymulacji wzrostu wegetatywnego i plonowania truskawki, jabłoni i innych gatunków roślin ogrodniczych [57]. Potwierdza to, że PGPR mogą być stosowane jako inokulanty mikrobiologiczne poprawiające wzrost i wydajność upraw rolnych.

3.4. Substancje humusowe

Substancje humusowe to kolejna ważna grupa biostymulatorów. Substancje te, jako główny składnik materii organicznej, powstają w wyniku procesu humifikacji. Jest to proces chemicznego i mikrobiologicznego rozkładu resztek roślinnych i zwierzęcych w glebie oraz przebudowa i synteza związków organicznych, w wyniku których tworzy się próchnica. Wpływ na ilość i jakość substancji humusowych ma przede wszystkim rodzaj i odczyn gleby, jej wilgotność i temperatura, nawożenie oraz ilość i jakość przetwarzanego materiału organicznego. Zwiększają one pojemność wodną gleby, dlatego odgrywają ważną rolę w ochronie gleb lekkich przed zagrożeniem suszą [58]. Ze względu na frakcję glebową substancje humusowe możemy podzielić na kwasy huminowe, kwasy fulwowe oraz huminy (rys. 5). Poszczególne grupy różnią się barwą, rozpuszczalnością, strukturą cząsteczek, masą cząsteczkową, składem pierwiastkowym czy zawartością grup funkcyjnych [59].



Rysunek 5. Podział materii organicznej gleby [60]

Kwasy huminowe są substancjami koloidalnymi, które składają się z polimerów utworzonych z monomerów. Są nierozpuszczalne w wodzie w warunkach kwaśnych, mają barwę od ciemnobrązowej do czarnej oraz rozpuszczają się w roztworze NaOH. Kwasy huminowe wpływają pozytywnie na wzrost roślin, przy czym wyróżniamy bezpośredni, jak i pośredni wpływ. Wpływ bezpośredni związany jest z dostępem substancji humusowych do tkanek roślinnych i wywoływaniem procesów biochemicznych. Pośredni wpływ związany jest z polepszaniem podstawowych właściwości gleby, w tym agregacji, napowietrzenia, przepuszczalności, kumulowania wody, transportu i dostępności substancji odżywczych. Kwasy huminowe stymulują u roślin aktywność hormonów wzrostu oraz produkcję przeciwutleniaczy redukujących wolne rodniki. Co więcej, zwiększają syntezę chlorofilu, a także tolerancję na stres środowiskowy. Jak pokazują doniesienia literaturowe, po zastosowaniu kwasów huminowych obserwowano zwiększony wzrost roślin [61]. Z kolei huminy są prawdopodobnie jeszcze bardziej skondensowane niż kwasy huminowe i silniej związane z cząsteczkami mineralnymi. Stanowią też najmniej ruchliwą grupę substancji humusowych [59]. Ich główne właściwości to czarna barwa oraz brak rozpuszczalności w wodzie. Poza tym huminy tworzą kompleksy organiczno-mineralne w glebie. Kolejna grupa substancji humusowych to kwasy fulwowe (fulwokwasy). Są to heterogeniczne i polidispersyjne wielocząsteczkowe związki o budowie cząsteczki podobnej do budowy cząsteczki kwasów huminowych. Różnią się mniejszym rozmiarem jądra aromatycznego i bardziej rozbudowanymi łańcuchami bocznymi. Dzięki temu odznaczają się szczególną ruchliwością [59]. Charakteryzują się one barwą żółtobrązową, prostą budową oraz są rozpuszczalne w wodzie w całym zakresie pH. Substancje te występują głównie w próchnicy gleb bielcowych i brunatnych kwaśnych. Kwasy fulwowe mimo licznych badań stanowią najmniej dotychczas poznaną frakcję glebowych substancji organicznych.

Jak potwierdzają liczne doniesienia literaturowe, substancje humusowe oddziałują na właściwości fizyczne, chemiczne i mikrobiologiczne gleby, ułatwiając pobieranie składników odżywczych przez rośliny i wpływając w ten sposób na ich wzrost oraz rozwój systemu korzeniowego [62, 63]. Anjum i wsp. [62] wykazali, że traktowanie kukurydzy kwasem fulwowym powoduje wzrost intensywności fotosyntezy, szybkości transpiracji i stężenia międzykomórkowego CO₂, co wiąże się z pobudzaniem wzrostu roślin. Ezzat i wsp. (2009) wykazali, że stosowanie 4-procentowego roztworu substancji humusowych w formie dolistnej aplikacji w istotny sposób wpływało na poprawę parametrów fizjologicznych roślin ziemniaka, wyrażonych wysokością, liczbą łodyg, powierzchnią liści i suchą masą roślin. Mogło być to skutkiem zwiększonej zdolności do zatrzymywania wody, pobierania składników odżywczych i usprawnionego procesu fotosyntezy [63]. Istotnym problemem w uprawach rolniczych są postępujące niedobory wody w glebie. Kluczem do rozwiązań, które mogą szybko i długotrwale podnieść pojemność wodną gleb, są: optymalne gospodarowanie materią organiczną oraz wykorzystanie rozwiązań biotechnologicznych opartych na naturalnych biohumusach i kwasach humusowych pozyskiwanych z rodzimych surowców takich jak torfy, komposty czy węgiel brunatny. Działania na rzecz wzrostu zawartości próchnicy w polskich glebach to strategia, która długofalowo pozwoli podnieść pojemność wodną użytków rolnych. Szacuje się, że podniesienie poziomu próchnicy w glebie o 1% umożliwi zmagazynowanie 2 razy większej ilości wody. Dlatego warto regularnie stosować produkty oparte na kwasach humusowych, mikroflorze bakteryjnej i minerałach ilastych [64].

4. Wielofunkcyjne preparaty dolistne

Rośliny do prawidłowego wzrostu i rozwoju potrzebują odpowiednich warunków środowiska, w tym odpowiedniego nawodnienia, nasłonecznienia, właściwego poziomu zasolenia gleby, jak i śladowej ilości metali ciężkich [65]. Do właściwego rozwoju roślin niezbędne jest również dostarczanie makro- i mikroelementów, a w szczególności N, P, K, Fe. Niezbędne są również środki wspomagające walkę z patogenami roślin [65]. Działania w zakresie rolnictwa koncentrują się na szukaniu skutecznych metod ochrony roślin oraz na precyzyjnym dostosowaniu nawożenia do warunków glebowych i wymogów roślin.

Celem projektu Eureka (EUREKA/DUO_PLANT_Protect/5/2021), realizowanego przez Sieć Badawczą Łukasiewicz – Łódzki Instytut Technologiczny, jest opracowanie innowacyjnego dolistnego preparatu na bazie hydrolizatów kolagenu i keratyny oraz wprowadzenie go na rynek w formie dwupaku z handlowo dostępnym fungicydem. Preparat będzie wykazywał więc podwójną aktywność: ochronę przed patogenami oraz biostymulację kiełkowania i wzrostu roślin.

