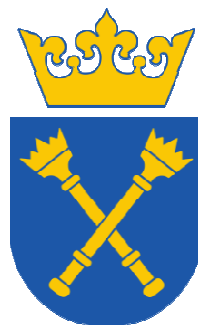


UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI

COLLEGIUM MEDICUM

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Zakład Biochemii Farmaceutycznej



***Ocena aktywności biologicznej in vitro
wyciągów z wąkroty azjatyckiej***

Magdalena Wyszowska-Kolatko

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Pękała

Promotor pomocniczy: dr Paulina Koczurkiewicz

Kraków, 2019

Serdecznie dziękuję Pani Promotor mojej pracy doktorskiej

prof. dr hab. Elżbiecie Pękali

*za życzliwość, poświęcony czas, wszechstronną pomoc oraz cenne wskazówki
w trakcie realizacji niniejszej pracy.*

Serdecznie dziękuję Pani Promotor pomocniczej mojej pracy doktorskiej

dr Paulinie Koczurkiewicz

*za cierpliwość, poświęcony czas, wszelką pomoc
w trakcie realizacji prac badawczych oraz pisania pracy doktorskiej,
a także za wieloletnią owocną współpracę.*

Składam najserdeczniejsze podziękowania,

Pani dr Ewie Skrzypczak-Pietraszek z Katedry Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za współpracę, przekazanie wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej do badań, prowadzonych w ramach pracy doktorskiej oraz cenne uwagi merytoryczne.

Panu prof. dr hab. Henrykowi Maronie oraz **Pani dr hab. Annie Waszkielewicz** z Zakładu Chemii Bioorganicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za umożliwienie prowadzenia badań mikrobiologicznych w Pracowni Chemii Kosmetycznej.

Panu prof. dr hab. Zbigniewowi Madej, **Pani dr hab. Marcie Michalik**, **Panu dr Sławomirowi Lasocie** oraz **Pani mgr Marii Tylce** z Zakładu Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego za poświęcony czas, pomoc i umożliwienie prowadzenia badań nad aktywnością migracyjną.

Pani dr Karolinie Słoczyńskiej za wieloletnią współpracę naukową, życzliwość i pomoc przy prowadzeniu badań mikrobiologicznych.

Pani dr Katarzynie Wójcik-Pszczole za wieloletnią, owocną współpracę.

Pani mgr Justynie Popiół za poświęcony czas, nieocenioną pomoc i owocną współpracę podczas wspólnych prac badawczych.

Pani mgr Katarzynie Kłaś za poświęcony czas, ogromną życzliwość i pomoc przy przeprowadzeniu badań nad aktywnością glioprotekcyjną.

Pani mgr Marii Kani za ciepłe słowa i nieocenioną pomoc, dzięki której wszystkie dokumenty i podpisy zawsze były złożone w odpowiednim miejscu i czasie. Marysiu, dziękuję!

Pani mgr Katarzynie Pańczyk za pomoc przy przeprowadzeniu testu Ames.

Panu mgr Kamilowi Pisce za wieloletnią współpracę i cenne dyskusje nie tylko naukowe.

Koleżankom i Kolegom Doktorantom za wspólnie spędzony czas oraz za prowadzone dyskusje naukowe i nie tylko.

*Z całego serca dziękuję mojemu **Mężowi Pawłowi** za to, że zawsze we mnie wierzy
i wspiera w realizacji wszystkich moich planów.*

*Dziękuję moim **Rodzicom – Lucynie i Adamowi** oraz **Siostrze Marcie**,
za wsparcie, pomoc w opiece nad Kubusiem i dobre słowo
w trakcie pisania pracy doktorskiej.*

***Pracę doktorską poświęcam wszystkim Kobietom.
Kobietom Nauki, Kobietom Matkom, Kobietom pełnym pasji i marzeń.
Każdej Kobiecie, bez wyjątku.
Tylko My wiemy, jaka drzemie w Nas siła!***

Spis treści

Streszczenie	11
Abstract.....	13
Wykaz stosowanych skrótów	15
I.Wstęp.....	20
1. Morfologia, występowanie i skład chemiczny <i>Centella asiatica</i>	21
2. Właściwości terapeutyczne wyciągów z wąkroty azjatyckiej i jej składników aktywnych wykorzystywanych w preparatach kosmetycznych i dermatologicznych	27
2.1. Przenikanie przez skórę i biodostępność ekstraktów z <i>C. asiatica</i>	28
2.2. Profil alergologiczny i toksykologiczny ekstraktów z wąkroty azjatyckiej i jej składników aktywnych	30
2.3. Aktywność antycellulitowa i wpływ na mikrokrążenie skórne	37
2.4. Wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej na rozstępy skórne.....	40
2.5. Właściwości anti-aging wyciągów z wąkroty azjatyckiej.....	42
2.6. Wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej na gojenie się ran.....	48
2.7. Aktywność antyoksydacyjna wyciągów z wąkroty azjatyckiej	55
II.Założenia i cel pracy.....	57
III.Materiały i metody	62
1. Materiały	63
1.1. Badane wyciągi.....	63
1.2. Linie komórek eukariotycznych	63
1.3. Szczepy bakteryjne	64
1.4. Odczynniki i materiały	64
1.5. Hodowla komórek eukariotycznych.....	67
1.6. Hodowle mikrobiologiczne.....	67
1.7. Roztwory podstawowe i robocze.....	68
1.8. Przygotowanie buforów i roztworów	76

1.9. Podłoża mikrobiologiczne	79
2. Metodyka badań	80
2.1. Test redukcji soli tetrazolowej do formazanu (MTT)	80
2.2. Badanie glioprotekcji przy użyciu testu MTT.....	82
2.3. Test oceniający aktywność endocytarną komórek (z czerwienią obojętną) ..	83
2.4. Test z fioletem krystalicznym.....	84
2.5. Badanie wpływu wyciągów na ruch kolektywny komórek HaCaT.....	85
2.6. Testy aktywności antyoksydacyjnej	86
2.7. Test Ames.....	90
2.8. Test aktywności fotoprotekcyjnej.....	92
2.9. Analiza statystyczna.....	93
IV.Wyniki	94
1. Aktywność wyciągów i saponin względem komórek prawidłowych.....	97
1.1. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek skóry właściwej – fibroblastów (BJ-5ta).....	97
1.2. Badanie wpływu wyciągów i saponin na aktywność proliferacyjną komórek skóry właściwej – fibroblastów (BJ-5ta)	99
1.3. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek naskórka – keratynocytów (HaCaT).....	101
1.4. Badanie wpływu wyciągów i saponin na aktywność proliferacyjną komórek naskórka – keratynocytów (HaCaT)	103
1.5. Badanie wpływu wyciągów i saponin na ruch kolektywny komórek naskórka – keratynocytów (HaCaT) w modelu zarastania rany <i>in vitro</i>	105
1.6. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek glejowych – astrocytów (C8D1A).....	107
1.7. Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek glejowych – astrocytów (C8D1A).....	109
1.8. Wpływ wyciągów i saponin na aktywność glioprotekcyjną.....	111

2.	Aktywność wyciągów i saponin względem komórek nowotworowych.....	115
2.1.	Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek czerniaka skóry (A375).....	115
2.2.	Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek czerniaka skóry (A375)	118
2.3.	Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek czerniaka (WM793).....	120
2.4.	Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek czerniaka (WM793).....	122
2.5.	Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek nowotworowych wątroby – hepatocytów (HepG2)	124
2.6.	Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek nowotworowych wątroby – hepatocytów (HepG2)	127
3.	Badanie wpływu wyciągów i saponin na aktywność antyoksydacyjną.....	128
3.1.	Zdolność wyciągów i saponin do dezaktywacji wolnych rodników – test DPPH.....	128
3.2.	Zdolność wyciągów i saponin do redukcji jonów Fe(III) – test FRAP....	130
3.3.	Wpływ wyciągów na poziom reaktywnych form tlenu w hodowli komórek linii BJ-5ta i HepG2 – test ROS-Glo H ₂ O ₂	131
4.	Badanie aktywności mutagennej wyciągów – test Ames.....	133
5.	Zdolność wyciągów i saponin do absorpcji promieniowania UV.....	135
V.	Dyskusja	136
1.	Aktywność wyciągów i saponin względem komórek prawidłowych.....	139
2.	Aktywność wyciągów i saponin względem komórek nowotworowych.....	147
3.	Aktywność antyoksydacyjna wyciągów i saponin	152
4.	Aktywność mutagenna wyciągów – test Ames	156
5.	Aktywność fotoprotekcyjna wyciągów i saponin	157
6.	Aktywność wyciągów i saponin rozjaśniająca przebarwienia	158

VI.Podsumowanie i wnioski końcowe.....	160
VII.Literatura.....	163
VIII.Spis tabel i rycin	173

Streszczenie

Światowa Organizacja Zdrowia określiła wąkrotę azjatycką jako jedną z najważniejszych na świecie roślin leczniczych. Zainteresowanie ekstraktami z wąkroty azjatyckiej obserwuje się również w przemyśle kosmetycznym. Ogromna popularność ekstraktów z wąkroty azjatyckiej oraz wyizolowanych z niej składników aktywnych skutkuje tym, że roślina w stanie naturalnym jest zagrożona wyginięciem. Metodą alternatywną wykorzystywaną do pozyskiwania dużej ilości biomasy z wąkroty azjatyckiej, w celu otrzymywania z niej ekstraktów, jak również składników aktywnych są hodowle roślinne kultur *in vitro*.

Projekt realizowany w ramach pracy doktorskiej obejmuje badania aktywności biologicznej i bezpieczeństwa stosowania dwóch wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej otrzymanych z rośliny pochodzącej ze stanowiska szklarniowego (CA1) i z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2), których aktywność nie została do tej pory oceniona. Wyciągi roślinne są mieszaniną wielu różnych związków aktywnych biologicznie, nierzadko wykazujących działanie synergistyczne lub antagonistyczne. Dlatego, w ramach pracy doktorskiej postanowiono sprawdzić, czy działanie biologiczne wyciągów jest uzależnione od obecności dwóch, oznaczonych w nich składników aktywnych, azjatykozydu i madekasozydu.

W ramach pracy doktorskiej oceniono wpływ testowanych wodnych wyciągów z wąkroty azjatyckiej na żywotność i proliferację komórek 3 linii prawidłowych (HaCaT, BJ-5ta, C8D1A) i 3 linii nowotworowych (A375, WM793, HepG2) przy użyciu testów MTT, testu z czerwienią obojętną i testu z fioletem krystalicznym. Zbadano również słabo do tej pory poznaną aktywność glioprotekcyjną testowanych wyciągów, azjatykozydu i madekasozydu. W celu oszacowania potencjału mutagennego wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej objęte projektem badano w teście Ames, wykorzystując szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 stosowane w rutynowych badaniach screeningowych mutagenności. Do oceny potencjału antyoksydacyjnego wykorzystano testy kolorymetryczne (DPPH i FRAP) oraz dokonano analizy wpływu badanych wyciągów na poziom reaktywnych form tlenu w hodowli komórek fibroblastów i hepatocytów (test ROS-Glo H₂O₂). Ze względu na bardzo słabo poznaną aktywność fotoprotekcyjną wyciągów z wąkroty azjatyckiej, wykonano analizę spektralną w zakresie UV.

Niezależne testy żywotności i wpływu na proliferację wykazały, że obydwie testowane wodne wyciągi z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2) są bezpieczne w stosunku do prawidłowych komórek skóry (keratynocytów i fibroblastów) oraz hepatocytów, wykazały działanie glioprotekcyjne oraz były pozbawione aktywności mutagennej. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na ocenę potencjalnej aktywności biologicznej badanych ekstraktów. Obydwie testowane wyciągi charakteryzowały się działaniem antyoksydacyjnym i fotoprotekcyjnym. Ekstrakt z rośliny szklarniowej wykazywał dodatkowo działanie przeciwstarzeniowe. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek czerniaka wykazały, że ekstrakt z rośliny *in vitro* (CA2) i azjatykozyd działały chemoprewencyjnie, a ekstrakt z rośliny szklarniowej (CA1) oraz obie saponiny działały cytostatycznie w stosunku do komórek nowotworowych czerniaka skóry (A375).

Analiza wyników pozwoliła zdefiniować madekasozyd jako składnik o bardzo silnej aktywności przeciwstarzeniowej, przeciwłuszczycowej, a także cytostatycznej w stosunku do komórek czerniaka linii A375. Wyniki dotyczące madekasozydu stanowią ogromną wartość naukową, ponieważ właściwości tego składnika nie zostały opisane w literaturze tak dokładnie jak właściwości azjatykozydu.

Uzyskane wyniki mają charakter aplikacyjny, przyczyniły się do poszerzenia wiedzy o aktywności rośliny *Centella asiatica*, pozwoliły po raz pierwszy wykazać działania wyciągów CA1 i CA2, porównać aktywność wyciągów otrzymanych z roślin z hodowli szklarniowej i z hodowli *in vitro*, a także po raz pierwszy wyłoniły madekasozyd jako składnik ekstraktów z wąkroty azjatyckiej o bardzo silnej, korzystnej aktywności biologicznej.

Słowa kluczowe: Wąkrota azjatycka, aktywność biologiczna, bezpieczeństwo stosowania, testy alternatywne, hodowle komórek skóry.

Abstract

The World Health Organization has described the *Centella asiatica* plant as one of the world's most important medicinal plant. The huge interests of *Centella asiatica* extracts is also observed in the cosmetic industry. The great popularity of active ingredients and extracts obtained from *Centella asiatica* results in the fact that the plant is in danger of extinction in its natural state. *In vitro* plant cultures is an alternative method used to obtain a large amount of *Centella asiatica* biomass as well as the extracts and biologically active ingredients of the plant.

The project conducted within the doctoral thesis applied research on the biological activity and the safety of use two water extracts from the *Centella asiatica* obtained from a greenhouse plant (CA1) and an *in vitro* culture plant (CA2), the activity of which has not been evaluated so far. Plant extracts are a mixture of various biologically active compounds which often have a synergistic or antagonistic effect. Therefore, as part of the doctoral thesis, it was decided to check whether the individual biological activities of the extracts depend on the two active ingredients: asiaticoside and madecassoside.

An extensive part of the doctoral dissertation has been made using cell cultures, including skin cells - fibroblasts (BJ-5ta) and keratinocytes (HaCaT), melanoma cells (A375 and WM793), liver cells - hepatocytes (HepG2) and nerve cells - astrocytes (C8D1A). The effect of the tested extracts, asiaticoside and madecassoside on the viability (MTT test and neutral red uptake test) and proliferation (crystal violet staining test) of the cells of all lines were evaluated. As part of the doctoral dissertation, very poorly understood glioprotective activity of tested extracts, asiaticoside and madecassoside was determined. In order to estimate the mutagenic potential, water extracts from the *Centella asiatica* included in the project were tested in the Ames test using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 used in routine screening mutagenicity studies. To assess the antioxidant potential, colorimetric tests (DPPH and FRAP) were used and the effect of the tested extracts on the level of reactive oxygen species in the cell culture of fibroblast cells and hepatocytes was measured (ROS-Glo H₂O₂ test). Due to the very poorly understood photoprotection activity of the *Centella asiatica* extracts, spectra of UV absorption of tested compounds were performed.

Independent viability and proliferation test showed that both tested water *Centella asiatica* extracts (CA1, CA2) were safe in relation to normal skin cells

(keratinocytes and fibroblasts) and hepatocytes, had also a glioprotective effect and were free from mutagenic properties. Analysis of the obtained results allowed us to assess the potential biological activity of the extracts. Both tested extracts showed antioxidant and photoprotective effects. Greenhouse plant extract was additionally a potential anti-aging agent. Analyzes carried out using melanoma A375 cell line, made it possible to assess that the *in vitro* plant extract (CA2) and asiaticoside showed chemopreventive effect, and the extract from the greenhouse plant (CA1) and both tested saponins had cytostatic effect in relation to this cell line.

Based on the obtained results we were able to define madecassoside as a component with a very strong anti-aging, antipsoriatic and also cytostatic activity in relation to A375 melanoma cells. The results obtained for the madecassoside constitute the great scientific value, because the properties of this ingredient have not been described in the literature as accurately as the properties of asiaticoside.

The obtained results are very applicable. They allow to broaden knowledge about the *Centella asiatica* activity, for the first time they allow us to assess the biological activity of the CA1 and CA2 extracts obtained from the greenhouse and *in vitro* culture plant. Moreover, obtained results let us to emerge madecassoside as an *Centella asiatica* ingredient with a very strong, beneficial biological activity.

Key words: *Centella asiatica*, biological activity, safety of use, alternative methods, skin cell cultures,

Wykaz stosowanych skrótów

3R	<i>ang. Reduction, replacement, refinement</i>	Zmniejszenie, zastąpienie, doskonalenie
A375	<i>ang. Melanoma malignant skin cell line</i>	Linia ludzkich komórek czerniaka skóry
A549	<i>ang. Human lung carcinoma cell line</i>	Linia komórek ludzkiego raka płuc
AA	<i>ang. Ascorbic acid</i>	Kwas askorbinowy
aHDFs	<i>ang. Human dermal fibroblasts</i>	Linia ludzkich komórek fibroblastów
aNHEKs	<i>ang. Normal human epidermal keartinocytes</i>	Linia ludzkich komórek keratynocytów
AS	<i>ang. Sodium azide</i>	Azydek sodu
AZJ	<i>ang. Asiaticosside</i>	Azjatykozyd
B16F10	<i>ang. Mus musculus skin melanoma cell line</i>	Linia mysich komórek czerniaka
BA	<i>ang. Bottom agar</i>	Podłoże minimalne
BAP	<i>ang. 6-benzyloaminopurine</i>	6-benzyloaminopuryna
BJ-5ta	<i>ang. Human foreskin fibroblasts cell line</i>	Linia komórek fibroblastów skóry ludzkiej
C8D1A	<i>ang. Mus musculus brain astrocytes cell line</i>	Linia komórek mysich astrocytów
CA	<i>Centella asiatica</i>	Wąkrota azjatycka
CA1	<i>ang. Centella asiatica greenhouse plant extract</i>	Wyciąg wodny z wąkroty azjatyckiej otrzymany z rośliny szklarniowej
CA2	<i>ang. Centella asiatica in vitro plant extract</i>	Wyciąg wodny z wąkroty azjatyckiej otrzymany z rośliny z hodowli in vitro
cAMP	<i>ang. Cyclic adenosine monophosphate</i>	Cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan

CATF	<i>ang. Centella asiatica total terpenic fraction</i>	Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej zawierający całkowitą frakcję terpenową
CPA	<i>ang. Cyproterone acetate</i>	Octan cyproteronu
CRY	<i>ang. Octocrylene</i>	Oktokrylen
CYP		Izoenzymy cytochromu P450
DLA	<i>ang. Dalton's lymphoma ascites tumor cells</i>	
DMSO	<i>ang. Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetylosulfotlenek
DOX	<i>ang. Doksorubicin</i>	Doksorubicyna
DPPH	<i>ang. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>	(1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl)
Dz.U.		Dziennik Urzędowy Komisji Europejskiej
EAC	<i>ang. Ehrlich ascites tumor cells</i>	
ETCA	<i>wł. Estratto Titolato di Centella asiatica</i>	Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej
FGF	<i>ang. Fibroblast growth factor</i>	Czynnik wzrostu fibroblastów
FRAP	<i>ang. Ferric reducing antioxidant power</i>	Zdolność do redukcji jonów żelaza
GA-3	<i>ang. Giberellic acid</i>	Kwas giberelinowy
HaCaT	<i>ang. Adult human skin keratinocytes cell line</i>	Linia komórek keratynocytów skóry ludzkiej
HBL-100	<i>ang. Human mammary gland adenocarcinoma cell line</i>	Linia ludzkich komórek nowotworowych sutka
hBMECs	<i>ang. Human Brain Microvascular Endothelial Cells</i>	Linia komórek śródbłonna mózgu ludzkiego
HeLa	<i>ang. Human cervix adenocarcinoma cell line</i>	Linia ludzkich komórek raka szyjki macicy
HepG2	<i>ang. Human hepatocellular carcinoma cell line</i>	Linia komórek ludzkich wątroby
INCI	<i>ang. International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>	Międzynarodowe nazwy składników stosowanych w kosmetyce

KT		Kwasy tłuszczowe
MAD	<i>ang. Madecassoside</i>	Madekasozyd
MC65	<i>ang. Human neuroblastoma cell line</i>	Linia komórek nerwiaka zarodkowego
MC65	<i>ang. Transformed human neuroblastoma cell line</i>	Linia komórkowa ludzkiej neuroblastomy
MCF-7	<i>ang. Human mammary gland adenocarcinoma cell line</i>	Linia ludzkich komórek nowotworowych sutka
MDA-231	<i>ang. Human mammary gland adenocarcinoma cell line</i>	Linia ludzkich komórek nowotworowych sutka
MI	<i>ang. Mutagenic index</i>	Współczynnik mutagenności
MK-1		Linia ludzkich komórek gruczolakoraka żołądka
MMP	<i>ang. Matrix metalloproteinase</i>	Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
MPTP	<i>ang. Mitochondrial permeability transition pore</i>	Pory zmiany przepuszczalności mitochondrialnej
MTT	<i>ang. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>	sól tetrazolowa (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy)
NAA	<i>ang. α-naphthylacetic acid</i>	Kwas α -naftalenoctowy
NKT		Nienasycone kwasy tłuszczowe
NQNO	<i>ang. 4-nitroquinoline N-oxide</i>	N-tlenek-4-nitrochinoliny
OD₆₀₀	<i>ang. Optical density</i>	Gęstość optyczna hodowli przy długości fali 600 nm
OVCAR-3	<i>ang. Human ovary adenocarcinoma</i>	Linia ludzkich komórek raka jajnika
PBS	<i>ang. Phosphate-buffered saline</i>	Roztwór soli fizjologicznej
PC-3	<i>ang. Human prostate cancer cell line</i>	Linia ludzkich komórek raka prostaty
RCE	<i>ang. Rabbit corneal epithelial cells</i>	Królicze komórki nabłonka warstwy rogowej

RE		Linia ludzkich komórek nabłonka oddechowego
ROS	<i>ang. Reactive oxygen species</i>	Reaktywne formy tlenu
SD	<i>ang. Standard deviation</i>	Odchylenie standardowe
SHSY-5Y	<i>ang. Human neuroblastoma cell line</i>	Linia komórek nerwiaka zarodkowego pochodnych ze szpiku kostnego
SK-MEL-2	<i>ang. Human skin melanoma malignant cell line</i>	Linia komórek ludzkich czerniaka
SKOV3	<i>ang. Human ovary adenocarcinoma</i>	Linia ludzkich komórek raka jajnika
SMMC-77	<i>ang. Human lung carcinoma</i>	Linia komórek nowotworowych wątroby
SW480	<i>ang. Human colorectal adenocarcinoma cell line</i>	Linia komórek raka okrężnicy
TA	<i>ang. Top agar</i>	Agar powierzchniowy
TA100	<i>ang. Salmonella typhimurium Tester Strain for Ames Test</i>	Szczep testowy bakterii Salmonella typhimurium
TA98	<i>ang. Salmonella typhimurium Tester Strain for Ames Test</i>	Szczep testowy bakterii Salmonella typhimurium
TE	<i>ang. Trolox</i>	Troloks
TECA	<i>ang. titrated extract of Centella asiatica</i>	Miareczkowany ekstrakt z wąkroty azjatyckiej
TGF-β	<i>ang. Transforming growth factor</i>	Transformujący czynnik wzrostu β
TNFAIP6	<i>ang. Tumor necrosis factor alpha-induced protein 6</i>	Czynnik martwicy nowotworów
TPTZ	<i>ang. 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine</i>	2,4,6-tripirydylo-s-triazyna
TTF	<i>ang. Total triterpenic fraction</i>	Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej zawierający całkowitą frakcję triterpenową
TTFCA	<i>ang. Total triterpenoid fraction of Centella asiatica</i>	Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej zawierający całkowitą frakcję triterpenoidową

VB	<i>ang. Vogel-Bonner salt</i>	Roztwór soli Vogel-Bonner
VEGF	<i>ang. Vascular endothelial growth factor</i>	Śródbłonkowy czynnik wzrostu
WM793	<i>ang. Melanoma malignant cell line</i>	Linia ludzkich komórek czerniaka – przerzut z płuca

I. Wstęp

1. Morfologia, występowanie i skład chemiczny *Centella asiatica*

Wąkrota azjatycka – *Centella asiatica* (L.) Urban, syn. *Hydrocotyle asiatica* (L.) jest to roślina zielna znana również pod angielską nazwą Indian Pennyworth (Indian Hydrocotyle), a w medycynie orientalnej nazywana jest *Gotu Kola* i *Tiger Grass* [Gohil i wsp., 2010, Bylka i wsp., 2013]. Taksonomia rośliny *Centella asiatica* została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1 Systematyka gatunku *Centella asiatica* [Brinkhaus i wsp. 2000].

Klasyfikacja		
Królestwo	Jądrowe	<i>Eucaryota</i>
Podkrólestwo	Rośliny	<i>Phytobionta</i>
Gromada	Nasienne	<i>Spermatophyta</i>
Podgromada	Okrytonasienne	<i>Angiospermae</i>
Klasa	Dwuliścienne	<i>Dicotyledones</i>
Podklasa		<i>Rosidae</i>
Nadrząd		<i>Aralianae</i>
Rząd	Araliowce	<i>Araliales (Umbelliflorae)</i>
Rodzina	Selerowate	<i>Apiaceae (Umbelliferae)</i>
Podrodzina		<i>Hydrocotyle</i>
Rodzaj	Wąkrota	<i>Centella</i>
Gatunek	Wąkrota azjatycka	<i>Centella asiatica</i> (Linn.) Urban

Wąkrota azjatycka jest rośliną płożącą się, posiada pionowy korzeń główny i pełzającą łodygę wyposażoną w ukorzenione węzły, z których na długich ogonkach (około 6 mm) wyrastają liście z niewielkim przylistkiem u nasady. Liście rośliny ułożone są naprzemianlegle (czasami zgrupowane w węzłach) o długości 10 – 40 mm i 70 mm szerokości, kształtu okrągłego lub nerkowatego i o lekko karbowanych brzegach. Na płaskiej powierzchni liści rozchodzi się 7 nerwów w ułożeniu dłoniastym. Spód młodych liści porastają nieliczne włoski, których występowania nie stwierdzono na liściach dorosłych. Kwiatostan wąkroty azjatyckiej to baldach zbudowany z 1-5 drobnych siedzących, bezszypułkowych kwiatów. Kwiaty wąkroty mają barwę od jasnoróżowej do czerwonej, a ich kwitnienie przypada na sierpień i wrzesień



Rycina 1 Morfologia rośliny *Centella asiatica*.

