

14.02.2022r.

mgr farm. Marta Mainka

tytuł rozprawy doktorskiej:

**”Wybrane substancje roślinne stosowane w schorzeniach skóry - ocena składu oraz potencjalnej aktywności przeciwzapalnej na modelach bezkomórkowych i komórkowych”**

### **Streszczenie**

Skóra jest główną barierą chroniącą ludzkie ciało przed patogenami, dlatego też po uszkodzeniu skóry szybkie zamknięcie rany i regeneracja są kluczowe dla przywrócenia funkcji ochronnej. Jednak w dobie wzrastającej liczby osób cierpiących na cukrzycę, otyłość i choroby autoimmunologiczne, w przypadku utraty homeostazy oraz osłabionej odpowiedzi ze strony wrodzonego układu odpornościowego z jednoczesnym przedłużeniem się stanu zapalnego, normalny proces gojenia się ran może być utrudniony. Tradycyjnie w schorzeniach skóry od wieków stosowane są preparaty roślinne, jednakże ich działanie nie zostało dostatecznie udokumentowane.

Celem niniejszej pracy było zbadanie na modelach bezkomórkowych aktywności przeciwzapalnej i przeciwutleniającej wyciągów wodnych i 70% etanolowych z wybranych substancji roślinnych tradycyjnie stosowanych w schorzeniach skóry, a następnie wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych. W celu zbadania ich potencjalnego wpływu na proces gojenia rany analizowano modulowanie odpowiedzi zapalnej komórek układu odpornościowego, neutrofilii ludzkich, jak również komórek zaangażowanych w odbudowę naskórka, keratynocytów. Niemniej istotne było określenie składu chemicznego wyciągów.

Badania podzielono na trzy etapy, podczas których z 13 substancji roślinnych wyselekcjonowanych na podstawie badań literaturowych t.j. z ziela *Achillea millefolium* L., liści i korzeni *Arctium lappa* L., liści i korzeni *Arctium minus* (Hill) Bernh., kwiatów *Calendula officinalis* L., kwiatów *Centaurea cyanus* L., ziela *Galium aparine* L., ziela *Viola tricolor* L., ziela *Thymus serpyllum* L., ziela *Taraxacum officinale* F.H. Wigg., ziela *Urtica dioica* L. i liści *Sambucus nigra* L. przygotowano ekstrakty wodne i 70% etanolowe. W pierwszym etapie badań oznaczono właściwości przeciwutleniające określając zdolności wyciągów do wymiatania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowego (DPPH), nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i anionu ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) oraz wpływu wyciągów na aktywność enzymów: hialuronidazy i lipooksygenazy w układach bezkomórkowych. Do badań *in vitro* zostały wykorzystane metody opierające się na pomiarach fluorescencji, chemiluminescencji,

spektrofotometrycznych

i turbidymetrycznych. Następnie, najbardziej aktywne, wyciągi wodne i etanolowe z ziela macierzanki piaskowej, ziela krwawnika pospolitego oraz liści łopianu większego były badane w układzie komórkowym przy użyciu neutrofilii. Wpływ wyciągów na wydzielanie cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8) był oceniany przy użyciu testów immunoenzymatycznych. Ponadto w celu oceny wpływu wyciągów na produkcję/wymiatanie reaktywnych form tlenu (RFT) mierzone były zmiany chemiluminescencji luminolu. Potencjalną cytotoksyczność wyciągów badano przez barwienie jodkiem propidyny, w teście MTT oraz teście NRU. Po analizie otrzymanych wyników wybrane do fazy końcowej wodne wyciągi z wyżej wymienionych gatunków przebadane były na linii komórkowej ludzkich keratynocytów HaCaT pod kątem ich wpływu na wydzielanie mediatorów stanu zapalnego (np. IL-6, IL-8) oraz proces gojenia się ran (ang. *scratch assay test*). Ostatnim etapem badań było wykonanie jakościowej i ilościowej analizy fitochemicznej wybranych wyciągów metodami chromatograficznymi, takimi jak UHPLC-DAD-MS/MS, a sumę polifenoli we wszystkich badanych ekstraktach oznaczono metodą kolorymetryczną z odczynnikiem Folin'a-Ciocalteu.

Wpływ ekstraktów na aktywność enzymów był znacznie mniejszy niż ich aktywność antyoksydacyjna. Wszystkie ekstrakty wykazały wysoką zdolność do wymiatania DPPH. Wyciąg etanolowy z ziela macierzanki piaskowej najefektywniej spośród badanych wymiatał anionorodnik ponadtlenkowy. Natomiast wszystkie badane ekstrakty etanolowe wykazały wysoki potencjał wymiatania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. W kolejnych etapach badań testowano wodne i 70-procentowe etanolowe wyciągi z ziela macierzanki piaskowej, ziela krwawnika pospolitego i liści łopianu większego. Przeprowadzone badania wykazały, że testowane ekstrakty wywoływały nadprodukcję IL-6 oraz IL-8, a jedynie 70% etanolowy ekstrakt z liści łopianu większego zmniejszał wydzielanie IL-1 $\beta$ . Z kolei wszystkie z nich zmniejszały wydzielanie IL-6 i IL-8 przez keratynocyty linii HaCaT stymulowane za pomocą promieniowania UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>). W teście leczenia ran wodne wyciągi z ziela krwawnika pospolitego i liści łopianu większego zwiększały proliferację/migrację ludzkich keratynocytów HaCaT w porównaniu z kontrolą negatywną. Analiza fitochemiczna wykazała, że głównymi składnikami badanych ekstraktów były flawonoidy, takie jak luteolina, apigenina, kemferol, kwercetyna i ich pochodne, a także kwasy kawoilochinowe, kwas kawowy i jego koniugaty.

Podsumowując, testowane wyciągi mogą wspomagać gojenie się ran oraz terapię stanów zapalnych skóry poprzez zwiększanie proliferacji/migracji ludzkich keratynocytów HaCaT, działanie przeciwutleniające oraz modulując stan zapalny.