Metodyka badań. W pierwszym etapie badań wytypowano substancje bioaktywne będące składowymi nowego preparatu białkowego, w tym: salicylan poliheksametylenobiguanidyny, askorbinian tytanu, salicylan tytanu oraz salicylan sodu i kwas salicylowy. Dodatki te mają udowodnione działanie wspomagające wzrost roślin oraz zwiększające ich odporność na stres środowiskowy [66, 67]. Następnie sporządzono preparaty testowe. W rezultacie powstało 10 preparatów biostymulujących (tab. 1). Sporządzone preparaty zostały przebadane szczegółowo pod kątem zawartości aminokwasów, pH oraz zawartości azotu. Badanie składu aminokwasowego 10 preparatów kolagenowych i keratynowych wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (HPLC/RF). Oznaczenie zawartości azotu wykonano metodą Kjeldahla. W badanych próbkach hydrolizatów kolagenowych i keratynowych oznaczono następujące aminokwasy: alaninę, glicynę, prolinę, hydroksyprolinę, leucynę, lizynę, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy oraz cysteinę. W drugim etapie badań przeprowadzono testy Phytotoxkit, które pozwoliły na wytypowanie najsukuczniejszych preparatów przeznaczonych do biostymulacji wzrostu pszenicy. Do testowania wybrano pszenicę ozimą z uwagi na strategiczne znaczenie gospodarcze rynku zbóż, a także po analizie zagrożeń upraw zbóż chorobami grzybowymi w Polsce. Pszenica zajmuje trzecie (po kukurydzy i ryżu) miejsce w światowej produkcji zbóż. Według raportu Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa w roku 2020 produkcja pszenicy na świecie wynosiła 760 mln ton [68]. Pszenica ozima ma największe znaczenie spośród zbóż uprawianych w Polsce. Według danych GUS za rok 2021 pszenica ogółem zajmowała 2,39 mln ha w Polsce, a pszenica ozima 2,17 mln [69]. Płytki testowe Phytotoxkit napełniono 70 g gleby i zwilżono wodą destylowaną do 100% pojemności wodnej oraz przykryto bibułą filtracyjną. Następnie zastosowano nasiona roślin testowych w ilości 10 sztuk na płytkę. W przeprowadzonych testach wykielkowanie nasion wynosiło 100%. Po 5 dniach wzrostu zastosowano oprysk badanymi preparatami w ilości 1 ml bezpośrednio na siewki. W 10. dniu testu następował odczyt długości siewek i korzeni. Na tej podstawie określono fitotoksyczność preparatów w stosunku do ziaren pszenicy.

Wyniki przeprowadzonych badań właściwości 10 badanych preparatów kolagenowych i keratynowych przedstawiono w tabeli 2. Zawartość hydroksyproliny wahała się od 12 µg/ml do 1780 µg/ml. Zawartość azotu mieściła się w granicach od 10,09% do 15,05%. Z kolei wartość pH badanych preparatów wahała się od 6,01 do 7,28.

Tabela 1. Zastosowane kombinacje preparatów biostymulujących

Nr	Preparat białkowy	Substancja bioaktywna	KOD
1	Kolagen (0,5%)	salicylan sodu (0,03%)	1
2	Kolagen (0,5%)	salicylan PHMB (0,046%)	2
3	Kolagen (0,5%)	kwas salicylowy (0,014%)	3
4	Kolagen (0,5%)	askorbinian tytanu (0,01%)	4a
5	Kolagen (0,5%)	askorbinian tytanu (0,03%)	4b
6	Kolagen (0,5%)	salicylan tytanu (0,01%)	5a
7	Kolagen (0,5%)	salicylan tytanu (0,03%)	5b
8	Keratyna (0,5%)	salicylan sodu (0,03%)	6
9	Keratyna (0,5%)	salicylan tytanu (0,01%)	7
10	Keratyna (0,5%) + Kolagen (0,5%)	salicylan sodu (0,03%)	8

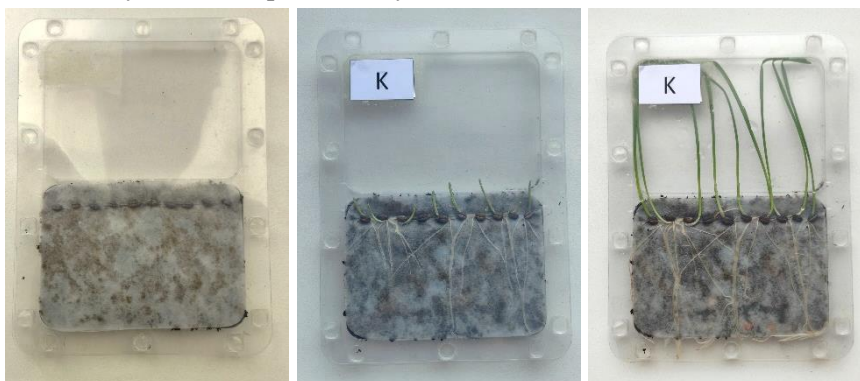
Źródło: opracowanie własne.

Tabela 2. Wybrane parametry badanych preparatów białkowych

Lp.	KOD	Zawartość hydroksypoliny w kolagenie/keratynie [$\mu\text{g/ml}$]	Zawartość azotu [%]	Wartość pH
1.	1	1658	13,78	6,27
2.	2	1780	15,10	6,01
3.	3	654	10,25	6,44
4.	4a	678	10,01	6,70
5.	4b	987	12,34	7,41
6.	5a	847	11,35	7,25
7.	5b	879	10,34	7,78
8.	6	21	15,15	7,54
9.	7	12	10,09	7,21
10.	8	147	11,24	7,28

Źródło: opracowanie własne.

Na rysunku 6 pokazano etapy wzrostu siewek w testach Phytotoxkit. W tabeli 3 zamieszczono wyniki badań prowadzonych w fitotestach.



Rysunek 6. Etapy wzrostu siewek pszenicy ozimej [źródło: opracowanie własne]

Tabela 3. Średnia długości siewek i korzeni dla pszenicy ozimej dla n = 10

Parametr	Nazwa próby										
	KON	1	2	3	4a	4b	5a	5b	6	7	8
Śr. długość siewki	12,30	13,32	12,78	11,39	13,30	9,45	12,42	11,71	10,68	11,90	12,57
Odch. stand.	0,54	1,30	2,71	4,76	2,80	6,11	2,93	1,40	3,91	0,90	1,43
Śr. długość korzenia	8,03	9,45	9,11	8,49	9,63	7,06	9,27	8,85	6,78	7,78	7,03
Odch. stand.	2,88	0,82	0,43	3,10	0,44	3,97	0,82	0,21	0,71	0,71	0,35

Źródło: opracowanie własne.