[Brinkhaus i wsp., 2000]. Owocem rośliny jest drobna (do 5 mm), kulista rozłupka, złożona z dwóch niełuppek. W jej wnętrzu znajdują się pojedyncze, poprzecznie ściśnięte nasiona. Wąkrota azjatycka posiada korzenny aromat, zapachem przypominający liść tytoniu. Morfologię rośliny przedstawia rycina 1.

Centella asiatica to roślina zielna rosnąca w zwartych skupiskach, charakteryzowanych jako „zielony dywan” [Karłowicz – Bodalska i wsp., 2013]. W stanie naturalnym roślina porasta miejsca podmokłe, bagniste, zacienione ze stałym dostępem do wody,

ale można ją również znaleźć na leśnych polanach czy terenach skalistych, na wysokości dochodzącej nawet do 2500 m. n. p. m. [Brinkhaus i wsp., 2000]. Wygląd rośliny uzależniony jest od miejsca występowania [Król, 2010]. Roślina występuje na terenach południowo-wschodniej Azji: Indie, Chiny, Japonia, Malezja i Indonezja, ale występuje również w Południowej Afryce, w Australii, Południowej i Środkowej Ameryce i na Madagaskarze. Miejsca naturalnego bytowania rośliny przedstawiono na rycinie 2. Ze względu na sprzyjające warunki do wzrostu i ogromne zapotrzebowanie komercyjne

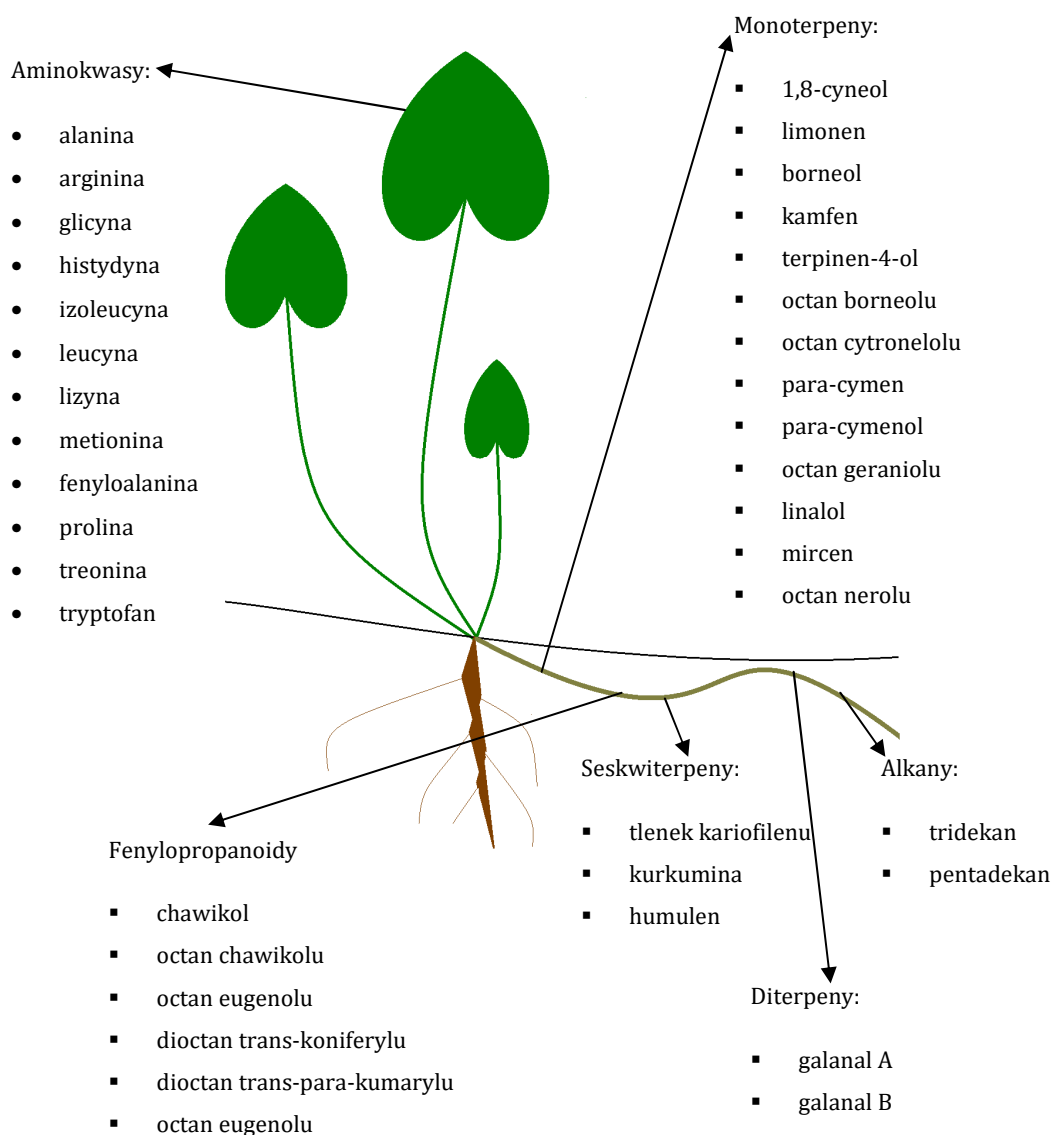


Rycina 2 Obszary naturalnego bytowania *Centella asiatica*.

na ziele rośliny, wąkrota azjatycka jest również uprawiana na plantacjach, gdzie surowiec pozyskuje się w przeciągu całego roku. W warunkach hodowlanych, do rozmnażania wegetatywnego rośliny wykorzystuje się rozłóg i korzeń. Umieszcza się

je w mokrym piasku lub ziemi i po około 2 tygodniach są gotowe do rozmnażania. Ziele wąkroty azjatyckiej może być zbierane już 6 miesięcy po nasadzeniu, w dowolnym czasie w ciągu roku [Brinkhaus i wsp., 2000]. Zebrane części nadziemne rośliny są następnie suszone na słońcu [Karłowicz – Bodalska i wsp., 2013].

Według Farmakopei Polskiej X ziołem wąkroty azjatyckiej (*Centellae asiaticae herba*) określa się wysuszone i połamane części nadziemne rośliny *Centella asiatica* (L.) Urban. *Centella asiatica* (L.) Urban jako surowiec opisywana jest również w Indian Herbal Pharmacopoeia, German Homeopathic Pharmacopoeia i Pharmacopoeia of the People's Republic of China (farmakopea chińska) [Karłowicz – Bodalska i wsp. 2013, Brinkhaus i wsp., 2000].



Rycina 3 Związki o mniejszym znaczeniu oznaczone w liściach i kłączu *Centella asiatica* [Brinkhaus i wsp., 2000].

Z wysuszonego ziele wąkroty azjatyckiej otrzymuje się następnie wyciągi wodne lub alkoholowe. Pozyskuje się także pojedyncze związki chemiczne o zdefiniowanej aktywności biologicznej. Popularnymi wyciągami z wąkroty azjatyckiej są TECA (titrated extract of *Centella asiatica*) i TTFCA (total triterpenoid fraction of *Centella asiatica*), które zawierają w swoim składzie azjatykozyd (40%), kwas azjatykowy (30%) i kwas madekasowy (30%). Równie popularnym wyciągiem jest TTF (total triterpenic fraction), który składa się z mieszaniny kwasu azjatykowego (30%) i kwasu madekasowego (30%) oraz z azjatykozydu (40%). Dostępne są również wyciągi CATTF (*Centella asiatica* total terpenic fraction) i ETCA (Estratto Titolato di *Centella asiatica*), w których zawartość procentowa poszczególnych składników nie została oznaczona. [Byłka i wsp., 2013, Brinkhaus i wsp., 2000, EMEA Assesment Report 2, Gohil i wsp., 2010].

Skład chemiczny wąkroty azjatyckiej jest niezwykle bogaty, a zawartość poszczególnych składników, podobnie jak wygląd rośliny, uzależniona jest od miejsca jej bytowania [James i wsp., 2011]. W ziele wąkroty azjatyckiej oznaczono składniki należące do różnych grup chemicznych [Orhan, 2012]. Zgodnie z wymogami Farmakopei Polskiej X wysuszone ziele wąkroty azjatyckiej musi zawierać nie mniej niż 6,0% sumy triterpenów w przeliczeniu na azjatykozyd. Największą grupą składników wyizolowanych z ziele wąkroty azjatyckiej o udowodnionej w badaniach naukowych aktywności biologicznej są pentacykliczne saponiny triterpenowe, zwane centellozydami lub pseudosaponinami, których zawartość powinna wahać się od 1% do 8% - w zależności od miejsca zbioru surowca [James i wsp., 2011]. Za wielokierunkowe działanie wąkroty azjatyckiej najprawdopodobniej odpowiadają związki należące do tej grupy, azjatykozyd i madekasozyd oraz ich aglikony: kwas azjatykowy i madekasowy. Do saponin wyizolowanych z ziele wąkroty azjatyckiej należą również: azjatykozyd A i B, centellasaponiny A,B,C,D, centellozyd, indocentellozyd, bramozyd, braminozyd, tankunizyd, izotankunizyd, skeffoleozyd A, a także kwasy triterpenowe: terminolowy, madazjatykowy, betulinowy, izobramowy, braminowy, centellowy, centykowy, centoikowy, indocentoikowy, ursolowy, pomolowy, tankunowy i izotankunowy [Bonfill i wsp., 2006, Orhan, 2012, James i wsp., 2011, Subban i wsp., 2008]. W ziele wąkroty oznaczono również liczne kwasy fenolowe: rozmarynowy, chlorogenowy, izo-chlorogenowy, etakrynowy, 3-ferulowy, 4,5-di-O-kawoilochinowy, 3,5-di-O-kawoilochinowy, 3,4-di-O-kawoilochinowy, 1,5-di-O-kawoilochinowy [Yoshida i wsp., 2005, Subban i wsp., 2008], a w surowcu tureckim zidentyfikowano dodatkowo

kwasy: p-hydroksybenzoesowy, wanilinowy, p-kumarynowy, o-kumarynowy i trans-cynamonowy. W wąkrocie azjatyckiej stwierdzono również obecność związków należących do takich grup, jak polisacharydy: centelloza, arabinogalaktan [Orhan, 2012], monosacharydy: ramnoza, glukoza, arabinoza, fruktoza, sacharoza, rafinoza [Subban i wsp., 2008, Brinkhaus i wsp., 2000] poliacetyleny: cadinol, acetoxycentellinol, centellin, centellicin, asiaticin [Siddiqui i wsp., 2007, Govindan i wsp., 2007], fitosterole: kampesterol, sitosterol, stigmasterol i castasterol [Orhan, 2012], a także flawonoidy, takie, jak kwercetyna, kemferol, rutozyd, apigenina, mirycetyna, 6-metoksykwercetyna, 3-glukozyd kwercetyny, 3-glukozyd kemferolu, 7-glukozyd kemferolu, [Karłowicz - Bodalska i wsp., 2013, Orhan, 2012] i nowo oznaczone w wąkrocie: castilliferol i castillicetin [Subban i wsp., 2008]. Analizy wykazały również obecność aminokwasów: kwasu asparaginowego, glicyny, kwasu glutaminowego, alaniny, fenyloalaniny [Singh i wsp., 2010], śluzów, żywic i olejków eterycznych [Gohil i wsp., 2010]. W olejku eterycznym (0,1%) oznaczono 11 monoterpenu (20%) i 14 seskwiterpenów (68,8%), a także ich pochodne tlenowe. W olejku eterycznym oznaczono: α -humulen, germakren B, β -kariofylen, myrcen, trans β -farnezen, p-cymol, α -pinen, β -pinen, γ -terpinen i octan bornylu [Tiwari i wsp., 2011, James i wsp., 2009].

Drugorzędowe substancje pozyskane z rośliny *Centella asiatica* oznaczono na rycinie 3 (str. 23), z kolei główne składniki przyporządkowane do poszczególnych grup chemicznych zestawiono w tabeli 2 (str. 26). Analiza wartości i podstawowych składników odżywczych wykazała, że 100 g liści wąkroty azjatyckiej ma 34 kalorie i znajduje się w nich 89.3 g wody, 6.9 g węglowodanów, 1.6 g białek, 0.6 g tłuszczów, 2 g błonnika, 1.6 g popiołu oraz składniki mineralne: 414 mg potasu, 170 mg wapnia, 30 mg fosforu, 3.1 mg żelaza, 6.58 mg β -karotenu, 4 mg witaminy C, 1.2 mg witaminy B₃, 0.15 mg witaminy B₁, 0.14 mg witaminy B₂ [Brinkhaus i wsp., 2000].

Tabela 2 Skład chemiczny *Centella asiatica*.

Grupa chemiczna	Składnik chemiczny
Pentacykliczne saponiny triterpenowe (1% - 8%) ¹ – pochodne ursanu ² – pochodne oleananu	azjatykozyd ¹ , azjatykozyd A, azjatykozyd B ² , madekasozyd ¹ , braminozyd, bramozyd, centellasaponiny (A,B,C,D), centellozyd, indocentellozyd, tankunizyd, izotankunizyd, skeffoleozyd A
Kwasy tri terpenowe ¹ – pochodne ursanu ² – pochodne oleananu	Kwas: azjatykowy ¹ , madekasowy ¹ , terminolowy ² , madazjatykowy, betulinowy izobramowy, braminowy, centellowy, centykowy, centoikowy, indocentoikowy, ursolowy, pomolowy, tankunowy, izotankunowy
Kwasy fenolowe	Kwas: rozmarynowy, chlorogenowy, izo-chlorogenowy, etakrynowy, 3-ferulowy, 4,5-di-O-kawoilochinowy, 3,5-di-O-kawoilochinowy, 3,4-di-O-kawoilochinowy, 1,5-di-O-kawoilochinowy
Flawonoidy	kwercetyna, kemferol, rutozyd, apigenina, mirycetyna, 6-metoksykwercetyna, 3-glukozyd kwercetyny, 3-glukozyd kemferolu, 7-glukozyd kemferolu
Polisacharydy	centelloza, arabinogalaktan
Poliacetyleny	cadinol, acetoxycentellinol, centellin, centellicin, asiaticin

Fitosterole	kampesterol, sitosterol, stigmasterol, castasterol
Olejek eteryczny	α -humulen, germakren B, β -kariofyllen, myrcen, trans β -farnezen, p-cymol, α -pinen, β -pinen, γ -terpinen, octan bornylu

2. Właściwości terapeutyczne wyciągów z wąkroty azjatyckiej i jej składników aktywnych wykorzystywanych w preparatach kosmetycznych i dermatologicznych

Ekstrakty z wąkroty azjatyckiej są wprowadzane do formułacji kosmetycznych w formie sproszkowanej, wodnej lub alkoholowej. Do produkcji wykorzystuje się ekstrakty otrzymane zarówno z całej rośliny jak i jej liści, kwiatów, łodygi, korzenia oraz merystematycznych kultur tkankowych [Safety Assesment, 2015]. Stężenie wyciągu z wąkroty azjatyckiej jakie może znaleźć się w kosmetyku waha się pomiędzy 0.00002% - 0.5% i jest uzależnione od przeznaczenia kosmetyku (krem lub produkt myjący) i miejsca jego stosowania na ciele (twarz, skóra pod oczami, włosy). Produkty zawierające składniki pochodzące z ziela wąkroty azjatyckiej mogą być nakładane nawet kilkakrotnie w ciągu dnia. Używane okazjonalnie lub raz dziennie, mogą być bezpiecznie stosowane przez wiele lat [Safety Assesment, 2015]. Według międzynarodowej nomenklatury nazewnictwa składników kosmetycznych INCI, wyciągi z wąkroty azjatyckiej widnieją w składzie produktu kosmetycznego pod nazwami: *Centella Asiatica Extract*, *Centella Asiatica Leaf Extract*, *Centella Asiatica Meristem Cell Culture*. W składzie produktów kosmetycznych znajdują się również pojedyncze związki wyizolowane z rośliny, takie jak azjatykozyd (INCI: *Asiaticoside*), madekasozyd (INCI: *Madecassoside*), kwas azjatykowy (INCI: *Asiatic Acid*) i kwas madekasowy (INCI: *Madecassic Acid*), których stężenie w preparacie nie może przekroczyć 0.5% [Safety Assesment, 2015, Dz. U. 2006/257/WE].

Najpopularniejsze ekstrakty z wąkroty azjatyckiej (TECA, pod nazwą handlową Madecassol®, Blastestimulina®, Centellase®) wykorzystywane w preparatach farmaceutycznych, mogą być stosowane zarówno zewnętrznie jak i doustnie. Na skórę

aplikowane są w formie 1% kremu, 2% pudru i sterylnych opatrunków (1% ekstraktu / 2 g opatrunku / 1 dm² skóry). W takiej postaci wykorzystuje się ekstrakty w leczeniu ran, podczas terapii, w których pojawiły się problemy związane z procesem gojenia, takie jak blizny przerostowe (hipertroficzne) lub keloidy. Wyciągi z wąkroty azjatyckiej wspomagają również prawidłowy przebieg fazy ziarninowania rany. Głównym mechanizmem działania ekstraktów po ich aplikacji na ranę jest indukcja syntezy kolagenu. Co więcej, produkty farmaceutyczne zawierające wyciągi z wąkroty azjatyckiej są aplikowane zewnętrznie w przypadku owrzodzeń żylnych, odleżyn i oparzeń. Ekstrakty zaleca się przyjmować doustnie w formie tabletek w stanie przedżyłakowym i żyłakach kończyn dolnych, ale również wspomagająco terapię zewnętrzną wymienionych wyżej schorzeń dermatologicznych [Assesment Report, 2010].

2.1. Przenikanie przez skórę i biodostępność ekstraktów z *C. asiatica*

Fizykochemiczne i farmakokinetyczne właściwości wyciągów z wąkroty azjatyckiej i wyizolowanych z niej składników są istotne w kontekście ich wykorzystania w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych. Niezwykle ważne są takie parametry jak lipofilowość, rozpuszczalność, wchłanianie, metabolizm, eliminacja, jak i biodostępność poszczególnych składników. Chodzi o to, aby po podaniu doustnym, na skórę czy też w formie iniekcji, mogły wykazywać skuteczne działanie. Obecnie podejmuje się coraz więcej prób udoskonalenia preparatów leczniczych i kosmetycznych, aby poprawić dostarczanie głównych składników aktywnych zawartych w ekstraktach z wąkroty azjatyckiej do miejsca docelowego np. skóry właściwej [Meeran i wsp., 2018].

Należy wspomnieć, że szczególnie w przypadku preparatów kosmetycznych niezwykle ważna do pokonania przez substancje aktywne jest bariera skórna, której główną funkcją jest ochrona głębiej położonych tkanek i narządów przez co nie jest ona łatwo przepuszczalna dla substancji chemicznych. Po podaniu na skórę substancje czynne powinny penetrować przez warstwę rogową naskórka, do jego głębiej położonych warstw czy skóry właściwej.

W przypadku ekstraktów z wąkroty azjatyckiej, po aplikacji na skórę, głównym miejscem ich działania powinna być skóra właściwa m.in. ze względu na ich aktywność

stymulującą fibroblasty do produkcji kolagenu (preparaty anti-aging). Badania Kwon i wsp. udowodniły, że wodny ekstrakt z wąkroty azjatyckiej nie jest w stanie przeniknąć przez naskórek nawet po 24 h od momentu aplikacji, zatem nie ma szans dotarcia do docelowego miejsca działania. Kwon i wsp. zbadali również, że zamknięcie ekstraktu w nanokapsułkach skutkuje szybszym przenikaniem ekstraktu z wąkroty azjatyckiej przez naskórek, i wydłużoną retencją w naskórku, co powoduje, że ekstrakt i jego główne składniki aktywne są uwalniane przez dłuższy czas. Co więcej, udowodniono także, że nanokapsułkowanie skutkuje wzrostem aktywności biologicznej ekstraktu blisko o 50 – 60% pomimo stosowania wyciągu w ilości mniejszej nawet o 30% [Kwon i wsp., 2012].

Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań naukowych dowodzą aktywności biologicznej azjatykozydu i madekasozydu. Jednym z głównych czynników umożliwiających substancjom chemicznym penetrację do głębiej położonych warstw skóry jest wielkość ich cząsteczki. Odpowiednia masa cząsteczkowa umożliwiająca substancjom chemicznym dalszą penetrację przez skórę powinna wynosić mniej niż 400. Niestety zarówno w przypadku azjatykozydu, jak i madekasozydu przenikanie przez warstwę rogową naskórka jest wręcz niemożliwe. Obydwa związki posiadają dużą masę cząsteczkową - azjatykozyd 959.12 g/mol, a madekasozyd 975.1 g/mol. Co więcej, związki te posiadają w swojej budowie fragment hydrofilowy, co ogranicza ich zdolność do wnikania w warstwę rogową naskórka. Zbadano, że po dermalnej aplikacji madekasozydu jego stężenie w skórze po 1 h wynosi 0.04% a po 24 h jedynie 0.06% [Assesment Report, 2010]. Zaobserwowano, że zamknięcie azjatykozydu w transferosomach [Surini i Djajadisastra, 2018] i liposomach [Paolino i wsp., 2012] umożliwiło nawet 10-krotnie większe przenikanie przez naskórek, a także sprzyjało i pobudzało biosyntezę kolagenu. Rodriguez da Rocha i wsp. w badaniach *in vitro* zaobserwowali 3-krotny wzrost retencji azjatykozydu w poszczególnych warstwach skóry po jego podaniu razem z ekstraktem z wąkroty azjatyckiej. Ekstrakt i inne zawarte w nim składniki aktywne mogą wzmacniać penetrację azjatykozydu przez skórę [Rodriguez da Rocha i wsp., 2017]. Nie przeprowadzono, podobnych, szczegółowych badań dotyczących madekasozydu. Może to jednak wynikać z podobnej zdolności do absorpcji i dystrybucji do poszczególnych tkanek zarówno azjatykozydu jak i madekasozydu [Anukunwithaya i wsp., 2016].

Biodostępność azjatykozydu, madekasozydu, kwasu azjatykowego i madekasowego po podaniu doustnym i podskórnym w badaniach przeprowadzonych na szczurach, waha się pomiędzy 30 a 50% [Brinkhaus i wsp., 2000], z kolei wodnego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej wynosi 70% [Kwon i wsp., 2012].

W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na zwierzętach zaobserwowano, że po podaniu doustnym azjatykozyd i madekasozyd wchłaniają się już po około 15 minutach. Z kolei, po podaniu dożylnym azjatykozyd charakteryzuje się szybszą dystrybucją niż madekasozyd. Niezależnie od drogi podania azjatykozyd i madekasozyd już po 1 h od podania penetrują w szczególności do mózgu, ale również występują w skórze, żołądku, nerkach i śledzionie, gdzie pozostają jeszcze przez 4 h [Anukunwithaya i wsp., 2016]. Badania wykazały, że w organizmie zwierzęcym, azjatykozyd ulega biotransformacji do kwasu azjatykowego. Badania *in vivo* przeprowadzone na ludziach udowodniły, że po doustnym podaniu ekstraktu TTFCFA w dawce 30-60 mg, kwas azjatykowy osiąga najwyższe stężenie w osoczu po około 4.5 h, a okres jego półtrwania wynosi 2.2-3.4 h [Ratz-Łyko i wsp., 2015].

2.2. Profil alergologiczny i toksykologiczny ekstraktów z wąkroty azjatyckiej i jej składników aktywnych

▪ Tolerancja miejscowa

Dostępne dane literaturowe dotyczące działań ubocznych wyciągów z wąkroty azjatyckiej i jej poszczególnych składników, wymieniają kontaktowe zapalenie skóry jako najczęściej występujące działanie uboczne. Należy zwrócić uwagę, że większość wyników przeprowadzonych badań dotyczących reakcji alergicznych wywołanych przez ekstrakty z wąkroty azjatyckiej, jak i przez jej poszczególne składniki zostało opublikowanych jeszcze w poprzednim wieku.

Badania przeprowadzone przez Eun i Lee pozwoliły zaobserwować występowanie kontaktowego zapalenia skóry po aplikacji na skórę Madecassolu® i jego poszczególnych składników: kwasu madekasowego, azjatykowego i azjatykozydu [Eun i Lee, 1985].

Badania przeprowadzone przez Izu i wsp. potwierdziły występowanie alergicznego kontaktowego zapalenia skóry po aplikacji Blasteostimuliny®,

która w swoim składzie zawierała 2% etanolowy ekstrakt z wąkroty azjatyckiej [Izu i wsp., 1992].

Hausen w swoich badaniach powołuje się na wyniki przeprowadzone przez Huriez & Martin's w 1969 r., którzy określili azjatykozyd jako składnik triterpenowy otrzymany z *Centella asiatica* o najsilniejszym potencjale uczulającym [Hausen, 1993].

Z kolei, niezależne eksperymenty przeprowadzone przez Danese i wsp. oraz Bilbao i wsp. potwierdziły, że zarówno ekstrakt z wąkroty azjatyckiej jak i jego główne składniki wykazują niewielkie ryzyko wywołania reakcji alergicznej [Danese i wsp., 1994, Bilbao i wsp., 1995].

Najnowsze badania dotyczące kontaktowego zapalenia skóry zostały przeprowadzone przez Gomes i wsp. Na podstawie testów płatkowych wykazali pozytywną reakcję alergiczną na 1% i 5% ekstrakt z wąkroty azjatyckiej oraz na maść z zawartością wyciągu z *Centella asiatica* [Gomes i wsp., 2010].

Niektórzy badacze zgodnie potwierdzają, że w przypadku wąkroty azjatyckiej za reakcje alergiczne najprawdopodobniej odpowiadają glikol propylenowy, olejek lawendowy i geraniol – składniki maści z ekstraktem z wąkroty azjatyckiej [Eun i Lee, 1985, Gomes i wsp., 2010]. Zwraca się również uwagę, że ryzyko powstawania reakcji alergicznych po aplikacji preparatów z wąkrotą azjatycką może wynikać z ich stosowania na rany, keloidy czy owrzodzenia kończyn dolnych, gdzie występują zaburzenia w jednorodności bariery skórno-naskórkowej i łatwiejsza penetracja składników do organizmu. Co więcej, należy zwrócić uwagę na dużą masę cząsteczkową badanych związków, a także obecność fragmentów hydrofilowych w cząsteczce azjatykozydu i madekasozydu, co wpływa na ich utrudnioną penetrację przez skórę, a tym samym skutkuje słabymi właściwościami uczulającymi.