W testach Phytotoxkit nie stwierdzono fitotoksyczności preparatów wobec pszenicy ozimej. Co więcej, zauważono, że preparaty z salicylanem sodu i askorbinianem tytanu spowodowały większy wzrost siewek w porównaniu z kontrolą. Doniesienia literaturowe potwierdzają pozytywny wpływ tych dodatków na wzrost roślin [66, 67]. W pracy z 2016 roku badano wpływ kwasu salicylowego na stres metaboliczny wywołany wzrastającymi stężeniami kadmu u pieprzycy siewnej (*Lepidium sativum*). Badania potwierdziły wpływ kwasu salicylowego na zwiększenie odporności na stres oksydacyjny rośliny wywołany kadmem [67]. Również w pracy Gaja i wsp. (2002) potwierdzono pozytywny wpływ aplikacji dolistnej askorbinianu tytanu na plon i jakość buraka cukrowego. W ciągu trzech sezonów wegetacyjnych przeprowadzono dziewięć doświadczeń polowych na terenie Wielkopolski i Kujaw. Niezależnie od lokalizacji doświadczeń stwierdzono wzrost plonu korzeni aż o 9% [66]. Co więcej, obecność aminokwasów pochodzących z preparatów białkowych dodatkowo stymuluje wzrost badanych roślin. Testy te potwierdziły pozytywny wpływ łącznego stosowania preparatów białkowych i wybranych składników dodatkowych na wzrost pszenicy ozimej. Dalsze działania w tym projekcie będą się koncentrować na badaniu wpływu łącznego stosowania preparatów biostymulujących i wybranego fungicydu w większej skali, w tym w grow boxach. Opracowane w ramach projektu nowe sposoby równoczesnej ochrony i nawożenia roślin zostaną również sprawdzone podczas uprawy kapusty, gdyż produkcja warzywnicza jest ważną gałęzią rolnictwa w Polsce.

5. Podsumowanie

Wraz z rosnącą globalną populacją rośnie zapotrzebowanie na roślinne i zwierzęce produkty spożywcze. Niestety coraz częściej występujące susze, zasolenie gleb oraz postępujące ocieplenie klimatu zmniejszają powierzchnie terenów możliwych do zastosowania pod uprawy. To jest jeden z powodów, dla których zwiększa się ilość stosowanych herbicydów, fungicydów, nawozów i innych związków chemicznych zapewniających odpowiednią wydajność plonów. W konsekwencji może to doprowadzić do zanieczyszczenia środowiska, w tym wód, gleby i powietrza. W odpowiedzi na te problemy poszukuje się ekologicznych i skutecznych środków wspomagających wzrost roślin, w tym biostymulatorów. Ze względu na sposób działania są one bezpieczne dla środowiska naturalnego, zastępując w części mineralne nawożenie. Biostymulatory, takie jak: hydrolizaty białkowe, ekstrakty z alg, kwasy humusowe i fulwowe oraz środki kontroli biologicznej, w tym inokulanty mikrobiologiczne, zostały szeroko przebadane pod kątem łagodzenia skutków stresu biotycznego i abiotycznego, a także podnoszenia jakości plonów poprzez stymulowanie procesów fizjologicznych roślin. Wykorzystanie biostymulatorów jako związków przyjaznych środowisku i niezagrożających zdrowiu człowieka w celu otrzymania optymalnych plonów różnych gatunków roślin pełni istotną rolę w rozwoju nowoczesnego rolnictwa.

Podziękowania

Przedstawione materiały są częścią międzynarodowego projektu EUREKA/DUO_PLANT_Protect/5/2021. Projekt dofinansowany przez NCBiR w ramach inicjatywy EUREKA w 2020 roku, 02/BCS/22/01/1/2/2019.

Literatura

1. Matyjaszczyk E., *Wprowadzanie biostymulatorów do obrotu handlowego w Polsce. Sytuacja bieżąca i uwarunkowania prawne*, Przemysł Chemiczny, 94(10), 2015, s. 1841-1844.
2. Ustawa z dnia 10 lipca 2007 r. o nawozach i nawożeniu (Dz.U. nr 147, poz.1033, 2007).
3. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414 EWG (Dz.Ur. WE, 24.11.2009).
4. Rutkowska A., *Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin*, Studia i Raporty IUNG-PIB, 48, 2016, s. 65-80.
5. Chmielewska K., *Zmiany profilu białkowego korzenia w liniach populacji mapującej jęczmienia (*Hordeum vulgare L.*) w warunkach niedoboru wody*, rozprawa doktorska, Polska Akademia Nauk, 2015.
6. Pietrzak M., Skiba E., Wolf W.M., *Nanocząstki jako czynnik stresowy dla roślin*, Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski, 2, 2020, s. 59-63.
7. Płażek A., *Reakcje roślin na czynniki stresowe*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 496, 2004, s. 73-83.
8. Grzyś E., *Wpływ wybranych substancji biologicznie czynnych na kukurydzę uprawianą w warunkach stresu*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2012, s.10-15.
9. Złotek U., Wójcik W., *Wybrane aspekty nabywania u roślin odporności typu SAR*, Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia, 6(2), 2007, s. 3-12.
10. Nicpoń S., Szerement J., *Stres, świadomość i inteligencja u roślin*, [w:] *Bioróżnorodność – wybrane zagadnienia*, 2014, s. 48-55.
11. Cieplak M., Okoń S., *Reakcja obronna roślin w odpowiedzi na atak patogenów / Plant defense response to pathogen attack*, [w:] Babicz M., Nowakowicz-Dębek B., *Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa*, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 2021, s.40-46.
12. Wojtasik W., Kulma A., *Odporność roślin na biotyczne czynniki stresowe*, Postępy Biologii Komórki, 43(3), 2016, s. 453-476.
13. Pérez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., López-Climent M.F., Muñoz V., Gómez-Cadenas A., *Biotechnological approaches to study plant responses to stress*, Biomed Research International, 2013.
14. Aroca R., *Plant Responses to Drought Stress*, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg 2012.
15. Rudawska D., Wiśniewska J., Drygaś P., Szyszkowska A., Drygaś B., *Znaczenie glonów brunatnych (*Phaeophyceae*) i ich wpływ na organizmy roślinne i zwierzęce*, Edukacja Biologiczna i Środowiskowa, 2, 2018, s. 3-9.
16. Colla G., Nardi S., Cardarelli M., Ertani A., Lucini L., Canaguier R., Roupheal Y., *Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture*, Scientia Horticulturae, 196, 2015, s. 28-38.
17. Pulz O., Gross W., *Valuable products from biotechnology of microalgae*, Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6), 2004, s. 635-648.
18. Chiaiese P., Corrado G., Colla G., Kyriacou M.C., Roupheal Y., *Renewable sources of plant biostimulation: microalgae as a sustainable means to improve crop performance*, Frontiers in Plant Science, 9(1782), 2018, s. 1-6.
19. González-Pérez B.K., Rivas-Castillo A.M., Valdez-Calderón A., Gayosso-Morales M.A., *Microalgae as biostimulants: a new approach in agriculture*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 38(1), 2022, s. 4.

20. Schroeder G., Messyasz B., Łęska B., Fabrowska J., Pikosz M., Rybak A., *Biomasa alg słodkowodnych surowcem dla przemysłu i rolnictwa*, Przemysł Chemiczny, 92(7), 2013, s. 1380-1384.
21. Matysiak K., Adamczewski K., *Wpływ bioregulatora Kelpak na plonowanie roślin uprawnych*, Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin, 46(2), 2006, s.102-108.
22. Dobrzański A., Anyszka Z., Elkner K., *Reakcja marchwi na ekstrakty pochodzenia naturalnego z alg z rodzaju Sargassum Algaminoplant i z leonardytu – HumiPlant*, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 53(3), 2008, s. 53-58.
23. Matysiak K., Kaczmarek S., Kierzek R., Kardasz P., *Ocena działania ekstraktów z alg morskich oraz mieszaniny kwasów huminowych i fulwowych na kiełkowanie i początkowy wzrost rzepaku ozimego (Brassica napus L.)*, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 55(4), 2010, s. 28-32.
24. Chojnacka K., Saeid A., Michalak I., *The possibilities of the application of algal biomass in the agriculture*, Chemik Science, 66(11), 2012, s. 1235-1248.
25. Prajapati A., Patel C.K., Singh N., Jain S.K., Chongtham S.K., Maheshwari M.N., Patel R.N., *Evaluation of seaweed extract on growth and yield of potato*, Environment & Ecology, 34(2), 2016, s. 605-608.
26. Calvo P., Nelson L., Kloepper J.W., *Agricultural uses of plant biostimulants*, Plant and Soil, 383, 2014, s. 3-41.
27. Popko M., Michalak I., Wilk R., Gramza M., Chojnacka K., Górecki H., *Effect of the new plant growth biostimulants based on amino acids on yield and grain quality of winter wheat*, Molecules, 23(2), 2018, s. 470.
28. Brodalka P., Felisiak K., Szymczak M., *Hydrolizaty białkowe jako źródło biologicznie aktywnych peptydów – otrzymywanie i zastosowanie w przemyśle spożywczym*, KOSMOS, 67(4), 2018, s. 889-894.
29. Pipiak P., Skwarek M., *Zastosowanie nawozów aminokwasowych w rolnictwie*, Technologia i Jakość Wytrobów, 65, 2020, s. 144-157.
30. Schiavon M., Ertani A., Nardi S., *Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in Zea mays L.*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(24), 2008, s. 11800-11808.
31. Ławińska K., Lasoń-Rydel M., Gendaszewska D., Grzesiak E., Sieczyńska K., Gaidau C., Epure D.G., Obraniak A., *Coating of seeds with collagen hydrolysates from leather waste*, Fibres & Textiles in Eastern Europe, 27, 2019, s. 59-64.
32. Baqer H.A., Zeboon N.H., Al-Behadili A.A.J., *The role and importance of amino acids within plants: a review*, Plant Archives, 19, 2019, s. 1402-1410.
33. Koukounararas A., Tsouvaltzis P., Siomos A.S., *Effect of root and foliar application of amino acids on the growth and yield of greenhouse tomato in different fertilization levels*, Journal of Food, Agriculture & Environment, 11, 2013, s. 644-648.
34. Sadak M.S.H., Abdelhamid M.T., Schmidhalter U., *Effect of foliar application of aminoacids on plant yield and some physiological parameters in bean plants irrigated with seawater*, Acta Biologica Colombiana, 20, 2015, s. 141-152.
35. Hammad S.A.R., Ali O.A.M., *Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract*, Annals of Agricultural Sciences, 59(1), 2014, s. 133-145.
36. Botta A., *Enhancing plant tolerance to temperature stress with amino acids: an approach to their mode of action*, Acta Horticulturae, 1009, 2013, s. 29-35.
37. Colla G., Hoagland L., Ruzzi M., Cardarelli M., Bonini P., Canaguier R., Roupheal Y., *Biostimulant action of protein hydrolysates: unraveling their effects on plant physiology and microbiome*, Frontiers in Plant Science, 8(2002), 2017.
38. Wojdyła A.T., Sobolewski J., *Możliwość wykorzystania środków zawierających aminokwasy w ochronie fasoli przed zgnilizną twardzikową*, Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa, 24, 2016, s. 131-140.

39. Pocijowska M., Natywa M., Gałązka A., *Stymulacja wzrostu roślin przez bakterie PGPR*, KOSMOS, 63(4), 2017, s. 603-610.
40. Avis T.J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R.J., *Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity*, Soil Biology and Biochemistry, 40(7), 2008, s. 1733-1740.
41. Rutkowska A., *Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin*, ZESZYTY, 48, 2016, s. 65-80.
42. Dąbrowska G., Zdziechowska E., *Rola bakterii ryzosferowych w stymulacji procesów wzrostu i rozwoju oraz ochronie roślin przed czynnikami środowiska / The role of rhizobacteria in the stimulation of the growth and development processes and protection of plants against environmental factors*, Progress in Plant Protection, 55(4), 2015, s. 498-506.
43. Saharan B.S., Nehra V., *Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review*, Life Science and Medical Research, 21, 2011, s. 1-30.
44. Kanjanasopa D., Aiedhet W., Thitithanakul S., Paungfoo-Lonhienne Ch., *Plant growth promoting Rhizobacteria as biological control agent in rice*, Agricultural Sciences, 12(1), 2021.
45. Kiani M.Z., Ali A., Sultan T., Ahmad R., Hydar S.I., *Plant Growth Promoting Rhizobacteria Having 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Deaminase to Induce Salt Tolerance in Sunflower (Helianthus annuus L.)*, Natural Resources, 6(6), 2015.
46. Rath S., Padhy R.N., *Surveillance of acute community acquired urinary tract bacterial infections*, Journal of Acute Disease, 4(3), 2015, s. 186-195.
47. Mitton B., Rule R., Mbelle N., van Hougenhouck-Tulleken W., Said M., *Post-procedural Bacillus cereus septic arthritis in a patient with systemic lupus erythematosus*, Afr J Lab Med., 9(1), 2020, s. 1119.
48. https://en.wikipedia.org/wiki/Enterobacter_cloacae.
49. Véghe A., Palkovics L., *First Occurrence of Fire Blight on Apricot (Prunus armeniaca) in Hungary*, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 41, 2013, s. 440-443.
50. Dorjey S., Dolkar D., Sharma R., *Plant Growth Promoting Rhizobacteria Pseudomonas: A Review*, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6, 2017, s.1335-1344.
51. Abdul Jaleel C., Manivannan P., Sankar B., Kishorekumar A., Gopi R., Somasundaram R., Panneerselvam R., *Pseudomonas fluorescens enhances biomass yield and ajmalicine production in Catharanthus roseus under water deficit stress*, Colloids Surf. B, 60, 2007, s. 7-11.
52. Sandhga V., Ali S.Z., Grover M., Reddy G., Venkateswarlu B., *Effect of plant growth promoting Pseudomonas spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress*, Plant Growth Regul, 62, 2010, s. 21-30.
53. Jabborova D., Enakiev Y., Sulaymanov K., Kadirova D., Ali A., Annapurna K., *Plant growth promoting bacteria Bacillus subtilis promote growth and physiological parameters of Zingiber officinale Roscoe*, Plant Science Today, 8, 2021, s. 66-71.
54. Hashem A., Tabassum B., Abd_Allah., E.F., *Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress*, Saudi Journal of Biological Sciences, 26(6), 2019, s. 1291-1297.
55. Khalifa A.Y.Z., Alsyeed A.-M., Almalki M.A., Saleh F.A., *Characterization of the plant growth promoting bacterium, Enterobacter cloacae MSRI, isolated from roots of non-nodulating Medicago sativa*, Saudi Journal of Biological Sciences, 23, 2016, s. 79-86.
56. Sagar A., *Enhancement of growth and yield parameters of wheat variety AAI-W6 by an organic farm isolate of plant growth promoting Erwinia species (KP226572)*, International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, New Delhi, 11(1), 2018, s. 159-171.
57. Sas-Paszt L., Trzciniński P., Lisek A., Derkowska E., Sumorok B., Głuszec S., Frąc M., Przybył M., Weszczak K., *Metody polepszania jakości gleb zdegradowanych w uprawie roślin sadowniczych*, Skierniewice 2019.