▪ Toksyczność

Odpowiednio dawkowane preparaty zawierające w swoim składzie wyciągi z wąkroty azjatyckiej są bezpieczne dla ludzkiego organizmu. Po doustnym podaniu zbyt dużych dawek ekstraktów udokumentowano występowanie bólu i zawrotów głowy, nudności i senności. Z kolei, po przedawkowaniu preparatów po podaniu podskórnym obserwowano reakcje alergiczne, ból w miejscu wkłucia i przebarwienia skóry. Dużo rzadsze efekty uboczne występowały po iniekcji domięśniowej wyciągów

z wąkroty azjatyckiej. Ze względu na brak badań dotyczących przenikania składników ekstraktów z wąkroty azjatyckiej do mleka matki, odradza się ich przyjmowanie kobietom karmiącym piersią. Nie zaleca się stosowania wyciągów z wąkroty azjatyckiej przez okres dłuższy niż sześć tygodni, a przed kolejną kuracją należy zrobić dwutygodniową przerwę [Gohil i wsp., 2010]. Po podaniu doustnym, zarówno standaryzowany ekstrakt z wąkroty azjatyckiej, jak i azjatykozyd są dobrze tolerowane przez zwierzęta. Wykazano, że maksymalna dawka etanolowego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej wynosiła 250 mg/kg dla myszy i 350 mg/kg dla szczurów [Assesment Report, 2010]. Należy zachować szczególną ostrożność przy długotrwałej terapii wysokimi dawkami wyciągów z wąkroty azjatyckiej, podczas której spowalnia metabolizm składników aktywnych zawartych w wyciągu i preparat może okazać się toksyczny. Przykładem może być azjatykozyd określany jako prolek. Po doustnym podaniu azjatykozydu zostaje on przekształcony do kwasu azjatykowego, a szybkość biotransformacji uzależniona jest od poziomu kwasu azjatykowego w organizmie, im wyższy tym wolniejsza biotransformacja [Grimaldi i wsp. 1990]. Bezpieczna doustna dawka azjatykozydu wynosi 1 mg/kg, z kolei dla podania domięśniowego 40-50 mg/kg [Gohil i wsp., 2010].

▪ Hepatotoksyczność

Od dawna wiadomo, że leki pochodzenia roślinnego mogą wywoływać efekt toksyczny w różnych tkankach. Według Jorge i Jorge, pomimo braku wcześniejszych doniesień na ten temat, *Centella asiatica* powinna być brana pod uwagę jako roślina o potencjalnym działaniu hepatotoksycznym. Przebadali oni troje pacjentów, u których po doustnym zażyciu preparatów z wąkrotą azjatycką wystąpił silny ból wątroby, a badania histopatologiczne potwierdziły zapalenie wątroby (ostre i przewlekłe) z obszarami martwicy, degeneracją eozynofilów i cholestazą. Na podstawie dostępnych danych literaturowych dotyczących innych roślin leczniczych zawierających w swoim składzie substancje aktywne, należące do tych samych grup chemicznych co azjatykozyd i madekasozyd, tłumaczony jest mechanizm działania hepatotoksycznego opisywanej rośliny. Badacze postawili hipotezę, że azjatykozyd i madekasozyd są metabolizowane do związków reaktywnych przez CYP3A. Indukują zubożenie wewnątrzkomórkowego glutationu, wzrost stężenia wapnia, aktywację transglutaminaz i endonukleaz. Stymulują również zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej (MPTP). W ten sposób

zostaje uwolniony do cytoplazmy cytochrom c, uruchomiona zostaje kaskada kaspaz i rozpoczyna się proces apoptozy komórki [Jorge i Jorge, 2005].

- Anty/mutagenność

Aktywność mutagenna wodnego wyciągu z wąkroty azjatyckiej została przebadana z wykorzystaniem testu Ames na dwóch różnych szczepach *Salmonella typhimurium*: TA98 i TA100 w stężeniu 2 mg/płytką i 5 mg/płytką. Ekstrakt nie wykazywał aktywności mutagennej, ale posiadał słabą aktywność antymutagenną [Yen i wsp., 2001]. Brak działania mutagennego wodnego wyciągu z wąkroty azjatyckiej potwierdzili w badaniach również Florinsiah i wsp. Brak aktywności mutagennej wyciągów z wąkroty azjatyckiej może być spowodowany obecnością antyoksydantów i innych związków fitochemicznych w ziele *Centella asiatica*, ale główną rolę przypisuje się zielonemu barwnikowi roślinnemu – chlorofilowi. Jak donoszą dane literaturowe, chlorofil może selektywnie hamować aktywność mutagenów mających policykliczne struktury poprzez tworzenie z nimi kompleksów, np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą być wyłapywane przez chlorofil do tworzenia kompleksów. Może to opisywać sposób w jaki wodne ekstrakty z wąkroty azjatyckiej hamują mutagenezę testowanych szczepów bakteryjnych [Hayatsu i wsp., 1993, Florinsiah i wsp., 2013].

- Anty/genotoksyczność

Zbadano i wykazano, że ekstrakt z wąkroty azjatyckiej nie ma działania genotoksycznego. Podczas eksperymentów przeprowadzonych przez Siddique i wsp. wywołano efekt genotoksyczny za pomocą octanu cyproteronu (CPA) - pochodnej progesteronu, leku o działaniu gestagennym, antygonadotropowym i antyandrogennym, a w badaniach naukowych wykorzystywanym jako substancja o działaniu genotoksycznym. Wyciąg z wąkroty azjatyckiej powodował dawkozależne obniżenie uszkodzeń genotoksycznych wywołanych przez CPA. Na podstawie przeprowadzonych badań sugeruje się ochronną rolę ekstraktu z *Centella asiatica* w trakcie terapii octanem cyproteronu [Siddique i wsp., 2008]. Brak działania genotoksycznego metanolowego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej, oceniony na podstawie testu wymiany chromatyd siostrzanych został stwierdzony w badaniach przeprowadzonych przez Chippada i wsp. [Chippada i wsp., 2012].

- Interakcje z lekami

Do tej pory nie udokumentowano poważnych interakcji pomiędzy zielem wąkroty azjatyckiej, a lekami. Zwraca się jedynie uwagę na sedatywne działanie wysokich dawek ziela wąkroty azjatyckiej, dlatego nie należy jej przyjmować z lekami o działaniu nasennym. Przyjmowanie wąkroty azjatyckiej może obniżać poziom glukozy we krwi, dlatego nie zaleca się jej stosowania w trakcie terapii hipoglikemizującej [Gohil i wsp., 2010].

- Cytotoksyczność i aktywność przeciwnowotworowa

Centella asiatica została przebadana w modelu *in vitro* również pod kątem działania cytotoksycznego i przeciwnowotworowego. Gray i wsp. udowodnili, że wodny ekstrakt z wąkroty azjatyckiej nie posiada aktywności cytotoksycznej, a co więcej ma ochronny wpływ na komórki nerwowe linii SHSY-5Y (komórki nerwiaka zarodkowego pochodzące ze szpiku kostnego) i MC65 (komórki nerwiaka zarodkowego), co według autorów świadczy o neuroprotektoryjnym działaniu rośliny [Gray i wsp., 2014, Gray i wsp., 2015]. Badania na wodnym ekstrakcie otrzymanym z *Centella asiatica* przeprowadzili również Mutua i wsp. W eksperymencie wykorzystali linię komórek ludzkich nabłonka oddechowego (RE) i udowodnili, że wyciąg hamuje proliferację komórek tej linii, im wyższe stężenie wyciągu tym silniejszy efekt antyproliferacyjny, co może zostać wykorzystane w terapii polipów górnych dróg oddechowych [Mutua i wsp., 2013]. Wyniki badań prowadzonych na komórkach naskórka skóry ludzkiej potwierdzają, że wodny wyciąg hamuje proliferację keratynocytów, co jest przesłanką do wykorzystania wąkroty azjatyckiej w terapii łuszczyca [Sampson i wsp., 2001].

Dużo dokładniej przebadane zostały ekstrakty alkoholowe z wąkroty azjatyckiej. Dane literaturowe donoszą o bezpiecznym działaniu ekstraktów metanolowych w stosunku do linii komórkowych: HepG2 (komórki nowotworowe wątroby), SW480 (komórki raka okrężnicy) i limfocytów wyizolowanych z krwi [Babu i wsp., 1995, Babykutty i wsp., 2009, Chippada i wsp., 2012]. Z kolei, ten sam ekstrakt testowany w stosunku do komórek linii MCF-7 (komórki nowotworowe sutka) wywoływał dawkozależną apoptozę tych komórek oraz zahamowanie proliferacji. Mechanizm działania proapoptotycznego polegał na zmianie potencjału błony mitochondrialnej i indukcji pęknięć nici DNA [Babykutty i wsp., 2009]. Babu i wsp. udowodnili również

cytotoksyczne działanie metanolowego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej w stosunku do komórek nowotworowych linii EAC (Ehrlich ascites tumor cells) i DLA (Dalton's lymphoma ascites tumor cells). Aktywność antyproliferacyjna metanolowego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej została udowodniona dla komórek linii MK-1 (ludzkie komórki gruczolakoraka żołądka), HeLa (ludzkie komórki raka szyjki macicy) i B16F10 (mysie komórki czerniaka) [Yoshida i wsp., 2005]. Z kolei, etanolowy ekstrakt z liści wąkroty azjatyckiej posiada aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek linii A549 (komórki nowotworowe płuca) [Naidoo i wsp., 2017].

Dane literaturowe zwracają uwagę, że poszczególne składniki wyciągów z wąkroty azjatyckiej mogą wykazywać przeciwstawne działanie w stosunku do siebie, dlatego niejednokrotnie jeden składnik wyizolowany z ziela wąkroty azjatyckiej posiada silniejsze działanie niż cały ekstrakt. Zaobserwowano, że w stosunku do opisanych wcześniej linii komórkowych MK-1, HeLa i B16F10 najwyższą aktywność antyproliferacyjną w ekstrakcie chloroformowym wykazywał kwas ursolowy, z kolei w ekstrakcie metanolowym to kwas rozmarynowy powodował dawkozależny wzrost aktywności antyproliferacyjnej w stosunku do linii HeLa i B16F10 [Yoshida i wsp., 2005].

Najdokładniej udokumentowaną aktywność w badaniach komórkowych ze wszystkich komponentów wąkroty azjatyckiej posiada pentacykliczny składnik triterpenowy - kwas azjatykowy. Lee i wsp. udowodnili, że kwas azjatykowy w sposób dawkozależny obniża żywotność komórek linii HepG2 (komórki nowotworowe wątroby), poprzez indukcję apoptozy spowodowaną między innymi wzmocnieniem ekspresji białka p53. Zaobserwowano również, że kwas azjatykowy indukuje apoptozę komórek linii czerniaka ludzkiego (SK-MEL-2). W tym przypadku, kluczowym etapem pośredniczenia w apoptozie wywołanej przez kwas azjatykowy wydawała się aktywacja kaspazy-3 [Park i wsp., 2005]. W publikacji Ren i wsp. opisano indukcję apoptozy wywołaną przez kwas azjatykowy w stosunku do ludzkich komórek linii komórkowych raka jajnika (linie SKOV3 i OVCAR-3). Kwas azjatykowy w stężeniu 40 µg/ml obniżał o połowę żywotność komórek nowotworowych, nie wpływając na żywotność prawidłowych komórek jajnika. Zaobserwowano również indukcję apoptozy. W tym samym testowanym stężeniu procent komórek w stanie apoptozy był dziesięciokrotnie wyższy w stosunku do kontroli [Ren i wsp., 2016]. Wyniki badań naukowych donoszą również o pozytywnym wpływie kwasu azjatykowego na komórki ludzkiej skóry.

Dowodzono, że kwas azjatykowy nie tylko stymuluje namnażanie się komórek fibroblastów, ale również syntezę kolagenu w skórze właściwej [Park i wsp., 2005].

Pod kątem aktywność cytotoksycznej i antyproliferacyjnej badano również inne składniki frakcji triterpenowej – azjatykozyd i madekasozyd. Przeprowadzone badania wykazały, że azjatykozyd w stężeniu 40 μM po upływie 48 h hamuje o połowę proliferację komórek linii MCF-7 (komórki nowotworowe sutka). Z kolei, nie miał wpływu ani na żywotność, ani na namnażanie się komórek nowotworowych sutka linii MDA-231 i HBL-100 oraz komórek raka prostaty linii PC3 [Al-Saeedi, 2014]. W przypadku madekasozydu wykazano, że w dawkozależny sposób hamuje namnażanie się i migrację komórek nowotworowych wątroby linii HepG2 i SMMC-77, z najsilniejszą aktywnością w stężeniu 100 μM [Li i wsp., 2016]. W przypadku keratynocytów, prawidłowych komórek ludzkiego naskórka, zarówno azjatykozyd i madekasozyd wykazują działanie hamujące ich namnażanie, niezwykle istotne w terapii łuszczyca [Sampson i wsp., 2001]. Wykazano również, że wpływ azjatykozydu na proliferację komórek fibroblastów, prawidłowych komórek skóry właściwej, jest uzależniony od miejsca pozyskania komórek. Azjatykozyd sprzyja namnażaniu się fibroblastów pozyskanych z rany [Lu i wsp., 2004], z drugiej zaś strony w dawkozależny sposób hamuje proliferację tychże komórek pozyskanych z keloidu [Tang i wsp., 2011].

▪ Wpływ na płodność

Na podstawie przeprowadzonych do tej pory badań stwierdzono, że wyciągi otrzymane z ziela wąkroty azjatyckiej mogą powodować bezpłodność. Najprawdopodobniej jest to związane z obecnością w ekstraktach takich związków, jak tankunizyd i izotankunizyd [Jorge i Jorge, 2005]. Badania przeprowadzone przez Heidari i wsp. na mysich samcach pokazały, że po 60 dniach doustnego przyjmowania 100 mg/kg ekstraktu z liści *Centella asiatica* znacznie zmniejszyła się nie tylko liczba plemników (spadek o 40%), ale też ich ruchliwość (spadek o 62%). Co więcej, zmniejszeniu o połowę uległa również żywotność plemników we wszystkich grupach badanych w stosunku do grupy kontrolnej. Odnotowano również połowiczny spadek stężenia testosteronu i hormonu luteinizującego, a także 15% zmniejszenie stężenia hormonu folikulotropowego. Badania histopatologiczne tkanki jądra wykazały spadek liczby komórek plemnikotwórczych w kanalikach nasiennych, co skutkowało również obniżeniem średniej masy jąder. Sugeruje się, że wyciągi z wąkroty azjatyckiej mogłyby

być stosowane jako antykoncepcja u mężczyzn [Heidari i wsp., 2011]. Dowiedziono również, że długotrwałe doustne podawanie preparatów z wąkrotą u kobiet planujących zajść w ciążę może skutkować spontanicznymi poronieniami [Gohil i wsp., 2010].

2.3. Aktywność antycellulitowa i wpływ na mikrokrążenie skórne

Cellulit bardzo często określany jako „pomarańczowa skórka” jest dystrofią tkanki podskórnej o charakterze niezapalnym występującą głównie u kobiet. W przypadku cellulitu ogromną rolę odgrywa nierównomierne odkładanie się tłuszczu, zaburzenia równowagi pomiędzy procesem lipolizy, a procesem lipogenezy, a także zaburzenia mikrokrążenia. Zmiany pojawiają się najczęściej na łydkach, udach i pośladkach, ale można je również zaobserwować na brzuchu i ramionach. Zwraca się uwagę, że nie należy kojarzyć cellulitu jedynie z otyłością, ani też mylić ze sobą tych dwóch pojęć. Według badań statystycznych, około 85% kobiet powyżej 20 roku życia zmagają się z problemem cellulitu [Primastuti i wsp., 2013]. Istnieją cztery etapy rozwoju cellulitu. W etapie pierwszym obserwuje się delikatne zwłóknienie tkanki podskórnej i wypełnienie adipocytów tłuszczem. Co więcej, nie usunięty nadmiar płynów, wydostaje się do przestrzeni między adipocytami i powoduje obrzęk. W drugim etapie występuje znaczne zwłóknienie tkanki podskórnej, cellulit jest widoczny z powodu ściętego naskórka i skóry właściwej, zlepiają się ze sobą nie tylko adipocyty ale również włókna kolagenowe, co jeszcze bardziej utrudnia krążenie. Etap trzeci obejmuje wyraźne zmiany cellulitowe obserwowane w badaniu palpacyjnym, adipocyty są zbite ze sobą i otoczone grubą warstwą kolagenu, na skutek czego są odcięte od tlenu i składników odżywczych, a także utrudnione jest odprowadzenie toksyn. Ostatecznie rozwój cellulitu dochodzi do etapu czwartego, najbardziej opornego na jakąkolwiek terapię, z wyraźnymi zmianami cellulitowymi niezależnie od ułożenia ciała ze współistniejącymi dolegliwościami bólowymi, pojawiającymi się z powodu ucisku guzków zwłókniałego kolagenu na naczynia włosowate i włókna nerwowe [Primastuti i wsp., 2013].

Co ciekawe, cellulit jest dla wielu kobiet problemem natury estetycznej, a okazuje się, że jest to normalny stan fizjologiczny występujący u dorosłych kobiet (po okresie dojrzewania) który ma na celu odłożenie jak największej ilości tłuszczu jako rezerwuaru energetycznego na czas ciąży i późniejszej laktacji [Rawlings, 2006]. Istnieje dużo większy problem ze spalaniem tłuszczu odłożonego podskórnie, w porównaniu

do tłuszczu wisceralnego, wynikający z fizjologii ich spalania. W walce z cellulitem ogromne znaczenie ma terapia wspomagająca, czy miejscowa aplikacja preparatów działających bezpośrednio na obszar tłuszczu podskórnego [Primastuti i wsp., 2013]. Co więcej, w powstawaniu cellulitu ogromną rolę odgrywają wspomniane wcześniej zaburzenia pomiędzy procesem lipolizy i lipogenezy, które zależą od stężenia cyklicznego adenozyzynomonofosforanu (cAMP). Odpowiednio wysoki poziom tego związku pozwala na prawidłowe przeprowadzanie procesu lipolizy, z kolei zbyt niskie jego stężenie sprzyja wzmożonej lipogenezie [Rossi i Vergnanini, 2000, Rawlings, 2006]. Ratz-Łyko i wsp. wskazują, że składniki aktywne zawarte w wyciągach pozyskanych z *Centella asiatica* wpływają na zwiększenie poziomu cAMP, a tym samym aktywują lipolizę.

Istnieje wiele roślin oraz substancji pochodzenia naturalnego, które od dawna wykorzystywane są w terapii cellulitu. Do najpopularniejszych zalicza się kawę (kofeina), algi brunatne i zielone (NKT, polifenole, polisacharydy), liść bluszczu pospolitego (saponiny triterpenowe) i liść miłorzębu japońskiego (flawonoidy, polifenole) [Rawlings, 2006]. Również wąkrota azjatycka cieszy się dużym zainteresowaniem jako roślina będąca źródłem składników o potencjalnym działaniu antycellulitowym. Po aplikacji kosmetyków z zawartością wyciągu z wąkroty azjatyckiej odnotowano poprawę stanu skóry (elastyczności i nawilżenia) oraz zmniejszenie obwodu ud [Ratz-Łyko i wsp., 2015]. Rawlings powołuje się na badania przeprowadzone przez Hochem i Borgins, w trakcie których uczestnikom podawano 60 mg ekstraktu z wąkroty azjatyckiej 1 raz dziennie przez 90 dni. U badanych zaobserwowano zmniejszenie średnicy adipocytów, w szczególności tych zlokalizowanych w obrębie pośladków i ud, a także redukcję zwłóknień między adipocytami [Rawlings, 2006]. W badaniach klinicznych przeprowadzonych przez Primastuti i wsp. 30 kobietom przez 84 dni aplikowano na skórę krem z mieszaniną ekstraktu z wąkroty azjatyckiej (7%) i ziaren kawy (0,2%). Istotnym warunkiem eksperymentu był brak diety redukcyjnej i ćwiczeń fizycznych wśród uczestniczek w trakcie trwania eksperymentu. U 23 kobiet biorących udział w eksperymencie nastąpiła poprawa stanu skóry i zmniejszenie istniejącego cellulitu. Jedynie 50% badanych kobiet uznało, że są szczuplejsze niż przed eksperymentem. Jednak zmiany w obwodach odnotowano nie w okolicach pośladków i ud, gdzie aplikowano preparat, ale w obwodzie brzucha, co jak uznali prowadzący eksperyment, może świadczyć raczej o niedostosowaniu się warunków eksperymentu,

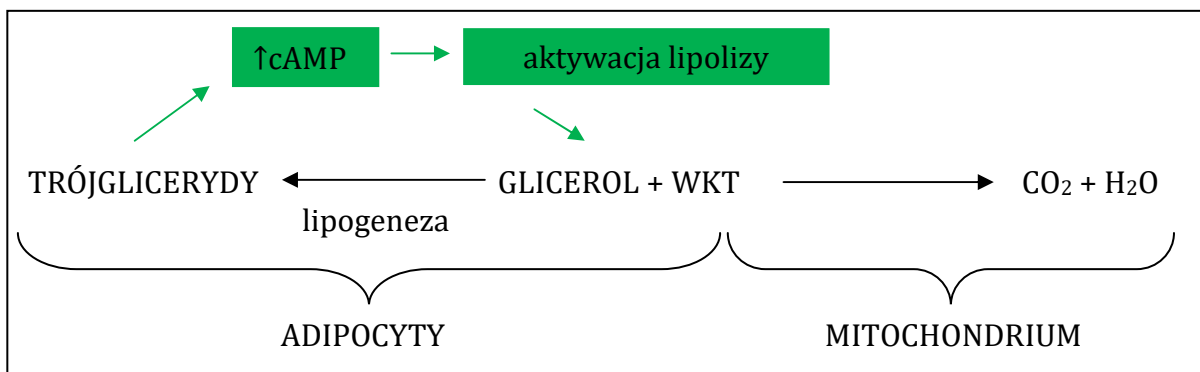
(czyli równoczesnego braku diety redukcyjnej i ćwiczeń fizycznych), a nie braku działania preparatu z wąkrotą azjatycką [Primastuti i wsp., 2013]. Z kolei, u osób będących jednocześnie na diecie, którym w trakcie trwania trzy miesięcznego eksperymentu podawano doustnie mieszaninę kwasu azjatykowego, madekasowego i azjatykozydu (nazwa handlowa Madecassol®) zaobserwowano redukcję cellulitu [Ratz-Łyko i wsp., 2015].

Chociaż dane literaturowe bardzo często odnoszą się do wąkroty azjatyckiej jako rośliny o potencjalnym działaniu antycellulitowym to wyniki przeprowadzonych do tej pory badań nie są jednoznaczne i ze względu na różne metody badawcze trudno jest określić konkretny mechanizm działania antycellulitowego wyciągów z rośliny oraz składnik odpowiedzialny za ten mechanizm.

Stymulowanie mikrokrążenia skórno przez wyciągi z wąkroty azjatyckiej i poszczególne składniki pozyskane z rośliny nieodłącznie związane są z działaniem antycellulitowym. Mikrokrążenie składa się z pięciu elementów: tętniczek, żył, naczyń włosowatych, tkanek limfatycznych i śródmiąższowych. W warunkach prawidłowych jest zachowana równowaga pomiędzy filtrowaniem kapilarnym tętnicy, a wchłanianiem kapilarnym naczyń włosowatych. Ta równowaga może zostać zaburzona poprzez wzrost ciśnienia kapilarnego lub zmniejszenie ciśnienia osmotycznego, wzrost ciśnienia śródmiąższowego, czy też zmniejszenie przepływu limfatycznego, co skutkuje narastającym obrzękiem międzykomórkowym obecnym we wszystkich stopniach zaawansowania cellulitu. Co ważne, wpływ na mikrokrążenie skórne mają nie tylko czynniki endogenne (np. receptory alfa i beta współczulnego układu nerwowego odpowiedzialne za zwężanie i rozszerzanie naczyń), ale również egzogenne, co pozwala na wykorzystanie terapii kosmetycznej, czy medycznej w celu równoważenia procesów filtrowania i wchłaniania oraz redukcji obrzęku międzykomórkowego, a tym samym redukcji cellulitu [Rossi i Vergnanini, 2000].

Cesarone i wsp. opisali wpływ frakcji triterpenowej wąkroty azjatyckiej (TTFCA) podawanej doustnie w dawce 60 mg dwa razy dziennie przez 8 tygodni. Zaobserwowano poprawę mikrokrążenia i obniżenie przepuszczalności kapilarnej u badanych osób po zakończeniu eksperymentu [Cesarone i wsp., 2001]. Co więcej, udowodniono, że ekstrakty z wąkroty azjatyckiej wykazują działanie ochronne na ściany naczyń krwionośnych, poprawiają ich elastyczność i zapobiegają agregacji płytek krwi,

dzięki czemu ułatwiony zostaje przepływ krwi, tkanki są lepiej dotlenione i odżywione, a obrzęk międzykomórkowy zredukowany [James i Dubery, 2009, Bylka i wsp., 2013].



Rycina 4 Przebieg procesu spalania tłuszczu.
Kolorem zielonym oznaczono sposób działania *Centella asiatica*.

2.4. Wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej na rozstępy skórne

Rozstępy skórne charakteryzuje się jako powierzchniowe, liniowe pasma ścieńczałej skóry. Do etiopatogenezy rozstępów zalicza się zarówno czynniki mechaniczne (rozciąganie skóry spowodowane rozwojem struktur podskórnych: tkanki śródmiąższowej i tłuszczowej w wyniku ciąży, otyłości czy rozrostu mięśni u sportowców) jak i czynniki biochemiczne (zbyt wysoki poziom glikokortykosteroidów hamujących namnażanie i funkcje fibroblastów). Rozstępy mogą pojawić się w każdym momencie życia i mogą być związane z predyspozycjami genetycznymi. Jednak najczęściej występują w okresie dojrzewania u około 35% nastolatków (z 2,5-krotną przewagą u dziewcząt) oraz u 60-90% kobiet w ciąży. Wysoki odsetek występowania rozstępów u ciężarnych wynika z połączenia dwóch czynników stymulujących ich powstawanie. Dochodzi zarówno do silnego rozciągnięcia skóry oraz zwiększonego stężenia hormonów steroidowych w organizmie. Rozstępy nie stwarzają zagrożenia dla zdrowia i życia ludzkiego, jednak są ogromnym problemem natury estetycznej. Usunięcie rozstępów jest praktycznie niemożliwe, dlatego niezwykle istotne są działania zapobiegające ich powstawaniu oparte na utrzymaniu i poprawie odpowiedniej struktury i elastyczności skóry właściwej. W terapii rozstępów wykorzystuje się substancje stymulujące namnażanie fibroblastów oraz aktywujące produkcję włókien kolagenowych oraz elastyny. Właśnie takie właściwości są przypisywane wąkrocie azjatyckiej [Mallol i wsp., 1991, Garcia-Hernandez i wsp., 2013].