58. Pikula D., *Wykorzystanie właściwości spektralnych kwasów huminowych do oceny właściwości próchnicy*, Studia i Raporty IUNG-PIB, 56(10), 2018, s. 99-109.
59. Księżopolska A., *Substancje humusowe jako podstawowy składnik życiodajnej ziemi i wody*, Wydawnictwo KUL, Lublin 2019.
60. Pettit R., *Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid, and humin*, The Wonderful World of Humus and Carbon, 2006.
61. El-Bassiouny H.S.M., Bakry B.A., Attia A.A.E.M., Abd Allah M.M., *Physiological role of humic acid and nicotinamide on improving plant growth, yield, and mineral nutrient of wheat (Triticum durum) grown under newly reclaimed sandy soil*, Agric Sci, 5, 2014, s. 687-700.
62. Anjum S.A., Wang L., Farooq M., Xue L., Ali S., *Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions*, Journal of Agronomy and Crop Science, 197, 2011, s. 409-417.
63. Ezzat A.S., Saif Eldeen U.M., Abd El-Hameed A.M., *Effect of irrigation water quantity, antitranspirant and humic acid on growth, yield, nutrients content and water use efficiency of potato (Solanum tuberosum L.)*, J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 34(12), 2017, s. 11585-11603.
64. Gawroński D., *Ograniczenie skutków suszy w uprawach poprzez stosowanie kwasów humusowych i biohumusu*, Zagadnienia Doradztwa Rolniczego, 2(104), 2021, s. 48-59.
65. Augustyniak A., Roszak M., *Zastosowanie mikrobiologii w nowoczesnym rolnictwie*, [w:] *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce – Agronomia i ochrona roślin*, Młodzi Naukowcy, 2017, s. 7-12.
66. Gaj R., Barlog P., Gorski D., Banaszak H., *Wpływ dolistnego stosowania askorbinianu tytanu na plon i jakość korzeni buraka*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 222, 2002, s. 143-147.
67. Zhuk O., Rombel-Bryzek A., *Oddziaływanie kadmu i kwasu salicylowego na aktywność metaboliczną Lepidium sativum L.*, ECOpole'16 Conference, Zakopane 2016, s. 379-388.
68. Raport Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa, <http://data.un.org/> [data dostępu: 5.05.2023].
69. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/uprawy-rolne-i-ogrodnicze/produkcja-upraw-rolnych-i-ogrodniczych-w-2021-roku,9,20.html> [data dostępu: 5.05.2023].

Zastosowanie wybranych biostymulatorów w rolnictwie

Streszczenie

W nowoczesnym rolnictwie coraz częściej poszukuje się środków, które będą stymulować wzrost i rozwój roślin, ale także będą przyczyniać się do zmniejszenia wpływu środowiskowych czynników stresowych w czasie wegetacji. Do środków tych należą biostymulatory roślinne. Pomimo wielu doniesień literaturowych na temat dobrego wpływu preparatów biostymulujących na rośliny wiele aspektów ich działania pozostaje jeszcze nieodkrytych. W pracy scharakteryzowano najbardziej znane grupy biostymulatorów oraz przedstawiono wstępne wyniki badań w ramach międzynarodowego projektu EUREKA.

Słowa kluczowe: biostymulatory, rolnictwo, stymulacja wzrostu

Application of selected biostimulators in agriculture

Abstract

In modern agriculture, agents that will stimulate the growth and development of plants, but also contribute to reducing the impact of environmental stress factors during vegetation, are increasingly sought. One of the types of such agents are plant biostimulants. Despite many literature reports on the beneficial effect of biostimulating preparations on plants, many aspects of their action remain undiscovered. The paper characterizes the most known groups of biostimulators and presents the preliminary results of research under the international EUREKA project.

Keywords: biostimulators, agriculture, growth stimulation

Kapsaicyna, jej wpływ na mikrobiotę i potencjał w terapii chorób przewodu pokarmowego

1. Czym jest kapsaicyna

Kapsaicyna jest związkiem organicznym o charakterze amidu zaliczanym do pochodnych wanililoaminy. Odpowiada za ostry smak owocu papryki ostrej ze względu na oddziaływanie na nocycyptory, które zlokalizowane są m.in. w jamie ustnej. Z racji swoich właściwości kapsaicyna jest składnikiem różnych suplementów diety na odchudzanie, w dawce do 500. Według skali Scoville'a (wprowadzonej w 1912 roku), która określa skalę pikantności danej potrawy, czysta kapsaicyna osiąga wartość 16 000 000 SHU i tym samym klasyfikuje się na trzeciej pozycji [1]. Zarówno pieprz cayenne, jak i owoce papryki chilli stają się coraz popularniejszymi składnikami diety. Szczególnym uznaniem cieszą się w kuchni azjatyckiej i meksykańskiej. Jak wiadomo, kapsaicyna oddziałuje na niezmielinizowane wolne włókna układu nerwowego, co prowadzi do kaszlu [2]. W ostatnich latach wzrasta świadomość tego, jak na funkcjonowanie organizmu wpływa jego mikrobiom, zwłaszcza ten, który zasiedla układ pokarmowy.

Mikrobiotą przewodu pokarmowego nazywamy symbiotyczne drobnoustroje zasiedlające go. Pełnią one różnorodne funkcje: metaboliczną, troficzną i immunologiczną, które często się wzajemnie uzupełniają. Ich rola jest zależna od szczepu mikroorganizmu. Mikrobiota jelitowa człowieka może stanowić siedlisko nawet dla 1500 gatunków bakterii. Czyni to jelita jednym z najbardziej zróżnicowanych gatunkowo ekosystemów. Należy pamiętać, że skład mikrobioty jelitowej jest kwestią indywidualną, na co wpływ może mieć między innymi dieta. Bakterie zasiedlające układ pokarmowy człowieka możemy podzielić na pożyteczne, oportunistyczne oraz chorobotwórcze [3].

2. *Lactobacillus*

2.1. Charakterystyka rodzaju *Lactobacillus*

Bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* są Gram-dodatnimi laseczkami symbiotycznymi. Z ludzkiego mikrobiomu zostały wyizolowane takie gatunki jak: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus reuteri* DSM. Należą one do bakterii kwasu mlekowego, co oznacza, że przeprowadzają reakcje fermentacji węglowodanów z wytworzeniem kwasu mlekowego. Badania wykazały antybakteryjne działanie tej substancji. Wiadomo również, że bakterie te wytwarzają szereg innych substancji wykazujących

¹ akumanowicz@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

² karolina.malczak99@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

³ tyczynska.julia00@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

⁴ joanna_banasiewicz@sggw.edu.pl, Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

właściwości przeciwdrobnoustrojowe, takich jak bakteriocyny. Zaobserwowano antagoni-
styczny wpływ *Lactobacillus* na bakterie patogenne *Helicobacter pylori* oraz *Salmonella*
typhimurium. Laseczki te wykazują adhezję do enterocytów, przez co ograniczają prze-
nikanie drobnoustrojów chorobotwórczych do komórek [4]. Należy jednak pamiętać, że
właściwości te są szeregowo zależne.

2.2. Wpływ kapsaicyny na liczebność *Lactobacillus* i konsekwencje dla zdrowia

Badania przeprowadzone w 2019 roku w Instytucie Żywienia i Bezpieczeństwa
Żywności w Chinach wykazały, że podawanie zdrowym myszom kapsaicyny w dawce
2 mg/kg co drugi dzień przez okres 12 tygodni doprowadziło do wzrostu liczebności
bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a to miało korzystny wpływ na stan zdrowia myszy [5].
Ponadto zauważono wzrost aktywności metabolicznej gatunku *L. acidophilus*, co dopro-
wadziło do zwiększonej produkcji mleczanu przez te bakterie [6]. Natomiast podawanie
kapsaicyny w dawce 0,01% przez okres 8 tygodni samcom myszy chorym na cukrzycę
typu 2 doprowadziło do zmniejszenia liczby *Lactobacillus*. Warto zaznaczyć, że w przy-
padku tego schorzenia obserwuje się znaczny wzrost liczebności tych bakterii. W konse-
kwencji dawało to korzystny wpływ na metabolizm glukozy poprzez zmniejszenie
insulinooporności i poprawę homeostazy glukozy [7]. Można wysnuć wniosek, że wpływ
kapsaicyny na bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zależy od stanu zdrowia organizmu.
Jednakże w obu przypadkach obserwuje się dobroczynne działanie tej substancji.

3. *Roseburia*

3.1. Charakterystyka rodzaju *Roseburia*

Bakterie należące do rodzaju *Roseburia* są Gram-dodatnie, beztlenowe i zasiedlają
ludzką okrężnicę. Szczególną uwagę badaczy skupia *Roseburia intestinalis*. Bakterie
z rodzaju *Roseburia* odgrywają ważną rolę w kontroli procesów zapalnych jelit, łago-
dzeniu miażdżycy i dojrzywaniu układu odpornościowego, głównie poprzez produkcję
maślanu [8]. Powstaje on w procesach fermentacyjnych. Wyniki badań sugerują, że sub-
stancja ta wykazuje również wpływ na metabolizm wątroby. Zwiększa syntezę glikogenu
w wątrobie w takim samym tempie jak w przypadku glukozy [9]. Ponadto wykazano, że
Roseburia spp. jest aktywnie zaangażowana w utrzymanie odporności jelit, wpływa na
ich perystaltykę i właściwości przeciwzapalne. W patologiach takich jak zespół jelita
drażliwego, otyłość, T2D i alergie *Roseburia* spp. może zmieniać różne szlaki metaboliczne
poprzez maślan, który hamuje aktywację NF- κ B lub wpływa na proliferację komórek T.
Ponadto bakterie te mogą być biomarkerem powstawania kamieni żółciowych [10].

3.2. Wpływ kapsaicyny na liczebność *Roseburia* i konsekwencje dla zdrowia

Jak wykazały badania przeprowadzone w 2020 roku w Instytucie Genomiki Stoso-
wanej oraz Katedrze Stomatologii Prewencyjnej w Chinach, podawanie kapsaicyny my-
szom zdrowym oraz myszom cierpiącym na cukrzycę typu 2 w dawkach odpowiednio
8 mg na kilogram masy ciała przez okres 7 dni oraz od 0,01% do 0,02% przez 2 tygodnie
doprowadziło do wzrostu liczebności bakterii z rodzaju *Roseburia* w jelicie, co miało
pozytywny wpływ na kondycję jelit i metabolizm glukozy [11].

4. *Escherichia coli*

4.1. Charakterystyka gatunku *Escherichia coli*

Escherichia coli jest Gram-ujemną, względnie beztlenową, pałeczką należącą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Jej materiał genetyczny składa się z od 1 do 4 identycznych łańcuchów DNA. Podział jej komórek trwa około 20 minut. Gatunek ten możemy podzielić na serotypy ze względu na zróżnicowane budowy antygenów. Antygenami występującymi są: antygen powierzchniowy K, którego występuje 80 wariantów, antygen rzęskowy H posiadający około 50 wariantów oraz antygen somatyczny O, który ma aż 171 wariantów. Dlatego też możemy wyróżnić prawie 200 typów serologicznych drobno-ustroju. Bakteria zasiedla jelito grube u zwierząt stałocieplnych, w tym człowieka. Jej rolą w organizmie człowieka jest uczestnictwo w rozkładaniu pokarmu. Bierze ona również udział w syntezie witaminy K oraz witamin z grupy B. W określonych warunkach *E. coli* może niestety wywoływać choroby układu pokarmowego i moczowego dzięki swoim umiejętnościom przylegania do nabłonka jelit oraz wytwarzania enterotoksyn przez niektóre szczepy [12].

4.2. Wpływ kapsaicyny na liczebność *Escherichia coli* i konsekwencje dla zdrowia

Jak wykazały badania, które zostały zrealizowane w Zakładzie Badawczym Chemii Farmaceutycznej i Biologicznej w Wielkiej Brytanii w 2019 roku, kapsaicyna może hamować wzrost i transfer plazmidów u *E. coli*, dzięki czemu może być wykorzystywana w walce z jej wirulentnymi szczepami [13]. Ponadto eksperymenty przeprowadzone przez Indyjski Instytut Badań Weterynaryjnych, Indyjską Radę Badań Rolniczych – Indyjski Instytut Badań Weterynaryjnych oraz Zachodniobengalski Uniwersytet Nauk o Zwierzętach i Rybołówstwie w 2016 roku pokazują również, że kapsaicyna posiada właściwości antybakteryjne przeciwko szczepom produkującym beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL, ang. *extended spectrum beta-lactamase*; MDR, ang. *multi-drug resistant*). Przedstawione przez naukowców wyniki informują, że przy stężeniu kapsaicyny 2,5 mmol/l żywotność bakterii zmniejszyła się od 20% do 35%, przy stężeniu 7,5 mmol/l żywotność zmniejszyła się o 60%, natomiast przy stężeniu 25 mmol/l żywotność zmniejszyła się tylko do 8%. Aby jednoznacznie potwierdzić wpływ analizowanej substancji, potrzebne są dalsze badania *in vivo* [14].

5. *Helicobacter pylori*

5.1. Charakterystyka gatunku *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori jest Gram-ujemną, nieprzetrwalnikującą, urzęsioną pałeczką zasiedlającą powierzchnię komórek nabłonkowych błony śluzowej żołądka. *H. pylori* wytwarza hydrogenazę, dzięki której jest w stanie utleniać wodór cząsteczkowy wytwarzany przez inne bakterie bytujące w jelicie człowieka, a co za tym idzie – pozyskiwać na tej drodze energię. Bakteria ta jest szczególnie rozpowszechniona w krajach rozwiniętych oraz rozwijających się. Zazwyczaj nie wywołuje żadnych objawów chorobowych, jednak w niektórych przypadkach powoduje wrzody żołądka oraz zapalenie żołądka typu B, które może prowadzić do rozwinięcia się nowotworu [15].