Mallol i wsp. przeprowadzili eksperyment na grupie 80 kobiet ciężarnych po ukończeniu pierwszego trymestru ciąży, które codziennie aż do dnia porodu aplikowały na brzuch, piersi, pośladki i biodra krem Trofolastin® zawierający w swoim składzie ekstrakt z *Centella asiatica*, α -tokoferol i hydrolizaty kolagenu oraz elastyny. W wyniku eksperymentu zaobserwowano, że rozstępy pojawiły się aż u 56% kobiet w grupie kontrolnej, podczas gdy w grupie badanej jedynie u 34%. Udowodniono również ochronny wpływ kremu skutkujący nie tylko rzadszym występowaniem nowo powstałych rozstępów, ale również intensywnością powstałych zmian, która była widocznie mniejsza. W grupie badanej średnia ostrości zmian wynosiła 1.42, a w grupie placebo 2.13 (w skali 0-3). Dodatkowo, u kobiet ze skłonnością do powstawania rozstępów, u których w wywiadzie stwierdzono zmiany powstałe w okresie dojrzewania zaobserwowano, że krem zapobiegał powstawaniu nowych rozstępów w czasie ciąży w 89% przypadków [Mallol i wsp., 1991].

Podobne badania przeprowadzili Garcia-Hernandez i wsp. Do eksperymentu zakwalifikowali 198 kobiet ciężarnych po ukończeniu pierwszego trymestru ciąży, które dwa razy dziennie aż do dnia porodu wmasowywały w piersi, brzuch, uda i pośladki komercyjnie dostępny krem Velastia Anti-Stretch Marks IS-DIN, zawierający w swoim składzie triterpeny z wąkroty azjatyckiej, hydroksyprolisilan-C, olejek różany i witaminę E. Wyniki jasno pokazały, że testowany krem nie miał znaczenia dla samego pojawiania się rozstępów (33,3% w grupie badanej vs 37,6% w grupie kontrolnej), ale był bardzo skuteczny w redukowaniu ostrości powstałych rozstępów. Nowo powstałe rozstępy były łagodniejsze w grupie badanej niż w grupie placebo (25,7% vs 50%), co więcej w trakcie trwania eksperymentu, zauważono nasilenie ostrości zmian w grupie kontrolnej (17,8%), ale nie w grupie badanej (6%). Wysoką skuteczność kremu odnotowano w szczególności dla tych kobiet, które nie miały wcześniej problemu z rozstępami, zmiany pojawiły się jedynie u 6% kobiet w grupie badanej, a w grupie kontrolnej aż u 35% kobiet [Garcia-Hernandez i wsp., 2013].

Należy zwrócić uwagę, że oba zespoły badawcze zaobserwowały, znaczną redukcję głębokości i ostrości powstałych rozstępów. Niezwykle istotne jest również, że omówione badania były przeprowadzone na kobietach ciężarnych, u których nie zaobserwowano żadnych efektów ubocznych ani teratogennego wpływu testowanych preparatów zawierających zarówno ekstrakt z *Centella asiatica* czy samą frakcję triterpenową pozyskaną z rośliny.

Głównym komponentem preparatów kosmetycznych wykorzystanych w przytoczonych badaniach był ekstrakt z rośliny *Centella asiatica* i wyizolowane z niej składniki triterpenowe, głównie azjatykozyd, któremu właśnie przypisuje się pozytywne efekty terapii. Azjatykozyd posiada aktywność stymulującą procesy naprawcze w leczeniu ran i wspomagającą procesy bliznowacenia [Lee i wsp. 2012]. W przypadku terapii rozstępów mechanizmem działania azjatykozydu najprawdopodobniej jest stymulowanie zarówno proliferacji fibroblastów jak i ich aktywności polegającej na produkcji kolagenu i włókien elastynowych. Mallol i wsp. powołują się na wyniki badań przeprowadzonych przez Tincani i wsp., Velasco i wsp. oraz Tenni i wsp., którzy zwracają uwagę również na inny mechanizm działania azjatykozydu. Dowiedziono, że azjatykozyd ze względu na budowę chemiczną podobną do steroidów może mieć działanie antagonistyczne w stosunku do glikokortykosteroidów. Wyniki przeprowadzonych przez Mallol i wsp. badań jasno pokazują, że krem zawierający wyciąg z wąkroty azjatyckiej posiadał wysoką skuteczność u kobiet, u których rozstępy powstały już w okresie dojrzewania. Za powstawanie rozstępów w tym czasie odpowiedzialne są glikokortykosteroidy i inne hormony steroidowe. Przypuszcza się więc, że to właśnie azjatykozyd (główny składnik wyciągów z wąkroty azjatyckiej) jest odpowiedzialny za mechanizm działania związany z receptorami kortykosteroidów w komórce [Mallol i wsp., 1991].

2.5. Właściwości anti-aging wyciągów z wąkroty azjatyckiej

Kolagen jest białkiem strukturalnym, dominującym w macierzy pozakomórkowej. Stanowi on prawie 30% wszystkich białek ludzkiego organizmu. Jego cząsteczka zbudowana jest wyłącznie z aminokwasów endogennych: glicyny (30%), proliny (20%), hydroksyproliny (10%) i hydroksylizyny (1-2%).

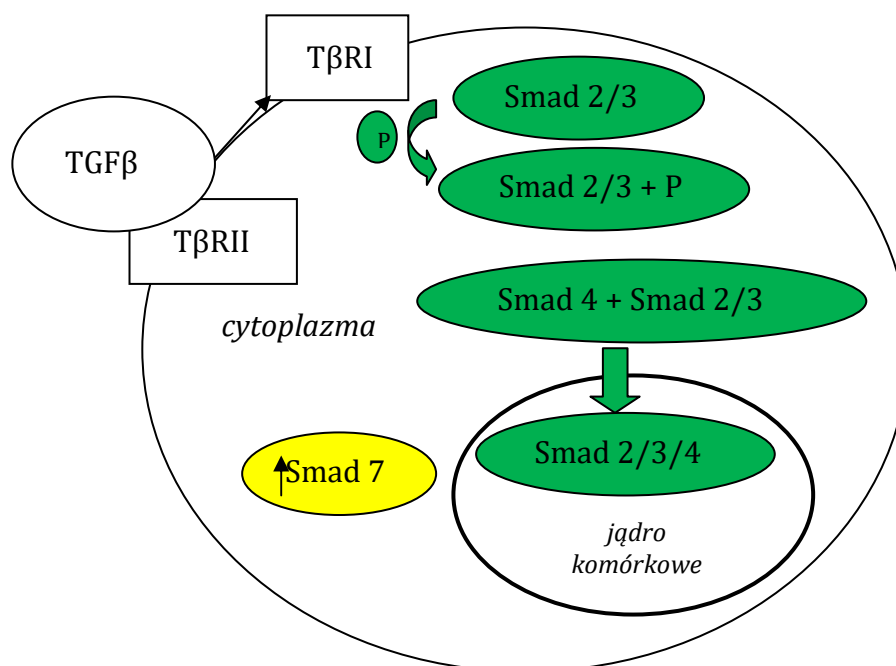
Podstawową jednostką struktury kolagenu jest tropokolagen, składający się z trzech lewoskrętnych łańcuchów polipeptydowych (jednostek α), które układają się w potrójnie spiralną, prawoskrętną strukturę (superhelisę). Wiadomo, że istnieje aż 28 typów kolagenu, z czego w skórze dominuje typ I (85-90%) i III (15%) odpowiedzialne za wytrzymałość mechaniczną skóry. Kolagen typu I pełni funkcję podporową skóry (aż w 96% zbudowany jest z tropokolagenu), z kolei kolagen typu III oplatając włókna kolagenowe typu I odpowiada za ich prawidłowe ułożenie w skórze.

Wraz z wiekiem maleje aktywność fibroblastów, spada produkcja kolagenu, a w dodatku obserwuje się jego zwiększoną degradację w organizmie. Starzenie się skóry jest w głównej mierze powiązane z ubytkiem w skórze kolagenu typu I, głównego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednak niezależnie od wieku cały czas następują procesy wymiany i degradacji kolagenu, a wygląd i kondycja skóry zależą od równowagi pomiędzy tymi procesami [Chung i wsp., 2001].

Kolagen syntetyzowany jest w komórkach tkanki łącznej – fibroblastach. Na poziomie molekularnym, białko to jest syntetyzowane w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej. W skórze starzejącej się, w starych fibroblastach, obserwuje się mniej rozwiniętą siateczkę śródplazmatyczną i w konsekwencji ograniczoną syntezę tego białka. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za indukcję wzrostu ludzkich fibroblastów i produkcję w nich kolagenu jest multifunkcyjna cytokina, transformujący czynnik wzrostu TGF- β . Wyniki wielu badań dowodzą, że aktywacja ścieżki sygnałowej TGF- β /Smad uruchamia procesy odpowiedzialne za syntezę kolagenu. Udowodniono również, że za aktywację ekspresji genów dla kolagenu typu I odpowiedzialne są właśnie białka Smad. Na powierzchni błony komórkowej zlokalizowane są receptory dla TGF- β , a w przypadku tej ścieżki sygnałowej, istotne są receptory T β R-I i T β R-II. Szlak sygnałowy TGF- β /Smad zostaje uruchomiony przez przyłączenie czynnika TGF- β do receptora T β R-II, do którego posiada największe powinowactwo, równocześnie dochodzi do fosforylacji i następnej aktywacji receptora T β R-I. Procesy fosforylacji są istotne z punktu widzenia przekazywania informacji do jądra komórkowego za pomocą białek Smad. Białka Smad 2 i Smad 3 (tzw. R-Smad) są ligandami dla receptorów TGF- β . Po ich aktywacji, łączą się z białkiem współpośredniczącym Smad 4 (tzw. co-Smad), tworząc kompleks Smad 2/Smad 3/Smad 4. Białko Smad 4 posiada zdolność przenikania do jądra komórkowego i w ten sposób kompleks białek wnika do jądra i przekazuje sygnał do jego wnętrza. W ten uproszczony sposób białka Smad regulują ekspresję genów dla kolagenu typu 1. Zsyntetyzowany w komórce kolagen podlega następnie licznym modyfikacjom posttranslacyjnym. Poprzez zablokowanie opisanej ścieżki, dochodzi do zahamowania syntezy prokolagenu.

Należy zwrócić uwagę na istniejące w jądrze komórkowym białko Smad 7 (tzw. anti-Smad), które działa antagonistycznie do wspomnianych wcześniej grup białek Smad przekazujących sygnał do jądra komórkowego. Smad7 blokuje prawidłową ścieżkę sygnałową poprzez silne wiązanie z receptorem T β R-I i zahamowanie

fosforylacji białek Smad 2 i Smad 3 [Stępień-Wyrobiec i wsp., 2008, Tang i wsp., 2011, Ciążyńska i wsp., 2016, Rogowski-Tylman i wsp., 2016].



Rycina 5 Ścieżka TGFβ/Smad w komórce, odpowiedzialna za regulację ekspresji genów dla kolagenu typu I.

Kolorem zielonym zaznaczona ścieżka regulacji uruchomiona przez azjatykozyd w komórkach prawidłowych fibroblastów. Kolorem żółtym zaznaczona ścieżka regulacji uruchomiona przez azjatykozyd w komórkach fibroblastów pozyskanych z keloidu.

Odpowiedzialne za procesy biodegradacji kolagenu w organizmie są metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), nazywane również kolagenazami. Za procesy biodegradacji macierzy zewnątrzkomórkowej w skórze odpowiadają głównie MMP-1, MMP-2, MMP-9 [Chung i wsp., 2001]. Na drodze biodegradacji enzymatycznej cząsteczka kolagenu zostaje przecięta przez metaloproteinazy w miejscach wiązań peptydowych pomiędzy glicyną i leucyną lub między glicyną i izoleucyną. Cząsteczki rozpadają się na wielkocząsteczkowe fragmenty, które następnie są trawione przez nieswoiste enzymy proteolityczne do pojedynczych aminokwasów [Żelaszczyk i wsp., 2012]. Transformujący czynnik wzrostu TGF-β hamuje działanie MMP-1, a tym samym ogranicza degradację kolagenu. Szlaki sygnałacyjne tej cytokiny są odpowiedzialne za równowagę w obszarze kolagenu skóry u ludzi [Rogowski-Tylman i wsp., 2016]. Wraz z wiekiem ilość kolagenu typu I i III maleje, co wynika zarówno ze zmniejszonej aktywności fibroblastów w skórze

(spowolnienie syntezy kolagenu), a także zwiększonej degradacji włókien kolagenowych. Co więcej, same włókna kolagenu ulegają ścięciu. Zmiany takie zaobserwowano zarówno w skórze naturalnie starzejącej się jak i w skórze z oznakami fotostarzenia. Zaobserwowano, że aktywność zewnątrzkomórkowych metaloproteinaz wzrasta po ekspozycji na promieniowanie UV zarówno komórek fibroblastów jak i keratynocytów [Chung i wsp., 2001]. Z kolei zawartość procentowa MMP w skórze maleje wraz z wiekiem [Varani i wsp., 2006]. Zarówno niska temperatura denaturacji termicznej kolagenu (dla typu I wynosi 39-40°C) jak i ogromny wpływ promieniowania UV na aktywność kolagenaz, skutkuje szybszym pofragmentowaniem włókien kolagenowych i dużo bardziej widocznymi na skórze oznakami starzenia się (głębokie zmarszczki, przebarwienia) u osób, które często eksponowały skórę na słońce i nie chroniły jej odpowiednio przed promieniowaniem UV. Zaobserwowano również silniejszą redukcję syntezy kolagenu u osób z objawami fotostarzenia się skóry w porównaniu do osób ze skórą starzejącą się naturalnie [Chung i wsp., 2001].

Duża masa cząsteczkowa kolagenu uniemożliwia jego przenikanie przez naskórek do skóry właściwej. Dlatego wprowadzanie kolagenu do formulacji kosmetycznej, a następnie jego aplikacja na skórę w postaci kremu, serum, maski itp. pozwala jedynie na wytworzenie na skórze hydrofilowego filmu. Dzięki temu, uzyskuje się efekt nawilżenia, przez ograniczenie transepidermalnej ucieczki wody i ochronę skóry przed środkami powierzchniowo czynnymi obecnymi w preparatach myjących. W dużej mierze producenci kosmetyków z kolagenem obiecują wypełnienie zmarszczek i odmłodzenie skóry, bazując na wiedzy, że kolagen jest białkiem strukturalnym skóry i jego deficyt objawia się zmianami na skórze. Należy jednak pamiętać, że efekt odmładzający poprzez wypełnienie zmarszczek może zagwarantować jedynie kolagen podany śródskórnym w formie iniekcji [Żelaszczyk i wsp., 2012]. Dlatego w przypadku kosmetyków niezwykle ważna jest aplikacja składników, które stymulują fibroblasty do produkcji kolagenu w skórze. W związku z tym, poszukuje się substancji, które podane na skórę, będą miały zdolność do penetrowania do skóry właściwej, gdzie pobudzą fibroblasty do syntezy kolagenu. W związku z rosnącym w kosmetyce trendem wykorzystywania surowców pochodzenia naturalnego, przeprowadzono również badania wykorzystania wąkroty azjatyckiej jako składnika stymulującego syntezę kolagenu w skórze.

Maquart i wsp. przebadali miareczkowany ekstrakt z wąkroty azjatyckiej (TECA) zawierający w swoim składzie 30% kwasu azjatykowego, 30% kwasu madekasowego i 40% azjatykozydu, a także wszystkie te składniki osobno pod kątem ich wpływu na syntezę kolagenu przez fibroblasty skóry ludzkiej. Wyniki pokazały, że TECA stymuluje syntezę kolagenu przez fibroblasty, jednak nie wpływa na ich liczebność. Co więcej, sam kwas azjatykowy (w stężeniu $7,5 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) stymulował produkcję kolagenu na podobnym poziomie jak cały ekstrakt. Efektu takiego nie zaobserwowano w przypadku kwasu madekasowego i azjatykozydu [Maquart i wsp., 1990]. Podobny eksperyment przeprowadzili Bonte i wsp., również testując wpływ na syntezę kolagenu typu I mieszaniny składników typu ursanu pozyskanych z ziela wąkroty azjatyckiej, kwasu azjatykowego (30%), kwasu madekasowego (30%) i azjatykozydu (40%), jak również wszystkich tych składników osobno. Wyniki badań wykazały, że wszystkie te składniki zarówno w mieszaninie jak i osobno stymulują syntezę kolagenu typu I. Zaobserwowano również, że dodatek 0.15 mM askorbinianu sodu do mieszaniny testowanych składników jak i do kwasu madekasowego i azjatykozydu znacznie wspomagał sekrecję kolagenu. Kwas azjatykowy stymulował syntezę kolagenu równie silnie, niezależnie od obecności pochodnej witaminy C, znanej jako kofaktor reakcji hydroksylacji reszt proliny i lizyny w posttranslacyjnej obróbce kolagenu. Jednak najsilniejszym aktywatorem sekrecji kolagenu okazała się mieszanina wszystkich składników w obecności witaminy C. Obserwacje pokazują, że pomimo różnic w budowie chemicznej azjatykozyd i kwas azjatykowy wywołują podobny efekt, co świadczy o tym, że część cukrowa cząsteczki (obecna w cząsteczce azjatykozydu) nie jest istotna, aby uzyskać ten sam efekt terapeutyczny [Bonte i wsp., 1994]. Być może różnice w uzyskanych wynikach badań są spowodowane wykorzystaniem różnych modeli badawczych. Maquart i wsp. wykorzystali w eksperymencie pierwotną linię komórkową fibroblastów, z kolei Bonte i wsp. w testach posłużyli się komórkami fibroblastów wyizolowanymi ze skóry 48-letniej kobiety.

Chociaż Maquart i wsp. wykazali w badaniach, że to kwas azjatykowy, a nie azjatykozyd jest odpowiedzialny za stymulowanie produkcji kolagenu, to właśnie azjatykozyd jest składnikiem najczęściej badanym pod kątem namnażania się fibroblastów i stymulowania ich aktywności. W wyniku eksperymentu *in vitro*, w trakcie którego fibroblasty wyizolowane ze skóry inkubowano w obecności azjatykozydu, udowodniono, że stymuluje on namnażanie się fibroblastów i składników

macierzy zewnątrzkomórkowej, a także wpływa na zmiany poziomu prokolagenu I i III [Lu i wsp., 2004]. Ze względu na dużą masę cząsteczkową azjatykozyd nie ma możliwości penetracji przez naskórek do skóry właściwej. Aby azjatykozyd mógł działać należy pomóc jego przenikaniu przez naskórek do skóry właściwej, gdzie będzie stymulował proliferację fibroblastów i syntezę kolagenu. Dlatego Paolino i wsp. zamknęli azjatykozyd w specjalnie przygotowanych nośnikach fosfolipidowych. Na podstawie przeprowadzonego eksperymentu udowodnili, że azjatykozyd znacznie pobudzał fibroblasty do syntezy kolagenu. Zaobserwowano także, że im dłuższa ekspozycja na nośniki z azjatykozydem tym silniejsza stymulacja wydzielania kolagenu, co potwierdzono zarówno w eksperymentach *in vitro* jak i *in vivo* [Paolino i wsp., 2012].

Lee i wsp. w wyniku przeprowadzonych badań postanowili odpowiedzieć na pytanie, jakie mechanizmy, w szczególności na poziomie molekularnym, są uruchamiane przez azjatykozyd na drodze syntezy kolagenu typu I. W wyniku badań *in vitro* ustalili, że azjatykozyd indukuje fosforylację białek Smad 2 i Smad 3. Dodatkowo, stymuluje wiązanie się ze sobą białek Smad 2/3 i Smad 4, a następnie translokację jądrową powstałego kompleksu białek. Wskazuje to na wpływ azjatykozydu na uruchomienie ścieżki sygnalizacyjnej Smad. Wykazano również, że gdy fibroblasty wystawiono na działanie czynnika hamującego błonowy receptor T β R-I, azjatykozyd działał ochronnie na procesy fosforylacji białka Smad 2/3 i syntezy kolagenu typu I. Świadczy to o tym, że azjatykozyd może indukować syntezę kolagenu poprzez aktywację ścieżki Smad, niezależnie od działania T β R-I. Co więcej, azjatykozyd zwiększa ekspresję genów dla kolagenu typu-I [Lee i wsp., 2006].

Wyniki innych badań wskazują na ciekawy efekt działania azjatykozydu. Okazuje się, że azjatykozyd działa antagonistycznie w zależności od tego, czy na jego działanie wystawione są prawidłowe komórki fibroblastów, czy fibroblasty pochodzące z blizny przerosłej (keloidu). Keloidy powstają w wyniku nieprawidłowo zachodzącego procesu gojenia się rany spowodowanego nadmierną proliferacją fibroblastów i wzmożonym odkładaniem się kolagenu. W badaniach przeprowadzonych przez Tang i wsp. wykazano, że azjatykozyd hamuje namnażanie się komórek fibroblastów pozyskanych z keloidu. Im dłuższy czas inkubacji i im wyższe stężenie azjatykozydu tym silniejsza inhibicja proliferacji. W testowanych stężeniach 100, 250 i 500 mg/L po 3 dniach inkubacji azjatykozyd hamował namnażanie się komórek odpowiednio o 28%, 30% i 51%, z kolei po 5 dniach o 35%, 48% i 63%. Azjatykozyd hamował również

wydzielanie kolagenu typu I i III przez komórki pozyskane z keloidu. Udowodniono, że w obydwu przypadkach zmiany wywołane przez azjatykozyd były nieodwracalne. Zaobserwowano również, że azjatykozyd w tych samych stężeniach hamował aktywację receptorów błonowych T β R-I i T β R-II oraz ekspresję białek w fibroblastach pozyskanych z blizny przerostej. Co więcej, azjatykozyd podnosił ekspresję białka Smad 7, hamującą ekspresję białek Smad 2 i Smad 3. W obydwu przypadkach tego efektu nie zaobserwowano w komórkach prawidłowych fibroblastów. Ustalono również, że w przypadku komórek fibroblastów pozyskanych z keloidów, azjatykozyd nie miał wpływu na fosforylację białek Smad 2 i Smad 3. Eksperyment ten jasno pokazuje, że białka sygnałowe Smad 2/3/4 nie są zaangażowane w regulację proliferacji indukowanej przez azjatykozyd [Tang i wsp., 2011].

Stymulująca syntezę kolagenu aktywność madekasozydu została wykazana przez Wu i wsp. Pomimo tego, że w najwyższym testowanym stężeniu (10 μ M) madekasozyd nie pobudzał fibroblastów do namnażania to stymulował zarówno syntezę prokolagenu typu I i III jak również kolagenu typu I i III. Zaobserwowano również, że związek ten pobudzał aktywację receptora błonowego T β R-II, jednak nie miał wpływu na receptor T β R-I, obniżał również ekspresję genów dla Smad 7 i podwyższał poziom fosforylacji Smad 3 w komórkach fibroblastów [Wu i wsp., 2012].

2.6. Wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej na gojenie się ran

Trudnym dla terapii stanem patologicznym skóry jest rana, definiowana jako ubytek skóry spowodowany przez uraz lub toczący się w organizmie proces chorobowy. Gojenie się ran jest niezwykle złożonym procesem prowadzącym do naprawy uszkodzonych tkanek. Proces ten obejmuje kilka skomplikowanych, następujących po sobie faz, w które zaangażowanych jest wiele czynników. Natychmiast po zranieniu, cytokiny przyciągają komórki zapalne, które usuwają wszelkie substancje obce i tkanki uszkodzone w wyniku zranienia. Po ustąpieniu stanu zapalnego, do rany migrują komórki keratynocytów i fibroblastów, które proliferują i tworzą nową tkankę. Fibroblasty chronią ranę przed wnikaniem do niej czynników obcych. W następnym etapie tworzą się naczynia włosowate wspierające aktywność fibroblastów i makrofagów, które usuwają skrzep fibrynowy, a w jego miejscu tworzą tkankę ziarninową. Tkanka ta zostaje wykorzystana jako substrat dla namnażających

się keratynocytów. W trakcie procesu epitelializacji, keratynocyty namnażają się i różnicują, przywracając tym samym ochronne funkcje nabłonka. Naprawę rany kończy skurcz miejsca rany i przebudowa tkanki poprzez różnicowanie i zaprogramowaną śmierć komórek [Lee i wsp., 2012]. Szczególnym rodzajem rany, o której należy wspomnieć jest rana oparzeniowa charakteryzowana jako uszkodzenie tkanek z powodu czynników zewnętrznych, takich jak np. promieniowanie czy chemikalia. W porównaniu do rany ciętej, w przypadku rany oparzeniowej dochodzi do dużej utraty komórek i tkanek [Hou i wsp., 2016].

Gojenie się ran jest procesem fizjologicznym, jednak jego przebieg może zostać zakłócony przez toczące się w organizmie choroby metaboliczne (cukrzyca), naczyniowe (zapalenie żył, przewlekła niewydolność żylna), genetyczne (kolagenozy), a także czynniki mechaniczne (odleżyny). Rozróżnia się ranę przewlekłą, która sama w sobie, nie jest jednostką chorobową ale symptomem toczącej się w organizmie choroby przewlekłej. Najczęściej występującymi ranami przewlekłymi są: owrzodzenia żyłne goleni, rany niedokrwienne goleni, zespół stopy cukrzycowej i rany o mieszanej etiologii, czyli żylna-niedokrwienne. Do tej pory nie znaleziono skutecznego składnika aktywnego, który pozwalałby na całkowite wyleczenie rany. Dlatego poszukuje się coraz to nowych substancji o potencjalnym działaniu stymulującym proces gojenia się rany, w szczególności pośród składników pochodzenia naturalnego, które wykazywałyby maksymalną skuteczność, przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa terapii. Ze względu na zawartość w surowcu roślinnym z wąkroty azjatyckiej dużych stężeń saponin triterpenowych, związków fenolowych, alkaloidów, flawonoidów, olejków eterycznych, garbników i kwasów tłuszczowych, roślina ta może być wykorzystywana w leczeniu ran. Poza udokumentowaną aktywnością leczniczą, w przypadku składników pochodzenia naturalnego mamy do czynienia z mniejszą liczbą skutków ubocznych w porównaniu z komercyjnie dostępnymi lekami.

W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na szczurach zaobserwowano całkowite zarastanie rany po 14 dniach aplikacji sprayu z wąkrotą azjatycką. Preparat zawierał 1,02% madekasozydu, 0,54% kwasu madekasowego, 0,25% azjatykozydu i 0,12% kwasu azjatykowego lub 0,12% kwasu azjatykowego, 0,54% kwasu madekasowego, 0,25% azjatykozydu i 1,02% madekasozydu [Choochuay i wsp., 2016, Sawatdee i wsp., 2016]. Duży panel badań *in vivo* przeprowadzonych na szczurach z ranami ciętymi i oparzeniowymi przeprowadzono z wykorzystaniem czterech różnych

ekstraktów z wąkroty azjatyckiej: heksanowego, etylo-octowego, metanolowego i wodnego, które aplikowano na ranę raz dziennie.