5.2. Wpływ kapsaicyny na liczebność *Helicobacter pylori* i konsekwencje dla zdrowia

Badania przeprowadzone w 2007 roku przez badaczy z Wydziału Chorób Wewnętrznych w Szkole Medycznej na Uniwersytecie Yonsei w Korei wykazały, że kapsaicyna posiada właściwości hamujące wytwarzanie przez komórki żołądka interleukiny 8. Jej wydzielanie jest spowodowane obecnością *H. pylori*, a w konsekwencji zmniejsza to stan zapalny żołądka. Interleukina 8 jest chemokiną prozapalną wytwarzaną w naszym organizmie podczas infekcji. Jej działanie opiera się na pobudzaniu migracji monocytów i neutrofilii oraz stymulacji angiogenezy. Niestety w sytuacjach patogennych jej właściwości pobudzania migracji mogą powodować szybsze rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych, co skutkuje wielonarządowymi przerzutami raka [16]. Dlatego też dzięki właściwościom kapsaicyny możemy przypuszczać, że jest ona w stanie spowolnić rozprzestrzenianie komórek nowotworowych w obrębie żołądka, jak i jego przerzuty do innych tkanek i narządów [15]. Ponadto inne badania *in vitro* wykazały, że kapsaicyna hamowała wzrost *H. pylori* w stężeniu 10 µg/ml, a efekt hamujący był maksymalny przy stężeniu 50 µg/ml [17].

6. Przyszłość badań nad kapsaicyną

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na to, że kapsaicyna wywiera wpływ na mikrobiom przewodu pokarmowego. Efekt, jaki wykazuje, jest zależny od jednostki taksonomicznej bakterii, a także dawki kapsaicyny użytej w eksperymencie. Daje to podstawy do potencjalnego wykorzystania tej substancji w celach medycznych. Jej działanie przeciwko strukturom komórkowym bakterii Gram-ujemnych daje możliwość zastosowania tego związku w walce z bakteriami antybiotykoopornymi. Dalsze badania mogą pozwolić na opracowanie nowej technologii leczenia zatruć pokarmowych bez wykorzystania antybiotyków, które coraz częściej okazują się być nieskuteczne w walce z patogenami, a także ograniczają rozwój flory symbiotycznej. Jak wspomniano wcześniej, kapsaicyna wpływa pozytywnie na liczebność dobroczynnych bakterii, co wskazuje na potencjalne podwójne korzyści z wykorzystania jej w farmakoterapii. Ponadto jej działanie przeciwko wydzielaniu interleukin predysponuje kapsaicynę do praktycznego jej zastosowania jako leku przeciwzapalnego. Warto również wspomnieć o innych właściwościach tego alkaloidu. W badaniach na ludziach stwierdzono, że CAP (kapsaicyna) wykazuje anoreksygeniczne odczucia, takie jak sytość, po dodaniu do diety. Zmniejsza również spożycie pokarmu, tłumi pragnienie jedzenia i głód [18]. Neurony wrażliwe na tę substancję są rozpowszechnione również w układzie sercowo-naczyniowym. Ze względu na jej działanie na receptory zauważono, że obniża ona ciśnienie krwi [19]. Z badań wynika, że kapsaicyna wykazuje również istotne działanie przeciwmiażdżycowe. Wpływa na zmniejszenie magazynowania lipidów i poprawę zmian miażdżycowych w aorcie w mysim modelu [20]. Wszystko to czyni kapsaicynę tym bardziej interesującą substancją i zachęca do dalszych badań.

Podziękowania

Praca została wykonana w ramach działalności Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów „Eza” na Wdziale Biologii i Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod patronatem Pani Doktor Joanny Banasiewicz.

Literatura

1. Chapa-Oliver A.M., Mejía-Teniente L., *Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent*, *Molecules*, 21(8), 2016, s. 931.
2. Millqvist E., Bende M., *Capsaicin cough sensitivity is decreased in smokers*, *Respiratory Medicine*, 95(1), 2001, s. 19-21.
3. Krakowiak O., Nowak R., *Mikroflora przewodu pokarmowego człowieka – znaczenie, rozwój, modyfikacje*, *Post Fitoter*, 3, 2015, s. 193-200.
4. Liévin-Le Moal V., Servin A.L., *Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents*, *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 2014, s. 167-199.
5. Demirbilek S., Ersoy M.O., Demirbilek S., Karaman A., Gürbüz N., Bayraktar N., Bayraktar M., *Small-dose capsaicin reduces systemic inflammatory responses in septic rats*, *Anesth Analg*, 99(5), 2004, s. 1501-1507.
6. Sharma S., Jain S., Nair G.N., Ramachandran S., *Capsicum annum enhances L-lactate production by Lactobacillus acidophilus: implication in curd formation*, *Journal of Dairy Science*, 96(7), 2013, s. 4142-4148.
7. Hui S., Liu Y., Chen M., Wang X., Lang H., Zhou M., Yi L., Mi M., *Capsaicin improves glucose tolerance and insulin sensitivity through modulation of the gut microbiota-bile acid-FXR axis in type 2 diabetic db/db mice*, *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(23), 2019, s. 1900608.
8. La Rosa S.L., Leth M.L., Michalak L., Hansen M.E., Pudlo N.A., Glowacki R., Pereira G., Workman C.T., Arntzen M.Ø., Pope P.B., Martens E.C., Hachem M.A., Westereng B., *The human gut Firmicute Roseburia intestinalis is a primary degrader of dietary β -mannans*, *Nature Communications*, 10(1), 2019, s. 905.
9. Guilloteau P., Martin L., Eeckhaut V., Ducatelle R., Zabielski R., Van Immerseel F., *From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate*, *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 2010, s. 366-384.
10. Falalyeyeva T., Chornenka N., Cherkasova L., Tsyryuk O., Molchek N., Kovalchuk O., Kyriachenko Y., Ostapchenko L., Kobylak N., *Gut microbiota interactions with obesity*, *Comprehensive Gut Microbiota*, 2022, s. 201-219.
11. Wang F., Huang X., Chen Y., Zhang D., Chen D., Chen L., Lin J., *Study on the effect of capsaicin on the intestinal flora through high-throughput sequencing*, *ACS Omega*, 5(2), 2020, s. 1246-1253.
12. Mueller M., Tainter C.R., *Escherichia coli infection*, *StatPearls*, 2023.
13. Oyedemi B.O.M., Kotsia E.M., Stapleton P.D., Gibbons S., *Capsaicin and gingerol analogues inhibit the growth of efflux-multidrug resistant bacteria and R-plasmids conjugial transfer*, *Journal of Ethnopharmacology*, 245, 2019, s. 111871.
14. Kar D., Bandyopadhyay S., Dimri U., Mondal D.B., Nanda P.K., Das A.K., Batabyal S., Dandapat P., Bandyopadhyay S., *Antibacterial effect of silver nanoparticles and capsaicin against MDR-ESBL producing Escherichia coli: An in vitro study*, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(10), 2016, s.807-810.
15. Lee I.O., Lee K.H., Pyo J.H., Kim J.H., Choi Y.J., Lee Y.C., *Anti-inflammatory effect of capsaicin in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells*, *Helicobacter*, 12(5), 2007, s. 510-517.
16. Waugh D.J., Wilson C., *The interleukin-8 pathway in cancer*, *Clinical Cancer Research*, 14(21), 2008, s. 6735-6741.
17. Jones N.L., Shabib S., Sherman P.M., *Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen Helicobacter pylori*, *FEMS Microbiology Letters*, 146(2), 1997, s. 223-227.