Już po trzydniowej terapii zaobserwowano znacznie wyższy stopień zagojenia rany oparzeniowej, który wzrastał wraz z czasem terapii. Proces gojenia rozpoczął się najszybciej (po 3 dniach) w ranach oparzeniowych, na które aplikowano ekstrakt etylo-octowy z wąkroty azjatyckiej, który charakteryzował się najwyższą zawartością kwasu azjatykowego. Stwierdzono, że kwas azjatykowy indukuje ekspresję TNFAIP6, hialadheryny zaangażowanej w przebudowę i modulację stanu zapalnego w ludzkich fibroblastach oraz wzrost syntezy kolagenu, ważnego w procesie gojenia. Wyniki histopatologiczne po 14 dniach terapii rany oparzeniowej wykazały w pełni rozwiniętą epitelializację i keratynizację we wszystkich grupach badanych niezależnie od wykorzystanego ekstraktu w porównaniu do znacznej martwicy włókien i niekompletnej epitelializacji w grupie kontrolnej. Zaobserwowano, że odporność rany ciętej na rozciąganie była wyższa w grupach badanych w stosunku do kontroli, ze względu na wzrost stężenia kolagenu. Wąkrota azjatycka wspomagała gojenie się tych ran poprzez hamowanie stanu zapalnego, indukowanie syntezy kolagenu (kwas azjatykowy, azjatykozyd), stymulowanie angiogenezy (β -sitosterol), rozszerzanie naczyń krwionośnych i redukcję stresu oksydacyjnego (flawonoidy). Wykazano także, że wyciągi stymulowały wzrost i namnażanie się komórek w uszkodzonych tkankach.

Jest to niezwykle istotne szczególnie w przypadku ran oparzeniowych, w których obserwuje się rozległy ubytek komórek i tkanek skutkujący dłuższym i bardziej skomplikowanym procesem gojenia niż w przypadku ran ciętych [Somboonwong i wsp., 2012]. Z kolei, w badaniach *in vitro* przeprowadzonych na króliczych komórkach nabłonka warstwy rogowej (RCE) w modelu badawczym procesu gojenia się ran, wykazano, że silniejszą aktywnością charakteryzują się niskie (62.5 ppm) stężenia wodnego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej. Ekstrakt nie wywarł istotnego wpływu na proliferację komórek, jak również na ekspresję markerów cyklu komórkowego, jednak znacznie stymulował migrację komórek. Aktywność ta sugeruje potencjalny efekt terapeutyczny dla ponownej epitelializacji nabłonka warstwy rogowej podczas gojenia się ran [Ruszymach i wsp., 2012].



Rycina 6 Wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej, azjatykozydu i madekasozydu na etapy gojenia się ran [Azis i wsp. 2017, Choochuay i wsp. 2016, Hou i wsp. 2016, Somboonwong i wsp. 2012, Ruszymach i wsp. 2012, Lee i wsp. 2012, Wu i wsp. 2012, Liu i wsp. 2008, Shukla i wsp. 1999].

Formowanie się nowych tkanek w trakcie gojenia się rany jest wynikiem migracji i proliferacji komórek, głównie keratynocytów i fibroblastów. Wyniki wielu badań wskazują na to, że azjatykozyd może być wykorzystywany jako promotor naprawy tkankowej poprzez stymulowanie migracji komórek skóry. Jak wykazały badania przeprowadzone przez Lee i wsp. azjatykozyd w stężeniu do 1000 μM nie jest cytotoksyczny w stosunku do linii komórek fibroblastów (aHDFs) i keratynocytów (aNHEKs), a komórki migrowały szybciej w próbach badanych z dodatkiem azjatykozydu. Co więcej, azjatykozyd w dawkozależny sposób stymulował namnażanie się komórek fibroblastów. Efektu takiego nie zaobserwowano w przypadku keratynocytów. Wyniki tych badań pokazują również, że azjatykozyd może ułatwiać i stabilizować adhezję komórek skóry. Dzięki temu, dodatek azjatykozydu do sztucznej skóry właściwej będzie ułatwiał i wzmacniał przyłączenie się do niej przeszczepionego naskórka [Lee i wsp., 2012]. Podobne wyniki uzyskano na podstawie badań przeprowadzonych na liniach ludzkich komórek skóry fibroblastach (HDF) i keratynocytach (HaCaT) przez Azis i wsp. Metanolowa frakcja ekstraktu z wąkroty azjatyckiej, zawierająca 2.4% azjatykozydu stymulowała migrację komórek obu wspomnianych linii. Jednak badania *in vivo* nie potwierdziły wpływu metanolowej frakcji, na szybkość procesu epitelializacji i wzrost zawartości hydroksyproliny w ranie (wyniki porównywalne z kontrolą) [Azis i wsp., 2017]. Wyniki badań *in vivo* przeprowadzonych przez Shukla i wsp. wskazują na skuteczne działanie azjatykozydu zarówno w przypadku fizjologicznego jak i opóźnionego (w przebiegu cukrzycy) gojenia się rany [Shukla i wsp. 1999a].

Migracja, adhezja i proliferacja są głównymi procesami stymulowanymi przez azjatykozyd, w procesie naprawczym gojenia się ran.

Jak wynika z badań *in vivo* na myszach przeprowadzone przez Liu i wsp. nie tylko azjatykozyd, ale również madekasozyd wspomaga zamykanie się rany w sposób zależny od czasu. Po 20 dniach doustnej terapii w dawce 24 mg/kg obserwowano prawie całkowite wygojenie ran oparzeniowych, potwierdzone badaniami histopatologicznymi. Madekasozyd posiada znaczące działanie terapeutyczne w przypadku ran oparzeniowych, oparte na kilku różnych mechanizmach: antyoksydacyjnym, syntezie kolagenu, stymulacji namnażania fibroblastów oraz procesu angiogenezy [Liu i wsp., 2008]. Wyniki tych badań potwierdzają Hou i wsp. wskazując, że azjatykozyd i madekasozyd mogą przywracać funkcjonalność tkankową w ranie poprzez aktywację

czynników wzrostu takich, jak śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) oraz stymulują syntezę kolagenu, wzmacniając tym samym wytrzymałość powstałych tkanek na rozciąganie. Zaobserwowano również odrastanie włosów na skórze w miejscach wygojonych ran oparzeniowych leczonych saponinami pozyskanymi z wąkroty azjatyckiej [Hou i wsp., 2016].

Inne udokumentowane aktywności kosmetyczne i terapeutyczne wybranych wyciągów z wąkroty azjatyckiej i jej głównych składników aktywnych zostały zebrane w tabeli 3.

Tabela 3 Udokumentowane aktywności kosmetyczne i terapeutyczne wyciągów z wąkroty azjatyckiej (CA) i jej głównych składników aktywnych.

Aktywność biologiczna	Testowany ekstrakt lub składnik aktywny	Model badawczy	Dane literaturowe
Poprawa funkcji barierowych skóry	Ekstrakt wodny w polimerowych nanokapsułkach	<i>in vitro</i>	Kwon i wsp., 2008
Ochrona skóry przed fotostarzeniem	Madekasozyd	<i>in vivo</i> (ludzie)	Haftek i wsp., 2008
Działanie przeciwłuszczycowe	Ekstrakt z CA, azjatykozyd, madekasozyd	<i>in vitro</i>	Sampson i wsp., 2001
Przeciwzapalne	Ekstrakt wodny	<i>in vivo</i>	Somchit i wsp., 2004
	Ekstrakt etanolowy	<i>in vitro</i>	Chippada i wsp., 2011
W modelu choroby wrzodowej żołądka	Ekstrakt wodny Azjatykozyd	<i>in vivo</i> (szczury)	Cheng i wsp., 2004, Guo i wsp., 2004
Przeciwdrobnoustrojowa	Ekstrakt wodny	<i>in vitro</i>	Talabani i wsp., 2016, Arumugam i wsp., 2011
	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>		Arumugam i wsp., 2011, Zaidan i wsp., 2005

		Ekstrakt etanolowy		Dhanalakshmi i wsp., 2018
		Kwas azjatykowy		Norzaharaini i wsp., 2011
	Methilicin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Ekstrakt metanolowy		Zaidan i wsp., 2005
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ekstrakt wodny Ekstrakt metanolowy		Arumugam i wsp., 2011
		Ekstrakt etanolowy		Vasavi i wsp., 2014
	<i>Helicobacter pylori</i>	Kwas azjatykowy		Norzaharaini i wsp., 2011
W Ośrodkowym Układzie Nerwowym	Neuroprotekcja w modelu choroby Alzheimera	Ekstrakt wodny Azjatykozyd Madekasozyd	<i>in vitro</i>	Soumyanath i wsp., 2012, Gray i wsp., 2015 Song i wsp., 2018 Luo i wsp., 2018
	Neuroprotekcja w modelu choroby Parkinsona	Ekstrakt wodny	<i>in vivo</i> (szczury)	Haleagarahara i Ponnusamy, 2010
	Poprawa funkcji poznawczych	Ekstrakt wodny	<i>in vivo</i> (myszy)	Gray i wsp., 2016
W układzie sercowo-naczyniowym	Kardioochronne	Ekstrakt wodny Ekstrakt alkoholowy Madekasozyd	<i>in vivo</i> (szczury)	Gnanapragasam i wsp., 2004 Pragada i wsp., 2004 Bian i wsp., 2008
	Niewydolność żylna	TECA TTFCA	<i>in vivo</i> (ludzie)	Pointel i wsp., 1987 Cesarone i wsp., 2001a Cesarone i wsp., 2001b

2.7. Aktywność antyoksydacyjna wyciągów z wąkroty azjatyckiej

Wolne rodniki są cząsteczkami lub atomami posiadającymi na powłoce walencyjnej niesparowany elektron. Powstają w organizmie w wyniku zachodzących w tkankach procesów utleniania. Do wolnych rodników tlenowych zalicza się anionorodnik ponadtlenkowy $-O_2^{\bullet}$, rodnik wodoronadtlenkowy $-HO_2^{\bullet}$, rodnik hydroksylowy $-OH^{\bullet}$, tlenek azotu $-NO^{\bullet}$ i ditlenek azotu $-NO_2$. Dzięki aktywności enzymów antyoksydacyjnych katalazy, peroksydazy i dysmutazy ponadtlenkowej, dochodzi do inaktywacji nietrwałych rodników tlenowych. Niezwykle ważne jest stałe dostarczanie do organizmu antyoksydantów, do których należą kwas askorbinowy, tokoferol, glutation, a także związki flawonoidowe i polifenole obecne w surowcach pochodzenia roślinnego. Udowodniono, że brak równowagi w organizmie pomiędzy oksydantami i antyoksydantami skutkuje rozwojem stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny prowadzi do uszkodzeń błon lipidowych, organelli komórkowych, DNA i białek, co przyczynia się do rozwoju nowotworów, procesów neurodegeneracyjnych, a także wczesnego starzenia się organizmu, w tym objawiających się na skórze głębokich zmarszczek, przebarwień i zmian w strukturze skóry.

Ekstrakty z wąkroty azjatyckiej zostały również przebadane pod kątem ich aktywności antyoksydacyjnej. Zainol i wsp. testowali w badaniach *in vitro* ekstrakty metanolowe, z różnych części rośliny wąkroty azjatyckiej: korzeń, liść, szypułka. Najsilniejszą aktywność do hamowania reakcji utleniania się lipidów wykazał ekstrakt pozyskany z liści. Wykazano również, że ekstrakt z liści zawierał największe stężenie polifenoli (8.13-11.7 g/100 g), co wskazuje na silną zależność pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną ekstraktu, a zawartością składników frakcji polifenolowej [Zainol i wsp., 2003]. Podobne wyniki dla metanolowego ekstraktu z liści rośliny otrzymali Subhasree i wsp. Udowodnili oni, że ekstrakt ten posiada silny efekt hamujący utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co hamuje proces uwalniania wolnych rodników [Subhasree i wsp., 2009]. Porównano również w testach *in vitro* aktywność różnego pochodzenia etanolowych ekstraktów z wąkroty azjatyckiej – ekstrakt turecki, indyjski i komercyjnie dostępny ekstrakt standaryzowany na zawartość azjatykozydu i madekasozydu. Najsilniejszą zdolnością do przeciwdziałania reakcji utleniania i zdolnością do redukcji jonów metali, charakteryzował się ekstrakt standaryzowany, badany w stężeniu 2000 $\mu\text{g/ml}$ [Orhan i wsp., 2013]. Wysoką zdolność do przeciwdziałania reakcji utleniania posiadają

również wodne ekstrakty z wąkroty azjatyckiej. Wyniki badań pokazują, że ekstrakt jest silnym przeciwutleniaczem, a nawet wykazuje silniejszą aktywność antyoksydacyjną niż zastosowany w eksperymencie związek referencyjny Trolox [Pittella i wsp., 2009, Kumari i wsp., 2016].

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z wąkroty azjatyckiej może być wykorzystywana również w terapii nowotworowej. Niezwykle istotne wyniki badań zaobserwowano w przypadku wyidukowanego chłoniaka u myszy. Wiadomo, że mechanizmy prowadzące do rozwoju tej choroby są związane ze stresem oksydacyjnym wywołanym przez reaktywne formy tlenu $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} powstające w trakcie normalnych procesów metabolicznych. Co więcej, w przypadku chłoniaka, zostaje zahamowana aktywacja enzymów antyoksydacyjnych dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej, a także aktywność przeciwutleniaczy glutationu i kwasu askorbinowego, co prowadzi do uszkodzeń komórkowych. Procesy te zaobserwowano u chorych myszy. Po doustnym podawaniu myszom 50 mg/kg/dzień metanolowego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej w ich organizmie odnotowano zarówno wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, jak i poziom przeciwutleniaczy [Jayashree i wsp., 2003].

W kolejnych badaniach *in vivo* przeprowadzonych na myszach, udowodniono, że również sam azjatykozyd wykazuje silne działanie antyoksydacyjne. Azjatykozyd hamował aktywność malonodialdehydu, związku o działaniu genotoksycznym, mutagennym, kancerogennym, powodującym uszkodzenie jądra komórkowego i hamującym podziały mitotyczne komórek. Związek ten jest również markerem stresu oksydacyjnego. Udowodniono również, że azjatykozyd stymulował działanie enzymów antyoksydacyjnych dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej [Xing i wsp., 2017].

II. Założenia i cel pracy

Dyrektywa unijna (2003/15/WE), która włączyła przepisy do tzw. dyrektywy kosmetycznej (76/768/EWG) spowodowała, że od dnia 11 marca 2013 roku na terenie całej Unii Europejskiej istnieje zakaz testowania na zwierzętach składników aktywnych i gotowych produktów kosmetycznych, a także wprowadzania do obrotu kosmetyków, które w swoim składzie zawierają substancje testowane na zwierzętach. Co więcej, najnowsza polska ustawa o produktach kosmetycznych z dnia 4.10.2018 roku, która weszła w życie 1.01.2019 roku wprowadza wysokie kary finansowe za naruszenie zakazu w zakresie testowania na zwierzętach (do 30 000 zł) oraz za przeprowadzanie testów na zwierzętach (do 100 000 zł). Wprowadzone zmiany są zgodne nie tylko z etyką w zakresie badań wykorzystujących zwierzęta, ale również z zasadą "3R" (*ang. „reduction, replacement, refinement”*), odnoszącą się do ciągłego rozwoju i udoskonalania metod alternatywnych wykorzystywanych w badaniach naukowych. Po wejściu w życie nowych przepisów, metody alternatywne stały się jedynymi metodami umożliwiającymi badanie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania preparatów kosmetycznych. Obecnie do badań aktywności biologicznej składników i surowców kosmetycznych bardzo często wykorzystywane są substytuty skóry ludzkiej, jednak należy pamiętać, że badania te są czasochłonne, kosztowne i nie od razu przynoszą oczekiwane wyniki. Z uwagi na powyższe ograniczenia i niedogodności, akceptowanym i nowoczesnym modelem do wstępnych badań przesiewowych w kosmetologii są hodowle komórkowe. Warto nadmienić, że w porównaniu z badaniami na modelach zwierzęcych, metody te są tańsze i pozwalają na szybki skrining wielu substancji kosmetycznych, ale posiadają także ograniczenia. Badania z wykorzystaniem metod *in vitro*, nie pozwalają na kompleksową ocenę badanych substancji w odniesieniu do całego organizmu, odnoszą się tylko do procesów zachodzących w pojedynczych, wyizolowanych komórkach, o czym należy pamiętać interpretując wyniki. Zgodnie z definicją hodowle komórkowe są procesem prowadzonym *in vitro*, pozwalającym na namnażanie i utrzymywanie przy życiu komórek roślinnych lub zwierzęcych poza organizmem.

Polski rynek kosmetyczny jest jednym z prężniej rozwijających się w Europie. W 2017 roku Polska była szóstym rynkiem kosmetycznym w Europie, a jego prognozowana wartość na rok 2021 wynosi 20 mld złotych. Wiąże się to nie tylko z wielkimi możliwościami, ale również z ogromną odpowiedzialnością w stosunku

do konsumentów, których liczba wciąż rośnie, również wśród mieszkańców Europy zachodniej [Raport o stanie branży kosmetycznej w Polsce, 2017]. W ostatnim czasie ogromną popularnością cieszą się preparaty kosmetyczne zawierające składniki pochodzenia naturalnego. Rośliną cenioną w przemyśle kosmetycznym jest wąkrota azjatycka (*Centella asiatica*), będąca źródłem wielu cennych składników aktywnych.

Obserwowana w ostatnich latach w przemyśle ogromna popularność ekstraktów z wąkroty azjatyckiej oraz wyizolowanych z niej składników aktywnych skutkuje tym, że roślina w stanie naturalnym jest zagrożona wyginieciem. Metodą alternatywną wykorzystywaną w celu pozyskiwania dużej ilości biomasy z wąkroty azjatyckiej w celu otrzymywania z niej ekstraktów, jak również składników aktywnych biologicznie są kultury pędowe *in vitro*. Z technologicznego punktu widzenia, są one niezwykle istotne, ponieważ pozwalają w krótkim czasie pozyskać duże ilości biomasy, jak również, dzięki modyfikacji składu pożywki czy dodatku prekursorów wzrostu i elicytorów, można uzyskać roślinę bogatą w wybrane związki biologicznie czynne.

Celem projektu obejmującego pracę doktorską jest przeprowadzenie badań oceniających aktywność biologiczną surowca naturalnego w postaci wodnych wyciągów z rośliny *Centella asiatica* za pomocą wybranych metod *in vitro*.

Założono, że przedmiotem badań będą wodne wyciągi z wąkroty azjatyckiej pochodzące ze stanowiska szklarniowego (CA1) oraz z hodowli *in vitro* (CA2). Wyciągi są mieszaninami wielu różnych substancji, które znacznie różnią się zawartością głównych składników aktywnych azjatykozydu i madekasozydu. Z tego powodu zarówno azjatykozyd (AZJ), jak i madekasozyd (MAD) wykorzystano w badaniach jako związki referencyjne.

Cele badawcze postanowiono zrealizować stosując wybrane nowoczesne metody alternatywne *in vitro*, zgodne z najnowszymi wymogami narzuconymi przez ustawodawców, które umożliwiają szybką wstępną ocenę działania związków przy równoczesnym zachowaniu rzetelności uzyskanych wyników.

Przedstawione cele rozprawy doktorskiej zostaną zrealizowane w oparciu o szczegółowy plan pracy, na który składa się:

1. badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek sześciu linii komórkowych w kontekście bezpieczeństwa stosowania oraz potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej za pomocą testów o różnych mechanizmach działania oceniających:
 - a. funkcje mitochondriów (MTT)
 - b. aktywność lizosomów (z czerwienią obojętną)
2. badanie ochronnego wpływu wyciągów i saponin na żywotność astrocytów poddanych działaniu doksorubicyny w aspekcie aktywności glioprotekcyjnej
3. badanie wpływu wyciągów i saponin na aktywność migracyjną keratynocytów w teście zarastania rany *in vitro*
4. ocena działania przeciwłuszczycowego, przeciwstarzeniowego i przeciwnowotworowego badanych wyciągów i saponin, przy pomocy testu z fioletem krystalicznym
5. badanie aktywności antyoksydacyjnej w kierunku działania przeciwstarzeniowego i przeciwnowotworowego za pomocą testów o różnych mechanizmach działania:
 - a. test DPPH
 - b. test FRAP
 - c. test ROS-Glo™ H₂O₂
6. badanie aktywności mutagennej w teście Ames przy zastosowaniu dwóch szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100
7. badanie zdolności fotoprotekcyjnej poprzez pomiar właściwości absorpcyjnych w zakresie promieniowania UV

Wydaje się, że w ten sposób zaplanowane badania szacujące aktywność biologiczną i bezpieczeństwo stosowania wodnych ekstraktów z wąkroty azjatyckiej oraz jej dwóch głównych składników aktywnych, azjatykozydu i madekasozydu pozwolą odpowiedzieć na pytanie, który z nich charakteryzuje się silniejszą aktywnością, a także

czy jest ona uzależniona od oznaczonych składników aktywnych, azjatykozydu i madekasozydu zawartych w ekstraktach.

III. Materiały i metody

1. Materiały

1.1. Badane wyciągi

- **CA1** – wodny wyciąg z rośliny szklarniowej (0,4 µg/ml AZJ i 0,8 µg/ml MAD)
- **CA2** – wodny wyciąg z rośliny *in vitro* (0,03 µg/ml AZJ i 0,02 µg/ml MAD)

Nadziemne części rośliny *Centella asiatica* pochodziły z Ogrodu Roślin Leczniczych im. Prof. Mariana Koczwary znajdującego się przy Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Identyfikację rośliny przeprowadziła dr Ewa Skrzypczak-Pietraszek z Katedry Botaniki Farmaceutycznej UJ CM, która następnie wykorzystwała świeże, młode wierzchołki rośliny z hodowli szklarniowej do wyprowadzenia hodowli *in vitro*. Z biomasy pozyskanej z hodowli szklarniowej i z hodowli *in vitro* otrzymano wyciągi wodne: **CA1** i **CA2**, które były przedmiotem badań pracy doktorskiej.

Zawartość głównych związków aktywnych w wyciągach CA1 i CA2, czyli azjatykozydu (AZJ) i madekasozydu (MAD) została oznaczona przez dr Pawła Żmudzkiego z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM przy użyciu metody UPLC-MS/MS. Badane ekstrakty różniły się znacząco zawartością azjatykozydu i madekasozydu, na korzyść ekstraktu z rośliny szklarniowej, który zawierał 13 razy więcej azjatykozydu i aż 40 razy więcej madekasozydu.

1.2. Linie komórek eukariotycznych

Linie komórek prawidłowych

- Fibroblasty skóry ludzkiej (linia **BJ-5ta**, ATCC® CRL-4001™)
- Keratynocyty skóry ludzkiej (linia **HaCaT**, CLS Cell Lines Service, 300493)
- Astrocyty (linia **C8D1A**, ATCC® CRL-2541™)

Linie komórek nowotworowych

- Czerniak skóry (linia **A375**, ATCC® CRL-1619™)
- Czerniak skóry przerzut z płuca (linia **WM793**, ATCC® CRL-2806™)
- Nowotwór wątroby (linia **HepG2**, ATCC® HB-8065™)

1.3. Szczepy bakteryjne

- *Salmonella typhimurium* TA98
- *Salmonella typhimurium* TA100

Szczepy otrzymano od dr Takehiko Nohmi z Zakładu Genetyki i Mutagenezy Narodowego Instytutu Higieny, Tokio, Japonia.

1.4. Odczynniki i materiały

Pożywki hodowlane

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Lonza
DMEM HG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose)	Lonza
DMEM F-12 HAM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM)	Lonza
MEM (Minimal Essential Medium)	Lonza

Suplementy do pożywek hodowlanych

Płodowa surowica cielęca (FBS, ang. fetal bovine serum)	Lonza
Mieszanina antybiotyków 10000 U./ml Penicyliny i 10 mg/ml Streptomycyny i 25 µg/ml Amfoterycyny B	PAN BIOTECH

Sole fizjologiczne i bufony

Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS bez jonów Ca ²⁺ i Mg ²⁺)	POCH
---	------

Barwniki, reagenty

Czerwień obojętna (ang. neutral red)	Sigma Aldrich
Fiolet krystaliczny (ang. crystal violet)	Sigma Aldrich
Azjatykozyd	Sigma Aldrich
Chlorek żelaza (FeCl ₃)	VWR
Doksorubicyna	Sigma Aldrich
Kwas askorbinowy	Sigma Aldrich
Kwas galusowy	Sigma Aldrich
Kwas octowy bezwodny	VWR
Kwas solny (HCl)	Chempur

Madekasozyd	Sigma Aldrich
Octan sodu bezwodny	VWR
TPTZ (2,4,6-tripirydył-s-triazyny)	Sigma-Aldrich
Trolox	Sigma Aldrich
Winblastyna	Sigma Aldrich
TPTZ (2,4,6-tripirydylo-s-triazyna)	Fluoro-Chem
Oktokrylen	Sigma Aldrich

Zestawy komercyjne

Test żywotności MTT oparty o analizę kolorymetryczną	Cayman Chemical
Test antyoksydacyjny ROS-Glo™ H ₂ O ₂	Promega

Składniki pożywek do hodowli bakteryjnych

Agar	Merck
Azydek sodu	Sigma-Aldrich
Bulion odżywczy Oxoid Nr 2	Argenta
Chlorek sodu (NaCl)	Chempur
D-biotyna	Sigma-Aldrich
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma-Aldrich
Diwodorofosforan sodu (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Ekstrakt wołowy	Merck
Glicerol	Pharma Cosmetics
Glukoza	Sigma-Aldrich
Kwas cytrynowy	Sigma-Aldrich
L-histydyna HCl	Sigma-Aldrich
4-nitro-o-fenylodiamina (4-NPD)	Sigma-Aldrich
Neomycyna	Pharma Cosmetic
Pepton	Merck
Siarczan magnezu (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich
Woda do badań molekularnych	SPrime
Wodorofosforan potasu (K ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Wodorofosforan sodowo-amonowy (NaNH ₄ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Wodorofosforan sodu (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich

Pozostałe odczynniki

Alkohol etylowy 96%	POCH
---------------------	------

Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma-Aldrich
Kwas octowy	POCH
SDS (ang. ammonium persulfate)	Fluka Chemie
Trypsyna 1:250 z trzustki świńskiej	Sigma-Aldrich
Alkohol metylowy	POCH

Naczynia hodowlane, probówki

Butelki hodowlane o powierzchni 25 cm ²	Genoplast
Butelki hodowlane o powierzchni 50 cm ²	Genoplast
Kuweta polistyrenowa SEMIMIKRO do spektrofotometru	Greiner
Płytki hodowlane 6-, 12-, 24-, 96- dołkowe jałowe	Nest
Probówki plastikowe o pojemności 15 ml	Nest
Probówki plastikowe o pojemności 15 ml	Nest
Probówki typu Eppendorf	Genoplast
Szalki o średnicy 25 mm	Genoplast
Szalki o średnicy 45 mm	Genoplast
Szalki Petriego (60x15 mm)	Greiner
Płytki 96-dołkowe białe	Corning

Aparatura

Inkubator z dostępem do CO ₂	MEMMERT
Loża z nawiewem laminarnym	AQUARIA
Komora z nawiewem laminarnym	Alpina
Mieszadło magnetyczne MS2	IKA
Mikroskop jasnego pola odwrócony Nikon Eclipse TS 100F Z	Nikon
pH-metr	Schott
Spektrofotometr BioPhotometer	Eppendorf
Sterylizator Parowy 2100 Classic Standard	Prestige Medical
Termomikser Compact	Eppendorf
Waga analityczna	Radwag
Wirówka laboratoryjna MiniSpin	Eppendorf
Wirówka Eppendorf 5415R	CENTRIFUGE
Wytrząsarka orbitalna KS130	IKA
Wytrząsarka orbitalna 358A	Elpin-plus
Pipety automatyczne o różnych zakresach objętości 1-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 5000 µl	Eppendorf Research

Wytrząsarka do płytek	VWR
Spektrofotometr dwuwiązkowy	Hitachi U-2800
Czytnik mikropłytek Spectra Max ID3	Molecular Devices

1.5. Hodowla komórek eukariotycznych

Wszystkie komórki testowanych linii hodowano w naczyniach o powierzchni 25 cm² w odpowiednio dobranej pożywce hodowlanej wzbogaconej o 10% surowicę bydlęcą oraz 10000 U/ml penicyliny i 10 mg/ml streptomycyny i 25 µg/ml amfoterycyny B. Komórki w zależności od linii komórkowej pasażowano co 2-7 dni. W tym celu przepłukiwano je roztworem PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺, a następnie zalewano 1 ml 0,25% trypsyny w PBS. Po oderwaniu komórek od podłoża, trypsynę inaktywowano pożywką hodowlaną, a następnie wirowano powstałą zawiesinę (5 min, 240 x g). Po odwirowaniu komórki zawieszano w pożywce i rozlewano do kolejnych naczyń hodowlanych. Hodowle prowadzono w standardowych warunkach, w temperaturze 37°C w inkubatorze z dostępem do 5% CO₂. Informacje dotyczące hodowli zostały zamieszczone w tabeli 4.