18. Yoshioka M., St-Pierre S., Drapeau V., Dionne I., Doucet E., Suzuki M., Tremblay A., *Effects of red pepper on appetite and energy intake*, British Journal of Nutrition, 82(2), 1999, s. 115-123.
19. Zvara Á., Bencsik P., Fodor G., Csont T., Hackler L., Dux M., Fürst S., Jancsó G., Puskás L.G., Ferdinandy P., *Capsaicin-sensitive sensory neurons regulate myocardial function and gene expression pattern of rat hearts: A DNA microarray study*, FASEB J., 20(1), 2006, s. 160-162.
20. Ma L., Zhong J., Zhao Z., Luo Z., Ma S., Sun J., He H., Zhu T., Liu D., Zhu Z., Tepel M., *Activation of TRPV1 reduces vascular lipid accumulation and attenuates atherosclerosis*, Cardiovascular Research, 92(3), 2011, s. 504-513.

Kapsaicyna, jej wpływ na mikrobiotę i potencjał w terapii chorób przewodu pokarmowego

Streszczenie

Kapsaicyna to organiczny związek odpowiadający za ostry smak owocu papryki ostrej oddziałujący na nocyceptory obecne w jamie ustnej. Z przeprowadzonych badań wynika, że kapsaicyna może mieć pewien wpływ na mikrobiotę przewodu pokarmowego człowieka, lecz zakres i skala nie są jeszcze do końca poznane. Częstość spożycia owocu papryki chilli oraz suplementacja diety kapsaicyną wzrasta, dlatego ważne jest dokładniejsze jej zbadanie i określenie oddziaływania na różne aspekty funkcjonowania organizmu. Wyniki badań *in vitro* sugerują m.in., że kapsaicyna ma wpływ na hamowanie wzrostu i transferu plazmidów u *Escherichia coli*, co może przynieść korzystne skutki w walce z wirulentnymi postaciami tych bakterii. Wskazują również na wzrost liczebności i aktywności bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, które stanowią naturalny element mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka, gdzie przeprowadzają np. fermentację laktozy do kwasu mlekowego, który ogranicza wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych, jak również odpowiadają za wytwarzanie innych substancji hamujących rozwój bakterii patogennych.

Celem przygotowania niniejszej pracy przeglądowej była analiza wpływu danych stężeń kapsaicyny na bakterie należące do mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem szczepów probiotycznych m.in. z rodzaju *Lactobacillus* oraz zaklasyfikowanych do tzw. bakterii grupy *coli*, w tym do gatunku *E. coli*, w oparciu o aktualne dane literaturowe. Głównym założeniem przeglądu prowadzonych dotychczas badań było prześledzenie wyników świadczących o przeciwbakteryjnym działaniu kapsaicyny na wybrane szczepy bakterii potencjalnie patogennych oraz działaniu stymulującym na szczepy znane ze swoich probiotycznych właściwości. Naszą intencją była weryfikacja rezultatów badań wielu naukowców, jak mogą przyczynić się do wzrostu świadomości wykorzystania niskich dawek kapsaicyny w walce przeciwko otyłości, hiperglikemii oraz potencjalnego wykorzystania jej w przypadku zakażenia szkodliwymi szczepami *E. coli* i innymi bakteriami Gram-ujemnymi ze względu na jej potencjalne działanie przeciwko bakteryjnemu LPS (lipopolisacharyd).

Słowa kluczowe: medycyna, mikrobiologia, mikrobiom

Capsaicin, its effects on the microbiota and its potential in the treatment of gastrointestinal diseases

Abstract

Capsaicin is the organic compound responsible for the spicy taste of peppers, acting on nociceptors present in the mouth. Research suggests that capsaicin may have some effect on the microbiota of the human gastrointestinal tract, but the extent and scale are not yet fully understood. The frequency of chili bell pepper consumption and capsaicin supplementation is on the rise, so it is important to study it more closely and determine its effects on various aspects of body function. Among other things, *in vitro* studies suggest that capsaicin has the effect of inhibiting growth and plasmid transfer in *Escherichia coli*, which may have beneficial effects against virulent forms of these bacteria. They also indicate an increase in the number and activity of bacteria of the genus *Lactobacillus*, which are a natural part of the microbiota of the human gastrointestinal tract, where they carry out, for example, the fermentation of lactose into lactic acid, which limits the growth of pathogenic microorganisms, as well as being responsible for the production of other substances that inhibit the growth of pathogenic bacteria.

The purpose of preparing this review paper was to analyze the effect of given concentrations of capsaicin on bacteria belonging to the microbiota of the human gastrointestinal tract, with particular emphasis on probiotic strains of the genus *Lactobacillus*, among others, and those classified as so-called coliforms, including the species *E. coli*, based on current literature data. The main objective of the review of the studies conducted so far was to trace the results demonstrating the antimicrobial effect of capsaicin on selected strains of potentially pathogenic bacteria and the stimulatory effect on strains known for their probiotic properties. Our intention was to verify the results of the studies of many scientists, as well as may contribute to the awareness of the use of low doses of capsaicin in the fight against obesity, hyperglycemia and its potential use in the case of infection with harmful strains of *E. coli* and other Gram-negative bacteria due to its potential action against bacterial LPS (lipopolysaccharide).

Keywords: medicine, microbiology, microbiome

Indeks Autorów

Adrian E.....	132
Andrzejewska J.....	132
Bajguz A.....	24
Banasiewicz J.....	232
Błachowiak S.....	16
Boruszko D.....	124
Chłopecka M.....	24
Chwałowska M.....	81
Dziuba K.....	183
Fajdek-Bieda A.....	108
Gendaszewska D.....	214
Goździalska A.....	145
Jafernik K.....	145
Jankowska M.....	202
Jaros K.....	7
Jędrzejczyk I.....	132
Kaczmarek K.....	16
Kolisz M.....	145
Kowalski M.....	170
Kumanowicz A.....	232
Łozowicka B.....	202
Małczak K.....	232
Mazurek K.....	36, 69
Miszczuk E.....	24
Miśkiewicz K.....	214
Nawara M.....	94
Nurzyńska A.....	94
Pastuch-Gawołek G.....	45
Pierzchała E.....	36, 69
Pilawa B.....	81
Piotrowska A.....	124
Płyngawko J.....	145
Szwaczko K.....	170, 183
Tarasiewicz A.....	16
Tyczyńska J.....	232
Wieczorek D.....	214
Wolski K.....	45
Wójcik M.....	7
Wróblewska A.....	108
Zdybel M.....	81