Tabela 4 Linie komórek eukariotycznych i warunki ich hodowli.

	Linie nowotworowe			Linie prawidłowe		
Symbol	A375	WM793	HepG2	HaCaT	BJ-5ta	C8D1A
Pasaż komórkowy	3 dni	2 dni	5-7 dni	5-7 dni	5-7 dni	3-4 dni
Pożywka hodowlana	DMEM HG	DMEM F-12 HAM	MEM	DMEM		

1.6. Hodowle mikrobiologiczne

W dniu poprzedzającym eksperyment prowadzony przy użyciu testu Ames, założono hodowlę bakteryjną szczepów *Salmonella typhimurium* TA97 i TA100. Komórki bakteryjne wyjęto z banku komórkowego (zamrażarka -80°C). Po ich rozmrożeniu w temperaturze pokojowej, 200 µl szczepu bakteryjnego zaszczepiono w 20 ml bulionu odżywczego Oxoid. Hodowlę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

1.7. Roztwory podstawowe i robocze

- *Roztwór podstawowy CA1 i CA2 o stężeniu 20 mg/ml*

20 mg suchej masy odpowiedniego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej rozpuszczono w 1000 µl wody. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując roztwory robocze CA1 i CA2 (tabela 5).

Tabela 5 Przygotowanie roztworów roboczych CA1 i CA2.

Stężenie roztworu roboczego (mg/ml)	Roztwór podstawowy 20 mg/ml (µl)	Woda (µl)
0,6	30	970
1	50	950
1,4	70	930
2	100	900
6	300	700
10	500	500
14	700	300
20	1000	0

- *Roztwór podstawowy CA1 i CA2 o stężeniu 10 mg/ml*

10 mg suchej masy odpowiedniego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej rozpuszczono w 1000 µl wody. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując sześć roztworów roboczych CA1 i CA2 (tabela 6, str. 69).

Tabela 6 Przygotowanie roztworów roboczych CA1 i CA2.

Stężenie roztworu roboczego ($\mu\text{g/ml}$)	Roztwór podstawowy 10 mg/ml (μl)	Pożywka hodowlana (μl)
0	0	1000
50	5	995
100	10	990
200	20	980
500	50	950
700	70	930
1000	100	900

- *Roztwór roboczy CA1, CA2 o stężeniu 3,33 mg/ml*

Na wadze analitycznej odważono 3,33 mg ekstraktu, który rozpuszczono w 1000 μl wody lub DMSO, z którego po pobraniu 50 μl i dodaniu do mieszaniny reakcyjnej uzyskano stężenie 0,1 mg/płytką.

- *Roztwór roboczy CA1, CA2 o stężeniu 16,665 mg/ml*

Na wadze analitycznej odważono 16,665 mg ekstraktu który rozpuszczono w 1000 μl wody lub DMSO, z którego po pobraniu 50 μl i dodaniu do mieszaniny reakcyjnej uzyskano stężenie 0,5 mg/płytką.

- *Roztwór roboczy CA1, CA2 o stężeniu 33,33 mg/ml*

Na wadze analitycznej odważono 33,33 mg ekstraktu, który rozpuszczono w 1000 μl wody lub DMSO, z którego po pobraniu 50 μl i dodaniu do mieszaniny reakcyjnej uzyskano stężenie 1 mg/płytką.

- *Roztwór roboczy CA1, CA2 o stężeniu 41,66 mg/ml*

Na wadze analitycznej odważono 41,66 mg ekstraktu, który rozpuszczono w 1000 μl wody lub DMSO, z którego po pobraniu 50 μl i dodaniu do mieszaniny reakcyjnej uzyskano stężenie 1,25 mg/płytką.

- *Roztwór roboczy CA1, CA2 o stężeniu 83,325 mg/ml*

Na wadze analitycznej odważono 83,325 mg ekstraktu, który rozpuszczono w 1000 μ l wody lub DMSO, z którego po pobraniu 50 μ l i dodaniu do mieszaniny reakcyjnej uzyskano stężenie 2,5 mg/płytką.

- *Roztwór podstawowy azjatykozydu o stężeniu 1 mg/ml*

1 mg azjatykozydu rozpuszczono w 300 μ l etanolu, a następnie dopełniono do 1000 μ l wodą.

- *Roztwór podstawowy azjatykozydu o stężeniu 0,4 μ g/ml*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano 1 μ l i dopełniono 2,5 ml pożywki hodowlanej odpowiedniej dla każdej linii komórkowej. W ten sposób otrzymano roztwór podstawowy o stężeniu azjatykozydu równym 0,4 μ g/ml. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując pięć roztworów roboczych (tabela 7).

Tabela 7 Przygotowanie roztworów roboczych azjatykozydu.

Stężenie roztworu roboczego (μ g/ml)	Roztwór podstawowy 0,4 μ g/ml (μ l)	Pożywka hodowlana (μ l)
0	0	1000
0,04	100	900
0,08	200	800
0,2	500	500
0,25	700	300
0,4	1000	0

- *Roztwór podstawowy azjatykozydu o stężeniu 0,03 μ g/ml*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano 1 μ l i dopełniono 33,34 ml pożywki hodowlanej odpowiedniej dla każdej linii komórkowej. W ten sposób otrzymano roztwór podstawowy o stężeniu azjatykozydu równym 0,03 μ g/ml. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując pięć roztworów roboczych (tabela 8, str. 71).

Tabela 8 Przygotowanie roztworów roboczych azjatykozydu.

Stężenie roztworu roboczego ($\mu\text{g/ml}$)	Roztwór podstawowy $0,03 \mu\text{g/ml}$ (μl)	Pożywka hodowlana (μl)
0	0	1000
0,003	100	900
0,006	200	800
0,015	500	500
0,02	700	300
0,03	1000	0

- *Roztwór roboczy azjatykozydu o stężeniu $80 \mu\text{M}$*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano $76,73 \mu\text{l}$ i dopełniono $923,27 \mu\text{l}$ wody uzyskując roztwór roboczy stężeniu $80 \mu\text{M}$. Z roztworu roboczego pobierano $100 \mu\text{l}$ i dodawano bezpośrednio do dołków płytki eksperymentalnej uzyskując stężenie $40 \mu\text{M}$ azjatykozydu w dołku.

- *Roztwór podstawowy madekasozydu o stężeniu 1 mg/ml*

1 mg madekasozydu rozpuszczono w 500 ml etanolu, a następnie dopełniono do $1000 \mu\text{l}$ wodą.

- *Roztwór podstawowy madekasozydu o stężeniu $0,8 \mu\text{g/ml}$*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano $1 \mu\text{l}$ i dopełniono $1,25 \text{ ml}$ pożywki odpowiedniej dla każdej linii komórkowej. W ten sposób otrzymano roztwór podstawowy o stężeniu madekasozydu równym $0,8 \mu\text{g/ml}$. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując pięć roztworów roboczych (tabela 9, str. 72).

Tabela 9 Przygotowanie roztworów roboczych madekasozydu.

Stężenie roztworu roboczego ($\mu\text{g/ml}$)	Roztwór podstawowy $0,8 \mu\text{g/ml}$ (μl)	Pożywka hodowlana (μl)
0	0	1000
0,08	100	900
0,16	200	800
0,4	500	500
0,6	700	300
0,8	1000	0

- *Roztwór podstawowy madekasozydu o stężeniu $0,02 \mu\text{g/ml}$.*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano $1 \mu\text{l}$ i dopełniono $62,5 \text{ ml}$ pożywki odpowiedniej dla każdej linii komórkowej. W ten sposób otrzymano roztwór podstawowy o stężeniu madekasozydu równym $0,02 \mu\text{g/ml}$. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując pięć roztworów roboczych (tabela 10).

Tabela 10 Przygotowanie roztworów roboczych madekasozydu.

Stężenie roztworu roboczego ($\mu\text{g/ml}$)	Roztwór podstawowy $0,02 \mu\text{g/ml}$ (μl)	Pożywka hodowlana (μl)
0	0	1000
0,002	100	900
0,003	200	800
0,008	500	500
0,01	700	300
0,02	1000	0

- *Roztwór podstawowy oktokrylenu o stężeniu 1 mg/ml*

1 mg oktokrylenu, rozpuszczono w $1000 \mu\text{l}$ metanolu.

- *Roztwór roboczy oktokrylenu o stężeniu 10 µg/ml*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano 10 µl i dopełniono 990 µl metanolu otrzymując roztwór roboczy o stężeniu 10 µg/ml.

- *Roztwór podstawowy kwasu galusowego o stężeniu 20 mg/ml*

20 mg kwasu galusowego rozpuszczono w 1000 µl wody. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując roztwory robocze kwasu galusowego (tabela 11).

Tabela 11 Przygotowanie roztworów roboczych kwasu galusowego.

Stężenie roztworu roboczego (µg/ml)	Roztwór podstawowy 20 mg/ml (µl)	Woda (µl)
600	30	970
1000	50	950
1400	70	930
2000	100	900

- *Roztwór podstawowy kwas galusowego o stężeniu 1 mg/ml*

1 mg kwasu galusowego, który rozpuszczono w 1000 µl wody destylowanej.

- *Roztwór roboczy kwasy galusowego o stężeniu 80 µM*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano 13,61 µl i dopełniono 986,39 µl wody otrzymując roztwór roboczy o stężeniu 80 µM. Z roztworu roboczego pobierano 100 µl i dodawano bezpośrednio do dołków płytki eksperymentalnej uzyskując stężenie 40 µM kwasu galusowego w dołku.

- *Roztwór podstawowy kwasu askorbinowego o stężeniu 2 mg/ml*

2 mg kwasu askorbinowego, rozpuszczono w 1000 µl wody destylowanej, uzyskując roztwór podstawowy o stężeniu 2 mg/ml. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując 6 roztworów roboczych kwasu askorbinowego (tabela 12, str. 74).

▪ *Roztwór podstawowy Troloksu o stężeniu 2 mg/ml*

2 mg Troloksu (kwasu 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowego), rozpuszczono w 1000 µl wody destylowanej, uzyskując roztwór podstawowy o stężeniu 2 mg/ml. Następnie dokonano seryjnych rozcieńczeń otrzymując 6 roztworów roboczych Troloksu (tabela 12).

Tabela 12 Przygotowanie roztworów roboczych kwasu askorbinowego i Troloksu.

Stężenie roztworu roboczego (mg/ml)	Roztwór podstawowy 2 mg/ml (µl)	Woda (µl)
0,2	20	180
0,4	40	160
0,8	80	120
1,2	120	80
1,6	160	40
2	200	0

▪ *Roztwory podstawowe dokсорubicyny i winblastyny o stężeniu 1 mg/ml*

1 mg dokсорubicyny lub winblastyny rozpuszczono w 1000 µl wody, otrzymując roztwór podstawowy o stężeniu 1 mg/ml.

▪ *Roztwory robocze dokсорubicyny i winblastyny o stężeniu 50 i 100 µg/ml*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml pobrano 50 i 100 µl, które dopełniono 950 i 900 µl pożywki hodowlanej otrzymując dwa roztwory robocze o stężeniu 50 i 100 µg/ml chemioterapeutyku.

▪ *Roztwór podstawowy dokсорubicyny o stężeniu 1800 µM*

1 mg dokсорubicyny rozpuszczono w 1000 µl wody, otrzymując roztwór podstawowy o stężeniu 1800 µM.

▪ *Roztwór roboczy dokсорubicyny o stężeniu 500 μM*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 1800 μM pobrano 277,77 μl i dopełniono do 1000 μl wodą.

▪ *Roztwór roboczy dokсорubicyny o stężeniu 20 μM*

Z roztworu roboczego o stężeniu 500 μM pobrano 40 μl i dopełniono do 1000 μl wodą.

▪ *Roztwór roboczy dokсорubicyny o stężeniu 5 μM*

Z roztworu roboczego o stężeniu 500 μM pobrano 10 μl i dopełniono 990 μl pożywki hodowlanej.

▪ *Roztwór roboczy dokсорubicyny o stężeniu 1 μM*

Z roztworu roboczego o stężeniu 20 μM pobrano 50 μl i dopełniono 950 μl pożywki hodowlanej.

▪ *Roztwory podstawowe mutagenów wzorcowych 4-nitro-o-fenylendiaminy (TA98) i azydku sodu (TA100) o stężeniu 16,66 mg/ml*

16,66 mg mutagenu, rozpuszczono w 1000 μl wody do badań molekularnych (azydek sodu) lub 1000 μl DMSO (4-nitro-o-fenylendiamina).

▪ *Roztwory robocze mutagenów wzorcowych 4-nitro-o-fenylendiaminy (TA98) i azydku sodu (TA100)*

Z roztworu podstawowego o stężeniu 16,66 mg/ml pobrano 166,6 μg i dopełniono do 1000 μl wodą do badań molekularnych lub DMSO. Z roztworu roboczego pobierano 50 μl i dodawano bezpośrednio do sterylnych probówek eksperymentalnych, uzyskując stężenie mutagenu 5 μg na płytkę.

1.8. Przygotowanie buforów i roztworów

- *0,5 mM roztwór histydyny i biotyny*

124 mg D-biotyny i 96 mg chlorowodoru L-histydyny, rozpuszczono w 1000 ml wody destylowanej. Powstały roztwór wysterylizowano. Po wystudzeniu roztwór wykorzystano do przygotowania agaru powierzchniowego (*Top agar*).

- *Roztwór soli Vogel-Bonner (VB salts)*

Tabela 13 Skład roztworu soli Vogel-Bonner.

Składniki	Ilość
Siarczan magnezu $MgSO_4 \times H_2O$	10 g
Kwas cytrynowy jednowodny	100 g
Wodorofosforan potasu (K_2HPO_4)	500 g
Wodorofosforan sodowo-amonowy ($NaNH_4HPO_4$)	175 g
Woda destylowana	650 ml

Wszystkie składniki odważono na wadze analitycznej. Następnie, stale mieszając, rozpuszczono kolejno składniki w wodzie destylowanej, podgrzanej uprzednio do temperatury 50°C. Powstały roztwór soli wysterylizowano i wykorzystano do przygotowania podłoża minimalnego (*Bottom agar*).

- *10% roztwór glukozy*

100 g glukozy, rozpuszczono w 700 ml wody destylowanej. Powstały roztwór wysterylizowano. Po wystudzeniu roztwór wykorzystano do przygotowania podłoża minimalnego (*Bottom agar*).

- *0,1 M bufor fosforanowy pH=7,4*

Tabela 14 Skład 0,1 M buforu fosforanowego.

Składniki i ich przygotowanie	Objętość [ml]
1,38 g odczynnika sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) zmieszano ze 100 ml wody destylowanej i wysterylizowano	12
1,42 g odczynnika sodium phosphate dibasic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) zmieszano ze 100 ml wody destylowanej i wysterylizowano	88

- *Roztwór barwiący czerwieni obojętnej*

40 mg barwnika czerwieni obojętnej, rozpuszczono w 10 ml PBS otrzymując roztwór barwnika. Następnie, 24 godziny przed eksperymentem 120 μl roztworu barwnika rozpuszczano w 12 ml pożywki hodowlanej odpowiedniej dla badanej linii komórkowej wzbogaconej w 1% surowicę bydlęcą. Tak przygotowany roztwór przechowywano w ciemności w temperaturze 37°C.

- *Roztwór odbarwiający czerwieni obojętnej*

Roztwór odbarwiający przygotowywano poprzez zmieszanie ze sobą 45 ml 96% etanolu, 45 ml wody dejonizowanej i 0,9 ml lodowatego kwasu octowego.

- *Roztwór barwiący fioletu krystalicznego (0,5%)*

0,5 g barwnika fioletu krystalicznego, rozpuszczono w 80 ml wody destylowanej. Następnie do powstałego roztworu dodano 20 ml metanolu.

- *Roztwór odczynnika DPPH*

19,71 mg odczynnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu), który rozpuszczono w 10 ml metanolu. W ten sposób otrzymano roztwór o stężeniu 5 mM DPPH. Następnie z roztworu o stężeniu 5 mM pobrano 4 ml, które rozcieńczono w 36 ml metanolu. W ten sposób otrzymano próbkę o stężeniu 0,5 mM DPPH. Z roztworu o stężeniu 0,5 mM DPPH

pobierano objętości 100 μl i dodawano bezpośrednio do dołków płytki eksperymentalnej.

- 20 mM/L roztwór $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

10,8 mg FeCl_3 , który rozpuszczono w 2 ml wody destylowanej.

- 40 mM HCl

Pobrano 30 μl 10% HCl, który zmieszano z 1970 μl wody destylowanej.

- 10 mM/L roztwór TPTZ

6,25 mg TPTZ (2,4,6-tripirydylo-s-triazyny), którą rozpuszczono w 2 ml 40 mM HCl.

- 300mM/L bufor octanowy (pH=3,6)

62 mg octanu sodu, który rozpuszczono w 320 μl kwasu octowego i uzupełniono do 20 ml wodą destylowaną.

- Roztwór odczynnika FRAP

Połączono ze sobą 20 ml 300mM/L buforu octanowego, 2 ml 10 mM/L roztworu TPTZ i 2 ml 20 mM/L roztworu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Powstały roztwór podgrzano do temp. 37°C.

1.9. Podłoża mikrobiologiczne

▪ *Bulion odżywczy*

Hodowlę i namnażanie szczepów bakteryjnych *Salmonella typhimurium* prowadzono w bulionie odżywcym Oxoid nr 2, który przygotowano poprzez rozpuszczenie 25 g odczynnika Oxoid nutrient broth #2 w 1000 ml wody destylowanej. Po wysterylizowaniu i wystudzeniu, bulion przechowywano w lodówce.

▪ *Agar powierzchniowy (Top agar, TA)***Tabela 15** Skład agaru powierzchniowego.

Składniki	Ilość
Agar	6 g
Chlorek sodu	6 g
Roztwór histydyny i biotyny	100 ml
Woda destylowana	900 ml

Wszystkie składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej. Następnie powstały roztwór wysterylizowano. Po ostygnięciu do około 60°C, w warunkach jałowych, rozlano do 50 ml kolb Erlenmayera i pozostawiono do zestalenia.

▪ *Podłoże minimalne (Bottom agar, BA)***Tabela 16** Skład podłoża minimalnego.

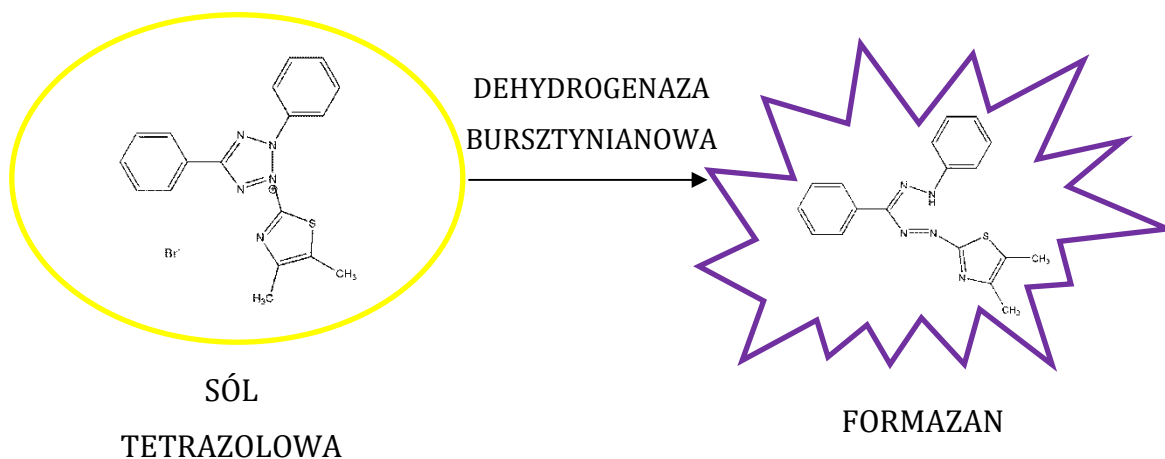
Składniki	Ilość
Agar	15 g
Roztwór soli Vogel-Bonner	20 ml
10% roztwór glukozy	50 ml
Woda destylowana	900 ml

Wszystkie składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej. Następnie powstały roztwór wysterylizowano. Po ostygnięciu do około 60°C, w warunkach jałowych, rozlano na szalki Petriego i pozostawiono do zestalenia.

2. Metodyka badań

2.1. Test redukcji soli tetrazolowej do formazanu (MTT)

Wpływ testowanych wyciągów CA1, CA2 oraz azjatykozydu i madekasozydu na żywotność komórek oceniono za pomocą komercyjnie dostępnego testu redukcji soli tetrazolowej do formazanu (MTT). Jest to test umożliwiający pomiar aktywności metabolicznej w mitochondriach. W tym teście żywotność komórek jest mierzona na podstawie reakcji redukcji rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej, barwy żółtej, do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu, koloru ciemnoniebieskiego, który po przeprowadzonej reakcji wytrąca się w postaci ciemnoniebieskich kryształków. Ilość formazanu jest równa aktywności oksydacyjnej mitochondriów, a w warunkach doświadczalnych, również liczbie aktywnych metabolicznie (żywych) komórek. Redukcja soli tetrazolowych do formazanu jest możliwa dzięki działaniu dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu, który jest aktywny jedynie w komórkach o niezmiennym metabolizmie. Powstały w komórkach formazan jest rozpuszczany za pomocą rozpuszczalnika (*Crystal Dissolving Solution*). Absorbancja powstałego roztworu (długość fali 570 nm) koreluje z liczbą żywych, aktywnie proliferujących komórek. Zasada działania testu została przedstawiona na rycinie 7.



Rycina 7 Zasada działania testu MTT.

Komórki wszystkich badanych linii wysiewano 24 godziny przed eksperymentem na 96 dołkowe płytki hodowlane w gęstości 5×10^3 komórek na dołek w odpowiedniej dla danej linii komórkowej pożywce. Po tym czasie zmieniano pożywkę na świeżą

bez badanych związków (kontrola), z badanymi wyciągami (CA1 i CA2) w stężeniach 100, 200, 500, 700, 1000 $\mu\text{g/ml}$ lub z badanymi saponinami (AZJ i MAD) w stężeniach odpowiadających ich zawartości w testowanych wyciągach podanych w tabelach 17 i 18, str. 95. Każdą z prób badano w 6 powtórzeniach. Jako kontrolę referencyjną w teście wykorzystano chemioterapeutyki o działaniu cytotoksycznym, winblastynę lub doksorubicynę w stężeniach 50 i/lub 100 $\mu\text{g/ml}$. Komórki inkubowano przez 24 godziny w obecności testowanych wyciągów, saponin i chemioterapeutyków. Pożywka hodowlana wykorzystana do przygotowania roztworów poszczególnych związków była wzbogacona o 1% surowicę bydlęcą. Po upływie 24 godzin do każdego dołka płytki dodawano 10 μl przygotowanego wcześniej odczynnika MTT (MTT reagent). Następnie płytkę wytrząsano delikatnie przez 1 minutę (20 rpm) na wytrząsarce do płytek, po czym komórki inkubowano przez 4 godziny w inkubatorze do hodowli komórkowych. Po tym czasie, powstały formazan pojawił się w postaci ciemnofioletowych kryształów na dnie dołków. Następnie, delikatnie zebrano płyn z każdego dołka, tak aby nie uszkodzić warstwy komórek na jego dnie. Do każdego dołka dodano 100 μl roztworu (crystal dissolving solution), który podczas 4 godzinnej inkubacji rozpuszczał kryształy formazanu. Ostatecznie pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 570 nm w czytniku mikropłytek. Doświadczenie powtarzano trzykrotnie.

Procent żywych komórek obliczono na podstawie wzoru:

$$\% \text{ żywych komórek} = 100\% \times (A/B)$$

A - średnia wartość absorbancji uzyskana z próby z badaną substancją

B - średnia wartość absorbancji uzyskana z próby kontrolnej

Otrzymane wyniki odniesiono do próby kontrolnej, którą stanowiły komórki nie traktowane żadną z badanych substancji. Im wyższy był procent żywych komórek, tym silniej badane substancje stymulowały ich żywotność. Im niższy był procent żywych komórek, tym silniejsze było działanie hamujące żywotność, a nawet cytotoksyczne badanych substancji.

2.2. Badanie glioprotekcji przy użyciu testu MTT

Badanie aktywności glioprotekcyjnej testowanych wyciągów CA1, CA2 oraz AZJ i MAD szacujące ich działanie ochronne w stosunku do uszkodzeń wywoływanych przez doksorubicynę względem astrocytów oceniono wykorzystując test MTT.

Astrocyty zostały wybrane jako model komórkowy do oceny aktywności glioprotekcyjnej. Natomiast doksorubicynę, związek o działaniu cytotoksycznym wykorzystano do wywołania fizjologicznych zaburzeń i postępujących uszkodzeń w komórkach glejowych.

Badanie glioprotekcji zaplanowano w dwóch wariantach, pierwszy z nich zakładał preinkubację astrocytów z CA1, CA2 oraz AZJ i MAD, a dopiero w następnej kolejności aplikację doksorubicyny. W drugim wariacie, założono z kolei jednoczesną inkubację testowanych wyciągów lub saponin wraz z doksorubicyną i astrocytami.

▪ Preinkubacja astrocytów z badanymi wyciągami lub saponinami

Komórki astrocytów wysiano 24 godziny przed eksperymentem na 96 dołkowe płytki hodowlane w gęstości 5×10^3 komórek na dołek. Po tym czasie zmieniano pożywkę na świeżą bez badanych związków (kontrola), z wyciągami (CA1 lub CA2) w stężeniach 500, 600, 1000 $\mu\text{g/ml}$ czy z saponinami (AZJ lub MAD) w stężeniach odpowiadających ich zawartości w testowanych wyciągach podanych w tabelach 17 i 18, str. 95. Każdą z prób badano w 6 powtórzeniach. Komórki inkubowano przez 24 godziny w obecności testowanych związków. Pożywka hodowlana wykorzystana do przygotowania roztworów poszczególnych związków była wzbogacona o 1% surowicę bydlęcą. Po tym czasie zebrano płyn z dołek i zmieniono na pożywkę świeżą bez badanych związków (kontrola) i z doksorubicyną w stężeniach 1 i 5 μM dodaną do każdego dołka, w którym komórki przez poprzednie 24 godziny były inkubowane w obecności testowanych związków. Po 24 godzinach inkubacji przeprowadzono test MTT.

▪ Inkubacja astrocytów z badanymi wyciągami lub saponinami jednocześnie z doksorubicyną

Komórki astrocytów wysiano 24 godziny przed eksperymentem na 96 dołkowe płytki hodowlane w gęstości 10×10^3 komórek na dołek. Po tym czasie zmieniano pożywkę na świeżą bez badanych związków (kontrola), z wyciągami (CA1 lub CA2) w stężeniach 500, 600, 1000 $\mu\text{g/ml}$ oraz doksorubicyną w stężeniu

1 lub 5 μM lub z badanymi saponinami (AZJ lub MAD) w stężeniach odpowiadających ich zawartości w testowanych wyciągach podanych w tabelach 17 i 18, str. 95 oraz doksorubicyną w stężeniu 1 i 5 μM . Do dołka płytki inkubacyjnej dodano 100 μl roztworu badanych substancji i 100 μl roztworu doksorubicyny. Pożywka hodowlana wykorzystana do przygotowania roztworów poszczególnych związków była wzbogacona o 1% surowicę bydlęcą. Każdą z prób badano w 6 powtórzeniach. Komórki inkubowano przez 24 godziny w obecności testowanych wyciągów, saponin i doksorubicyny. Po 24 godzinach inkubacji przeprowadzono test MTT.

2.3. Test oceniający aktywność endocytarną komórek (z czerwienią obojętną)

Wpływ testowanych wyciągów CA1, CA2 oraz azjatykozydu i madekasozydu na żywotność komórek oszacowano również za pomocą testu z czerwienią obojętną. Słabo kationowy barwnik czerwień obojętna penetruje do wnętrza żywych komórek, przez błonę komórkową, na zasadzie niejonowej dyfuzji biernej i akumuluje się w jej organelach o kwaśnym pH np. z lizosomach. W związku z tym, ilość zatrzymanego barwnika jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Po utrwaleniu wybarwionych komórek stosuje się roztwór odbarwiający, który uwalnia związany barwnik do roztworu. Ilość barwnika zostaje wyznaczona kolorymetrycznie (pomiar absorbancji przy długości fali 540 nm) i jest proporcjonalna do liczby żywych komórek w ściśle określonych warunkach eksperymentu.

Komórki wszystkich linii wysiewano 24 godziny przed eksperymentem na 96 dołkowe płytki hodowlane w gęstości 5×10^4 komórek na dołek w odpowiedniej pożywce hodowlanej. Po tym czasie zmieniano pożywkę na świeżą bez badanych związków (kontrola), z badanymi wyciągami (CA1 i CA2) w stężeniach 100, 200, 500, 700, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lub z badanymi saponinami (AZJ i MAD) w stężeniach odpowiadających ich zawartości w testowanych wyciągach podanych w tabelach 17 i 18, str. 95. Każdą z prób badano w 6 powtórzeniach. Komórki inkubowano przez 24 godziny w obecności testowanych wyciągów i saponin. Pożywka hodowlana wykorzystana do przygotowania roztworów poszczególnych związków była wzbogacona o 1% surowicę bydlęcą. Po upływie 24 godzinnej inkubacji komórek z testowanymi związkami zbierano płyn hodowlany znad komórek, a pozostałe komórki przepłukiwano 150 μl PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Następnie do każdego dołka dodano 100 μl uprzednio przygotowanego roztworu

barwiącego czerwieni obojętnej i inkubowano komórki przez 2-4 godziny w inkubatorze do hodowli komórkowych. Po tym czasie zebrano płyn znad komórek, a pozostałe komórki przepłukiwano 150 μ l PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Następnie do każdego dołka dodano 150 μ l roztworu odbarwiającego i umieszczono płytkę na wytrząsarce do płytek na 10 min (20 rpm). Ostatecznie mierzono absorbancję powstałego roztworu przy długości fali 540 nm w czytniku mikroplątek. Procent żywych komórek obliczano analogicznie jak w teście MTT. Doświadczenie powtórzono trzykrotnie.

2.4. Test z fioletem krystalicznym

Test z fioletem krystalicznym jest wykorzystywany do oceny aktywności proliferacyjnej komórek i polega na ilościowym pomiarze syntezy DNA. Barwnik fiolet krystaliczny wnika do wnętrza żywych komórek, wiąże się stechiometrycznie z DNA, które następnie barwi. Komórki, które ulegają śmierci komórkowej tracą przyleganie do podłoża i są następnie usuwane z populacji komórek, zmniejszając tym samym ilość wybarwionych komórek. Następnie barwnik jest usuwany z komórek żywych do roztworu, którego absorbancja jest mierzona przy długości fali 540 nm i jest proporcjonalna do liczby proliferujących komórek.

Komórki wszystkich linii wysiewano 24 godziny przed eksperymentem na 96 dołkowe płytki hodowlane w gęstości 5×10^3 komórek na dołek w odpowiedniej pożywce hodowlanej. Po tym czasie zmieniano pożywkę na świeżą bez badanych związków (kontrola), z badanymi wyciągami (CA1 i CA2) w stężeniach nietoksycznych dla komórek danej linii lub z badanymi saponinami (AZJ i MAD) w stężeniach odpowiadających ich zawartości w testowanych wyciągach podanych w tabelach 17 i 18, str. 95. Każdą z prób badano w 6 powtórzeniach. Komórki inkubowano przez 24 i 72 godziny w obecności testowanych wyciągów i saponin.

Po inkubacji w obecności badanych związków zbierano płyn hodowlany znad komórek, a pozostałe na płytce komórki przepłukiwano 150 μ l wody jałowej. Następnie do każdego dołka dodano 50 μ l roztworu barwnika fioleto krystalicznego. Komórki inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce do płytek z prędkością wytrząsania 20 rpm. Po tym czasie zebrano roztwór znad komórek, a płytkę czterokrotnie przepłukano, aby pozbyć się niezaabsorbowanego przez komórki barwnika. Pozostałości płynu odpipetowano. Płytkę bez pokrywki

suszono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po tym czasie do każdego dołka dodano 200 μ l metanolu i inkubowano płytkę na wytrząsarce (20 rpm), w temperaturze pokojowej przez 20 minut. W tym czasie barwnik został usunięty do roztworu. Ostatecznie mierzono absorbancję powstałego roztworu przy długości fali 570 nm w czytniku mikroplatek. Procent żywych komórek obliczano analogicznie jak w teście MTT. Doświadczenie powtórzono trzykrotnie.

2.5. Badanie wpływu wyciągów na ruch kolektywny komórek HaCaT

▪ Test zarastania rany *in vitro*

Test zarastania rany *in vitro* został wykorzystany do oceny wpływu testowanych wyciągów i saponin na tempo zarastania mechanicznie wytworzonej rany w jednowarstwowej hodowli komórek HaCaT, w warunkach doświadczalnych odwzorowującej ranę. Keratynocyty zostały wykorzystane w eksperymencie jako model, na którym zbadano wpływ testowanych wyciągów na proces naskórkowania rany.

Komórki wysiewano na 24 dołkowe płytki hodowlane w gęstości 5×10^5 komórek na dołek. Następnie komórki hodowano przez 24 godziny do osiągnięcia pełnej konfluencji. Po tym czasie zmieniano pożywkę DMEM na świeżą bez badanych związków (kontrola), z badanymi wyciągami (CA1 i CA2) w stężeniach 100 i 500 μ g/ml lub z badanymi saponinami (AZJ i MAD) w stężeniach odpowiadających ich zawartości w testowanych wyciągach podanych w tabelach 17 i 18, str. 95. Komórki inkubowano przez 24 godziny w obecności testowanych wyciągów i saponin. Godzinę przed rozpoczęciem obrazowania, mechanicznie wykonano rany na każdej hodowli jednowarstwowej. Do wykonania rany użyto jednorazowej, sterylnej 100 μ l końcówki pipety automatycznej. Następnie, każdą hodowlę dokładnie przepłukano roztworem PBS i dodano czystą pożywkę hodowlaną lub pożywkę z testowanymi wyciągami CA1, CA2 lub azjatykozydem, madekasozydem. Następnie przez 14 godzin z 15-minutowym krokiem czasowym wykonywano poklatkową rejestrację obrazu w celu oszacowania migracji komórek. Eksperyment powtórzono trzykrotnie.

Do analizy wpływu testowanych wyciągów i saponin na tempo zarastania rany wykorzystano program ImageJ 1.51n z rozszerzeniem MRI Wound Healing, który automatycznie wyodrębnia marginesy każdej rany. Program określa ilościowo obszar rany lub obszar pokryty przez migrujące komórki. Powierzchnię rany, która jest

pokrywana przez zbiorowo migrujące komórki obliczono na podstawie zmniejszającego się pola powierzchni rany w punkcie początkowym i po 14 godzinach w momencie skończenia eksperymentu. Otrzymane wyniki są średnią wartością uzyskaną z 10 pól widzenia przypadających na jeden warunek doświadczalny.

2.6. Testy aktywności antyoksydacyjnej

▪ Test DPPH

Badając aktywność antyoksydacyjną związków wykorzystuje się ich zdolność do dezaktywacji wolnych rodników tlenowych. W warunkach laboratoryjnych takiego pomiaru można dokonać wykorzystując odczynnik DPPH (1-1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) będący stabilnym kationorodnikiem. DPPH posiada niesparowany elektron na powłoce walencyjnej, na jednym z atomów azotu tworzących mostek azotowy. Etanolowy roztwór odczynnika DPPH posiada ciemnofioletowe zabarwienie o maksimum absorpcji przy długości fali 517 nm. W reakcji z substancją będącą antyoksydantem, czyli mogącą oddać atom wodoru, DPPH tworzy formę zredukowaną, a jego roztwór traci fioletowe zabarwienie i zmienia kolor na żółty. Spadek absorpcji roztworu jest proporcjonalny do ilości formy utlenionej 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu, jaka pozostaje w roztworze. Przebieg eksperymentu przedstawiono na rycinie 8, str. 88. W teście jako związek referencyjny użyto kwas galusowy – uznaną substancję o aktywności antyoksydacyjnej. Do dołków płytki 96-dołkowej dodano 100 μ l wody (próbka kontrolna), roztworów roboczych CA1, CA2 (tabela 5, str. 68), roztworu roboczego AZJ o stężeniu 80 μ M i kwasu galusowego (tabela 11, str. 73) oraz roztworu roboczego kwasu galusowego o stężeniu 80 μ M. Następnie do każdego dołka dodano po 100 μ l roztworu odczynnika DPPH. Wyciągi CA1 i CA2 badano w stężeniach 300, 500, 700 i 1000 μ g/ml. Azjatykozyd w stężeniu 40 μ M. Każdą z prób badano w 6 powtórzeniach. Po naniesieniu prób badanych i odczynnika DPPH, płytkę inkubowano przez 30 i 60 minut w ciemności, w temperaturze 37°C. Po inkubacji zmierzono absorbancję powstałego roztworu przy długości fali 517 nm w czytniku mikropłytek. Eksperyment powtórzono trzy razy.

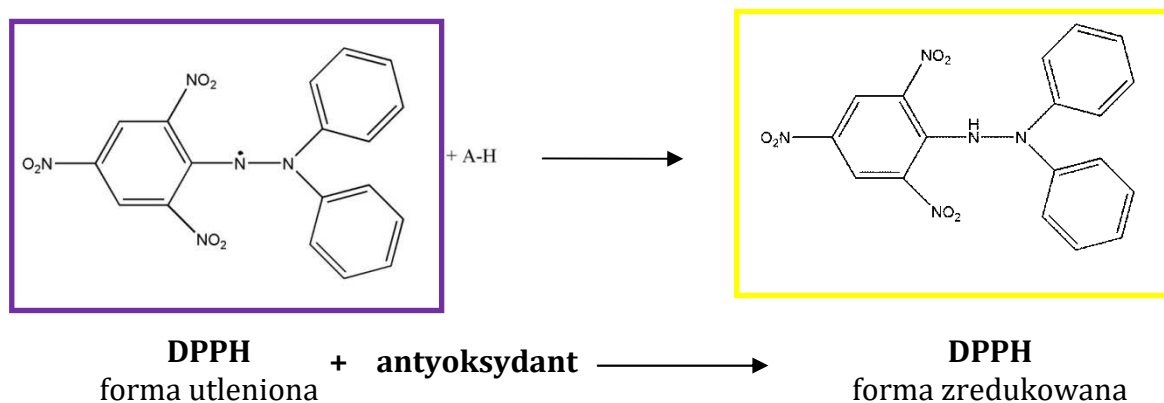
Całkowitą zdolność badanych substancji do przeciwdziałania reakcji utleniania obliczono ze wzoru:

$$\% \text{inhibicji} = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$$

A_0 - absorbancja próby kontrolnej (roztwór rodnika DPPH)

A_s - średnia wartość absorbancji próby badanej

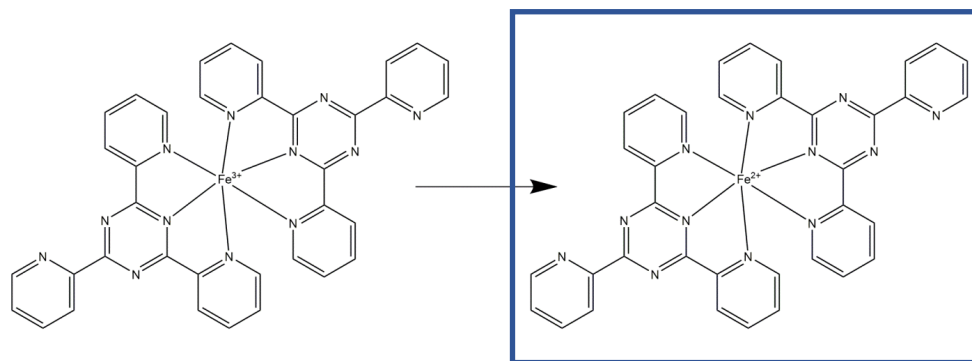
Otrzymane wyniki przedstawiono porównując % inhibicji substancji badanych w określonych stężeniach z substancją referencyjną kwasem galusowym, silnym antyoksydantem, posiadającym zdolność dezaktywacji wolnych rodników.



Rycina 8 Zasada działania testu DPPH.

▪ Test FRAP

Metoda FRAP pozwala na ocenę aktywności antyoksydacyjnej poprzez zdolność badanych związków do redukcji jonów żelaza (ang. FRAP - *ferric ion reducing antioxidant parameter*). Metoda ta w ostatnim czasie została przystosowana do badań aktywności przeciwutleniającej związków pochodzenia roślinnego. Zasada testu polega na pomiarze redukcji związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6-tripirydylo-S-tiazyny) pod wpływem związku o charakterze antyoksydacyjnym. Pod wpływem działania antyoksydantu, bezbarwny odczynnik zmienia zabarwienie na intensywnie niebieski kolor, z maksimum absorpcji przy długości fali 593-595 nm. Zasada działania testu została przedstawiona na rycinie 9, str. 88.



Rycina 9 Zasada działania testu FRAP.

Do wszystkich dołków płytki 96-dołkowej dodano 190 μl roztworu odczynnika FRAP, następnie po 10 μl roztworów roboczych wyciągów CA1 i CA2 (tabela 5, str. 68), uzyskując w dołkach odpowiednio stężenie 50, 100, 300, 500, 700 i 1000 $\mu\text{g/ml}$. Każdą z prób badano w 6 powtórzeniach. Następnie płytkę inkubowano przez 30 minut w ciemności, w temperaturze 37°C. Po inkubacji zmierzono absorbancję powstałego roztworu przy długości fali 595 nm w czytniku mikropłytek. Eksperyment powtórzono trzy razy. Otrzymane wyniki zostały przedstawione jako ekwiwalenty (równoważniki) Troloksu (TE) (mg TE/g suchej masy), na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla Troloksu. Jednostka ta wyraża zdolność do redukcji jonów żelaza przez 1 g suchej masy badanego wyciągu z wąkroty azjatyckiej równoważną ze zdolnością do redukcji jonów żelaza jaką posiada 1 mg Troloksu – silny antyoksydant. Jako substancję referencyjną w eksperymencie wykorzystano związek o udokumentowanej aktywności antyoksydacyjnej - kwas askorbinowy.

- **Test ROS-Glo (H_2O_2)**

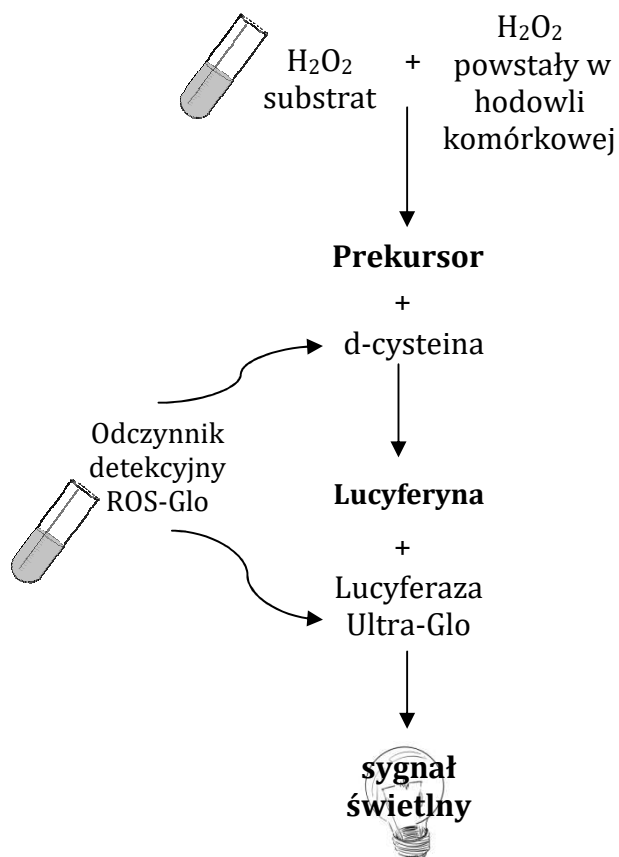
W celu oceny wpływu badanych wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej na poziom reaktywnych form tlenu przeprowadzono test ROS-Glo H_2O_2 (Promega). Test umożliwia szybki i dokładny pomiar chemiluminescencyjny ilości H_2O_2 , reaktywnej formy tlenu, powstającego w środowisku reakcji, czyli w hodowli komórkowej, co bezpośrednio przekłada się na poziom reaktywnych form tlenu. Za pomocą tego testu możemy zidentyfikować związki, które zmieniają poziom wolnych rodników tlenowych bezpośrednio w hodowli komórkowej. Nadtlenek wodoru jest łatwy do oznaczenia,

ze względu na najdłuższy okres półtrwania ze wszystkich wolnych rodników tlenowych produkowanych w komórkach. Zmiana poziomu H_2O_2 może odzwierciedlać zmianę poziomu wszystkich rodników tlenowych.

Komórki linii Bj-5ta i HepG2 wysiewano 24 godziny przed eksperymentem na 96 dołkowe, białe płytki hodowlane z przezroczystym dnem, w gęstości 5×10^4 komórek na dołek w odpowiedniej dla danej linii komórkowej pożywce. Eksperyment zakładał przeprowadzenie czterech różnych prób eksperymentalnych. Komórki przez 24 godziny inkubowano w objętości 200 μ l następujących związków:

1. Medium hodowlane + H_2O , bez komórek
2. Medium hodowlane + testowane wyciągi (CA1 i CA2), bez komórek
3. Medium hodowlane + H_2O , z komórkami
4. Medium hodowlane + testowane wyciągi (CA1 i CA2), z komórkami

Komórki inkubowano przez 18 godzin w obecności testowanych wyciągów CA1 i CA2 w stężeniach 500 i 1000 μ g/ml. Po tym czasie z każdego dołka zebrano 115 μ l płynu i dodano 20 μ l odczynnika H_2O_2 substrat, który reagując bezpośrednio z H_2O_2 , powstałym w hodowli komórkowej, wytwarza prekursor lucyferyny. Po dodaniu odczynnika komórki inkubowano przez następne 6 godzin w inkubatorze do hodowli komórkowych. Następnie do każdego dołka dodano 100 μ l odczynnika detekcyjnego ROS-Glo. Odczynnik detekcyjny ROS-Glo zawiera d-cysteinę (dzięki której prekursor lucyferyny zostaje przekształcony w lucyferynę), oraz rekombinowaną lucyferazę Ultra-Glo (reagującą z lucyferyną w celu wytworzenia sygnału świetlnego proporcjonalnego do stężenia powstałego w hodowli H_2O_2). Po dodaniu odczynnika, komórki inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zmierzono luminescencję w czytniku mikropłytek. Wyniki przedstawia się jako średnia wartość luminescencji (RLU) uzyskana na podstawie pomiarów luminescencji badanych próbek. Im wyższa wartość RLU tym wyższy poziom wyprodukowanego H_2O_2 . Przebieg eksperymentu został przedstawiony na rycinie 10, str. 90.



Rycina 10 Zasada działania testu ROS-Glo H_2O_2 .

2.7. Test Amesa

Test Amesa jest najpopularniejszym testem do wykrywania działania mutagennego substancji chemicznych. W teście wykorzystuje się odpowiednio skonstruowane szczepy *Salmonella typhimurium*, zawierające różne mutacje w operonie histydyny. Mutanty (*his-*) na skutek utraty zdolności do syntezy histydyny, nie rosną na pożywce minimalnej, pozbawionej L-histydyny. Zdolność do wzrostu zmutowanym komórkom bakteryjnym na pożywce bez histydyny może przywrócić mutacja powrotna do form prototroficznych o fenotypie *his+*.

Poszczególne szczepy są wrażliwe na mutageny wywołujące różne mutacje. Szczep *S.typhimurium* TA98 jest wrażliwy na działanie mutagenów wywołujących mutacje typu zmiany ramki odczytu, zaś szczep TA100 umożliwia wykrycie mutagenów wywołujących mutacje typu zamiany par zasad.

Uzyskane wyniki analizowano w oparciu o współczynnik mutagenności (MI – mutagenicity index), który jest ilorazem średniej liczby rewertantów *his+*, których

powstanie na płytce było indukowane przez testowany związek oraz średniej liczby rewertantów *his+* powstałych spontanicznie. Współczynnik mutagenności obliczano ze wzoru:

$$MI = n_i/n_s$$

gdzie:

n_i – liczba rewertantów *his+* indukowanych przez badany wodny wyciąg z wąkroty azjatyckiej

n_s – liczba rewertantów *his+* powstałych spontanicznie

Zgodnie z procedurą za mutagenne uznawane są te związki, które dają przynajmniej dwukrotny wzrost rewertantów *his+* w stosunku do kontroli negatywnej (H₂O), czyli wartość ich współczynnika mutagenności jest większa lub równa 2 (MI≥2) [Mortelmans i Zeiger, 2000].

W dniu poprzedzającym eksperyment założono hodowlę bakteryjną. Komórki bakteryjne wyjęto z banku komórkowego (zamrażarka -80°C). Po ich rozmrożeniu w temperaturze pokojowej 200 µl szczepu bakteryjnego zaszczerpiono w 20 ml bulionu odżywczego Oxoid. Hodowlę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie hodowlę rozcieńczono w celu uzyskania gęstości optycznej 0,15 odpowiadającej 1x10⁸ komórek/ml.

Następnie do sterylnych probówek o objętości 5 ml dodawano kolejno:

1. 0,5 ml 0,1M buforu fosforanowego o pH=7,4
2. 0,1 ml hodowli szczepu *Salmonella typhimurium*
3. 50 µl roztworów badanych wyciągów z wąkroty azjatyckiej CA1 i CA2 osiągając stężenia końcowe 0.1, 0.5, 1, 1.25, 2.5 mg/płytką lub mutagenów wzorcowych (4-nitro-*o*-fenylenodiaminy dla szczepu TA98 i azydku sodu dla szczepu TA100 osiągając stężenia końcowe 5 µg/płytką).

Równolegle wykonano kontrolę negatywną, która zawierała H₂O lub DMSO, w zależności od wykorzystanego rozpuszczalnika. W H₂O rozpuszczono ekstrakty CA1, CA2 i azydek sodu w teście przeprowadzonym na szczepie *S.typhimurium* TA100. W DMSO rozpuszczono ekstrakty CA1, CA2 i 4-nitro-*o*-fenylenodiaminę w teście przeprowadzonym na szczepie *S.typhimurium* TA98.

Przyrządzone w ten sposób mieszaniny inkubowano przez 20 minut w temperaturze 37°C. Następnie do każdej probówki z mieszaniną eksperymentalną dodano po 2 ml rozpuszczonego agaru powierzchniowego, ogrzanego do temperatury 45°C. Zawartość każdej probówki wymieszano i wylano na powierzchnię szalki Petriego zawierającej na dnie zestalone podłoże minimalne. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 48 h w temperaturze 37°C. Każda próba badana była wykonana w trzech powtórzeniach. Po upływie 48 h zliczono kolonie rewertantów *his+* wyrosłych na poszczególnych szalkach.

2.8. Test aktywności fotoprotekcyjnej

W celu oszacowania aktywności fotoprotekcyjnej testowanych wyciągów z wąkroty azjatyckiej, azjatykozydu i madekasozydu wykonano ich widma absorpcyjne w UV. Widma wykonano w stężeniach 50-300 µg/ml w zakresie promieniowania UV: UVB (290-320 nm) i UVA (UVA2 = 320-340 nm, UVA1 = 340-400 nm). Kontrolą referencyjną w eksperymencie był oktokrylen, jeden z najczęściej używanych filtrów przeciwsłonecznych na rynku.

W trakcie eksperymentu dokonano pomiarów wartości absorbancji roztworów wodnych poszczególnych testowanych wyciągów CA1 i CA2, AZJ i MAD oraz roztworu metanolowego oktokrylenu przy długości fali od 290 - 400 nm, w kuwetach kwarcowych o 10 mm długości drogi optycznej i pojemności 1,5 ml wykorzystując dwuwiązkowy spektrofotometr Hitachi U-2800 z oprogramowaniem UV Solution, wersja 2.2. Na podstawie otrzymanych widm absorpcji określono czy badana substancja posiada zdolność pochłaniania promieniowania UV i w jakim zakresie oraz porównano te wartości do substancji wzorcowej, popularnie stosowanego chemicznego filtra UV - oktokrylenu.

2.9. Analiza statystyczna

Na wykresach i w tabelach podano średnią arytmetyczną badanego parametru i jego błąd standardowy (SD).

Dane dotyczące wszystkich przeprowadzonych badań uzyskano z trzech niezależnych eksperymentów, istotność statystyczną różnic określano za pomocą testu t-Studenta ($p < 0,05$) przy użyciu programu OriginPro2019.

IV. Wyniki

W ramach pracy doktorskiej przebadano dwa wodne ekstrakty z wąkroty azjatyckiej, jeden został otrzymany z rośliny uprawianej w warunkach szklarniowych (CA1), drugi z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2). Ekstrakty różniły się zawartością głównych składników, azjatykozydu (AZJ) i madekasozydu (MAD), które również zostały poddane testom jako pojedyncze składniki aktywne. Aktywność azjatykozydu i madekasozydu analizowano w stężeniach odpowiadających ich zawartości w poszczególnych ekstraktach. Zawartość azjatykozydu i madekasozydu w poszczególnych stężeniach testowanych ekstraktów została przedstawiona w tabelach 17 i 18.

Tabela 17 Zawartość azjatykozydu i madekasozydu w poszczególnych stężeniach wyciągu CA1.

Wyciąg z rośliny szklarniowej (CA1)		
Stężenie wyciągu (µg/ml)	Azjatykozyd (µg/ml)	Madekasozyd (µg/ml)
100	0,04	0,08
200	0,08	0,16
500	0,2	0,4
700	0,25	0,6
1000	0,4	0,8

Tabela 18 Zawartość azjatykozydu i madekasozydu w poszczególnych stężeniach wyciągu CA2.

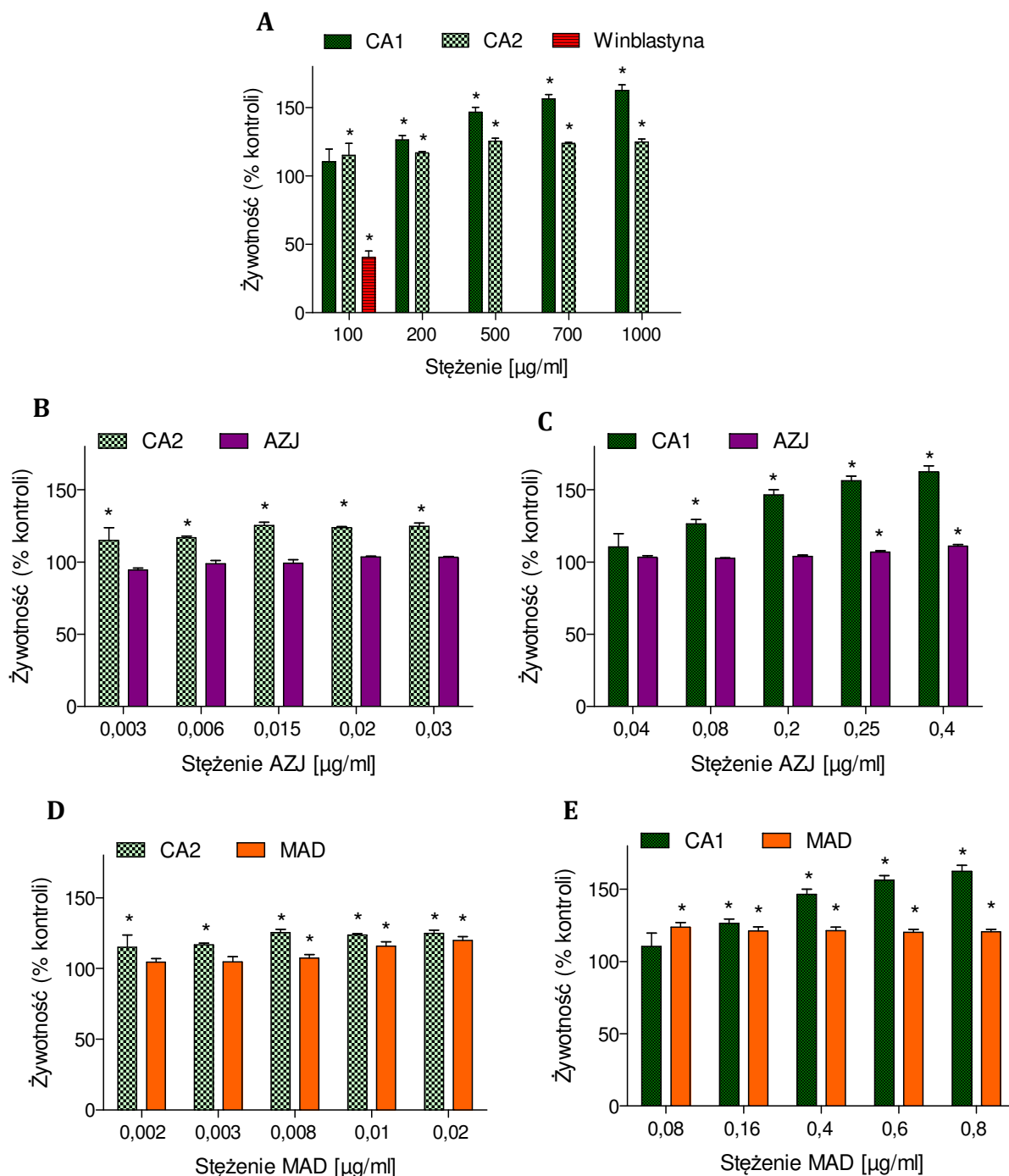
Wyciąg z rośliny <i>in vitro</i> (CA2)		
Stężenie wyciągu (µg/ml)	Azjatykozyd (µg/ml)	Madekasozyd (µg/ml)
100	0,003	0,002
200	0,006	0,003
500	0,015	0,008
700	0,02	0,01
1000	0,03	0,02

Kosmetyk jest produktem, który ma kontakt głównie ze skórą, dlatego do badań prowadzonych w ramach projektu wybrano komórki linii prawidłowych skóry ludzkiej fibroblastów (BJ-5ta) i keratynocytów (HaCaT) oraz komórki dwóch linii nowotworowych czerniaka (WM793, A375). Ze względu na doniesienia literaturowe o potencjalnym działaniu hepatotoksycznym [Jorge i Jorge, 2005] i działaniu neuroprotekcijnym [Gray i wsp., 2014, Gray i wsp., 2015] wąkroty azjatyckiej, postanowiono poszerzyć panel badań bezpieczeństwa stosowania testowanych wyciągów i związków, włączając odpowiednio komórki linii nowotworowej wątroby (HepG2) oraz prawidłowe komórki glejowe linii astrocytów (C8D1A).

Fibroblasty są komórkami zlokalizowanymi w skórze właściwej i są odpowiedzialne za produkcję kolagenu i elastyny. W związku z tym są doskonałym modelem do testowania substancji kosmetycznych o potencjalnym działaniu przeciwstarzeniowym. Z kolei, keratynocyty zlokalizowane w naskórku i jako pierwsze mają kontakt z ksenobiotykami i pozwalają na ocenę optymalnie działających bezpiecznych stężeń, a także mogą posłużyć jako model badawczy w poszukiwaniu związków o działaniu przeciwluszczycowym. Komórki linii nowotworowej czerniaka są z kolei wykorzystywane w badaniach kosmetycznych dotyczących procesu melanogenezy. Co więcej, czerniak (*melanoma malignant*) jest najbardziej opornym nowotworem skóry o bardzo dużej śmiertelności, dlatego niezwykle ważne jest poszukiwanie pośród składników kosmetycznych substancji chemoprewencyjnych. Należy podkreślić, że do badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wybrano linie komórkowe, dla których nie znaleziono informacji w literaturze opisujących badania aktywności biologicznej wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej.

1. Aktywność wyciągów i saponin względem komórek prawidłowych

1.1. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek skóry właściwej – fibroblastów (BJ-5ta)



Rycina 11 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii BJ-5ta w teście MTT.

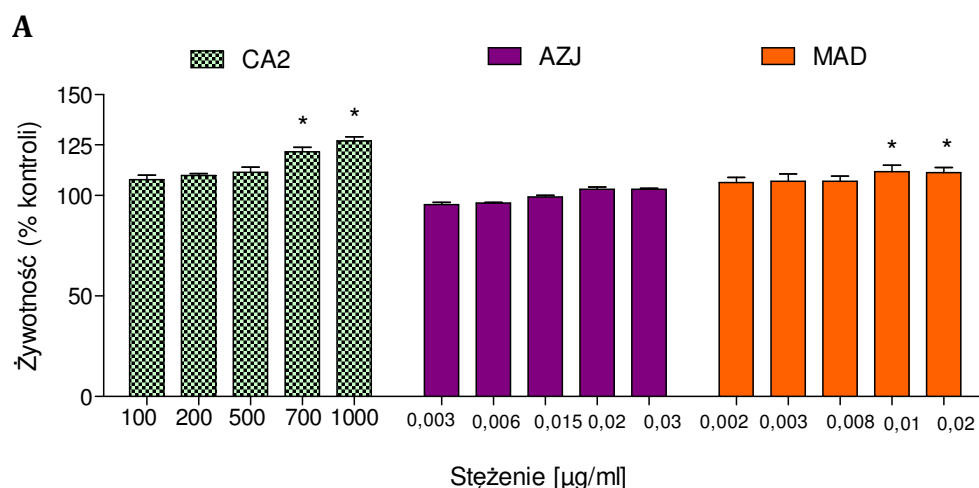
Żywotność fibroblastów pod wpływem badanych wyciągów i saponin oceniono w teście MTT, wykorzystując winblastynę jako substancję referencyjną, która w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ obniżała żywotność komórek o 60% w stosunku do kontroli (Ryc. 11 A).

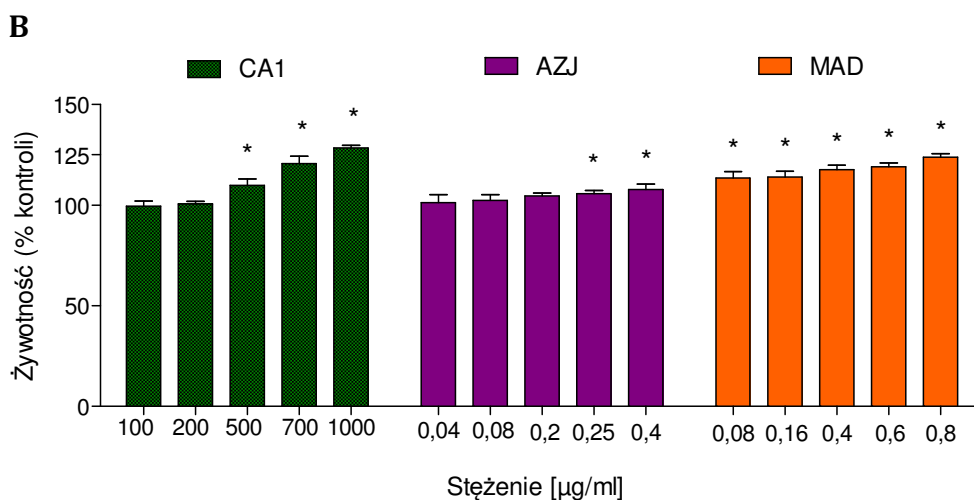
Zarówno ekstrakt CA1, jak i ekstrakt CA2 w teście MTT nie wykazały działania cytotoksycznego (Ryc. 11 A). Zaobserwowano również wpływ obu wyciągów na wzrost żywotności komórek tej linii. Silniejszą aktywnością stymulującą żywotność komórek charakteryzował się ekstrakt CA1, który w najwyższym stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$ podnosił żywotność komórek fibroblastów o 63% względem kontroli (Ryc. 11 A).

Zarówno azjatykozyd i madekasozyd stymulowały żywotność komórek fibroblastów (Ryc. 11 B, C, D, E). Silniejszym działaniem charakteryzował się madekasozyd, który zwiększał żywotność komórek o 24% w stosunku do kontroli w stężeniu 0,08 $\mu\text{g/ml}$ i utrzymywał ją na tym samym poziomie w całym zakresie stężeń (Ryc. 11 D, E).

Wyniki oceniające żywotność badanych wyciągów uzyskane w ramach testu z czerwienią obojętną potwierdziły wyniki uzyskane w teście MTT. CA1 i CA2 nie wykazały działania cytotoksycznego względem fibroblastów. Co więcej, badane wyciągi zwiększały żywotność komórek (Ryc. 12 A, B).

Potwierdzone zostało także bezpieczeństwo stosowania azjatykozydu i madekasozydu. Wraz ze wzrostem stężenia saponin zwiększała się żywotność fibroblastów (Ryc. 12 A, B). Żywotność fibroblastów była silniej stymulowana przez madekasozyd, który w najwyższym stężeniu 0,8 $\mu\text{g/ml}$ podnosił żywotność o 24% w stosunku do kontroli (Ryc. 12 B).





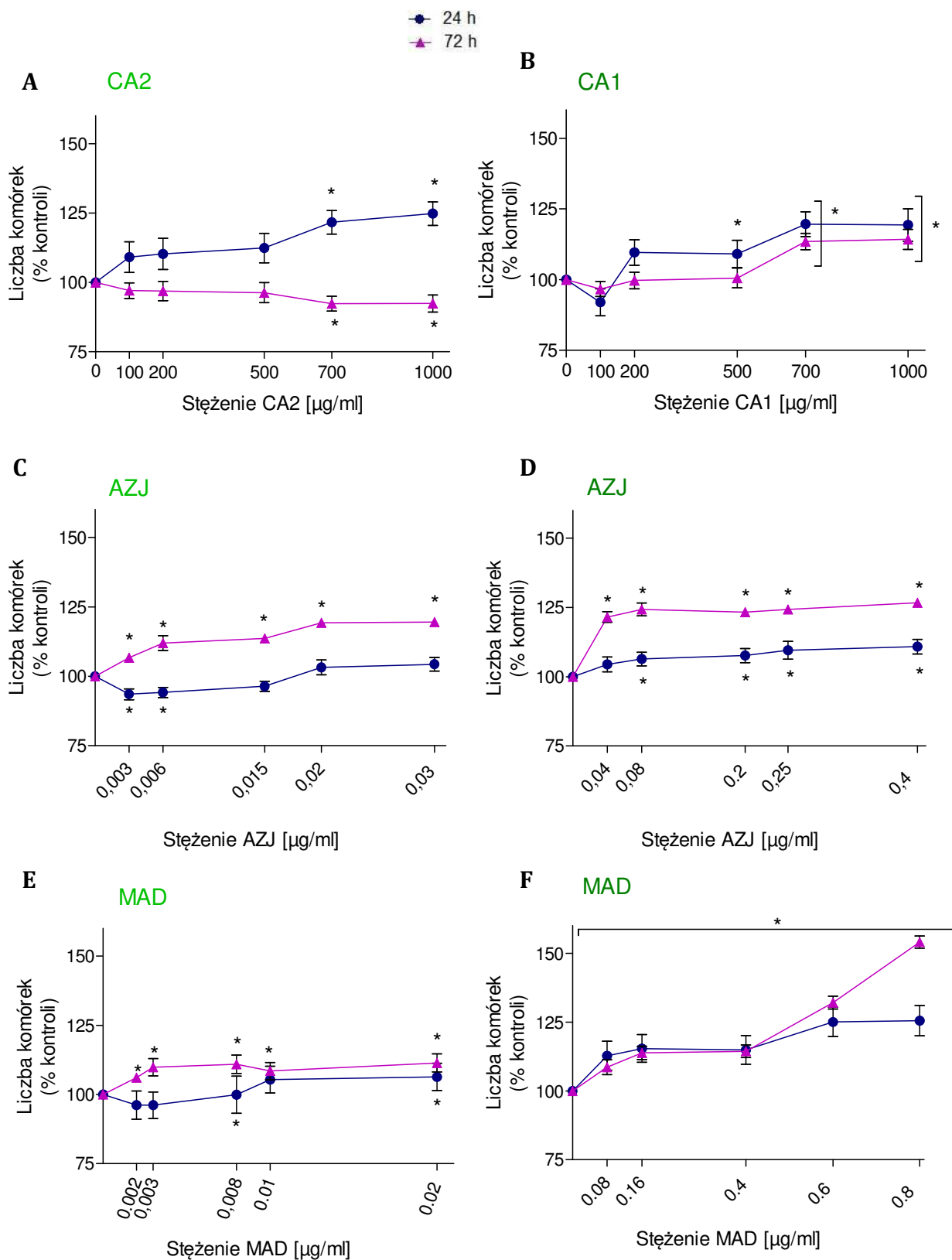
Rycina 12 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii BJ-5ta w teście z czerwiecią obojętną.

1.2. Badanie wpływu wyciągów i saponin na aktywność proliferacyjną komórek skóry właściwej – fibroblastów (BJ-5ta)

Testowane wyciągi nie wykazywały działania cytotoksycznego w stosunku do fibroblastów linii BJ-5ta, w związku z tym poddano ocenie ich wpływ na proliferację komórek tej linii za pomocą testu z fioletem krystalicznym.

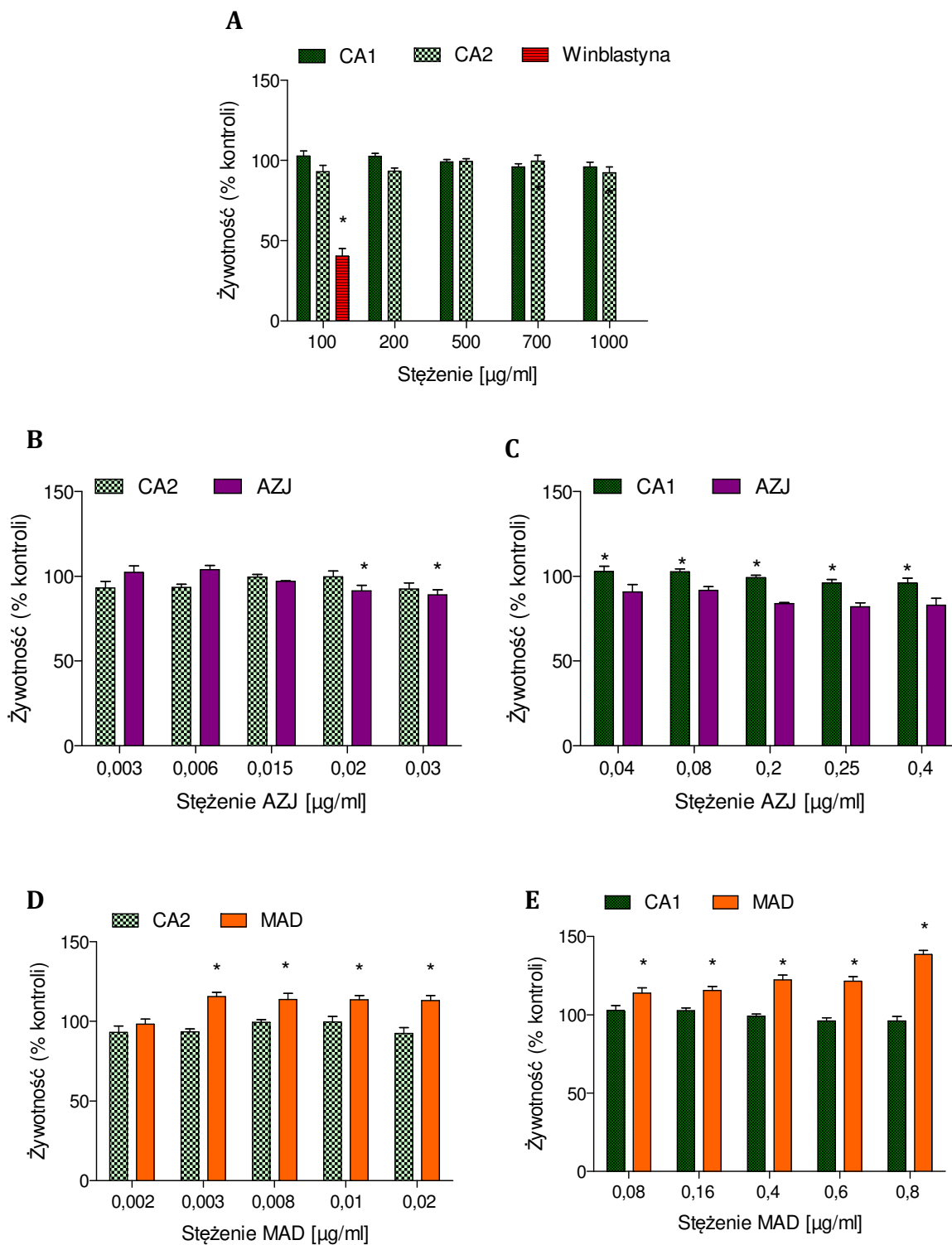
Analiza wpływu testowanych wyciągów CA1 i CA2 na proliferację fibroblastów wykazała, że po 24 godzinnej inkubacji obydwa ekstrakty stymulowały komórki do podziałów (Ryc. 13 A, B). Jednak po 72 h jedynie ekstrakt CA1 w najwyższym stężeniu stymulował proliferację, o 14% względem kontroli (Ryc. 13 B).

Azjatykozyd po 72 h inkubacji, w najwyższym stężeniu 0,4 µg/ml podnosił liczbę żywych komórek o 27% względem kontroli (Ryc. 13 D). Madekasozyd wykazywał najsilniejszy efekt, stymulując proliferację fibroblastów o 54% w stosunku do kontroli po 72 h inkubacji w najwyższym z testowanych stężeń, 0,8 µg/ml (Ryc. 13 F).



Rycina 13 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii BJ-5ta w teście z fioletem krystalicznym.

1.3. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek naskórka – keratynocytów (HaCaT)



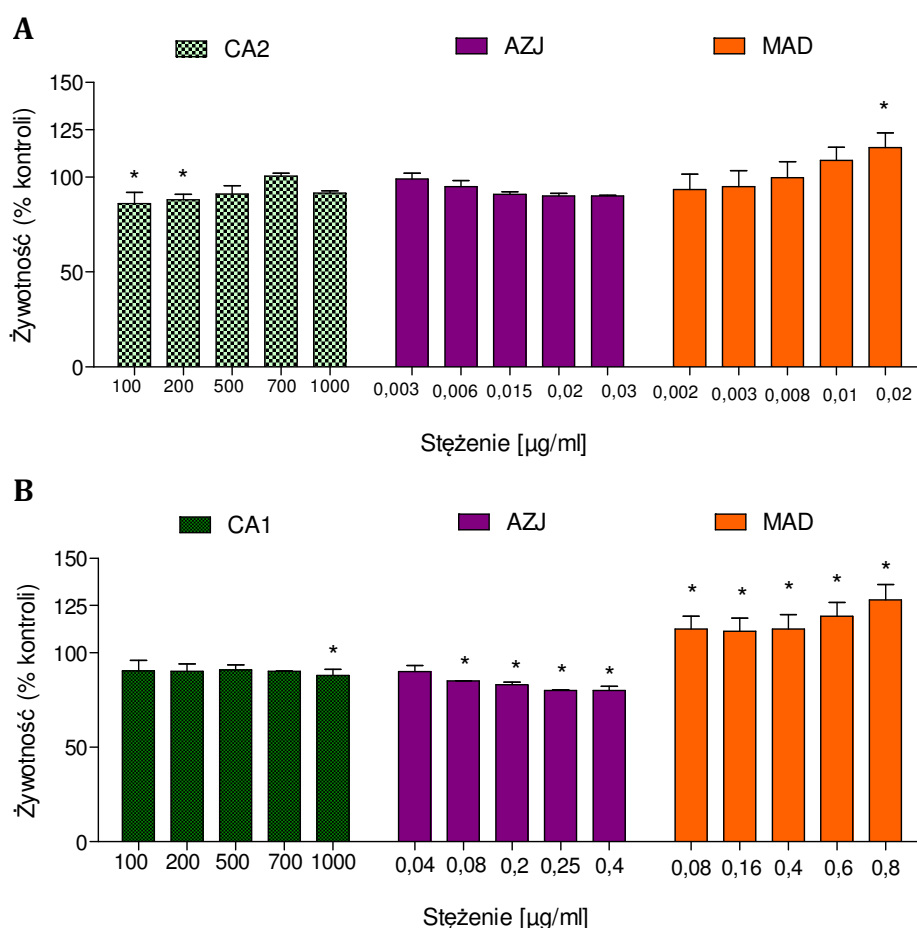
Rycina 14 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HaCaT w teście MTT.

Konsekwentnie żywotność keratynocytów pod wpływem badanych wyciągów i saponin określono w teście MTT. Winblastyna, substancja referencyjna, w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ w istotny statystycznie sposób obniżała żywotność komórek o 58% względem kontroli. Zarówno ekstrakt CA1, jak i ekstrakt CA2 nie wykazywały efektu cytotoksycznego w stosunku do keratynocytów (Ryc. 14 A).

Azjatykozyd nieznacznie, ale w istotny statystycznie sposób obniżał żywotność komórek linii HaCaT (Ryc. 14 B, C) w najwyższym badanym stężeniu 0,4 $\mu\text{g/ml}$ o 17% względem kontroli.

Z kolei, madekasozyd stymulował żywotność komórek tej linii (Ryc. 14 D, E). W najwyższym testowanym stężeniu 0,8 $\mu\text{g/ml}$ podnosił żywotność komórek keratynocytów o 38% względem kontroli (Ryc. 14 E).

Wpływ wyciągów i saponin na żywotność komórek linii HaCaT oceniono także w teście z czerwienią obojętną. Wyniki tego testu zostały przedstawione na rycinie 15.



Rycina 15 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HaCaT w teście z czerwienią obojętną.

Wyniki analiz żywotności uzyskane w ramach testu z czerwonią obojętną potwierdziły brak aktywności cytotoksycznej badanych wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej CA1 i CA2.

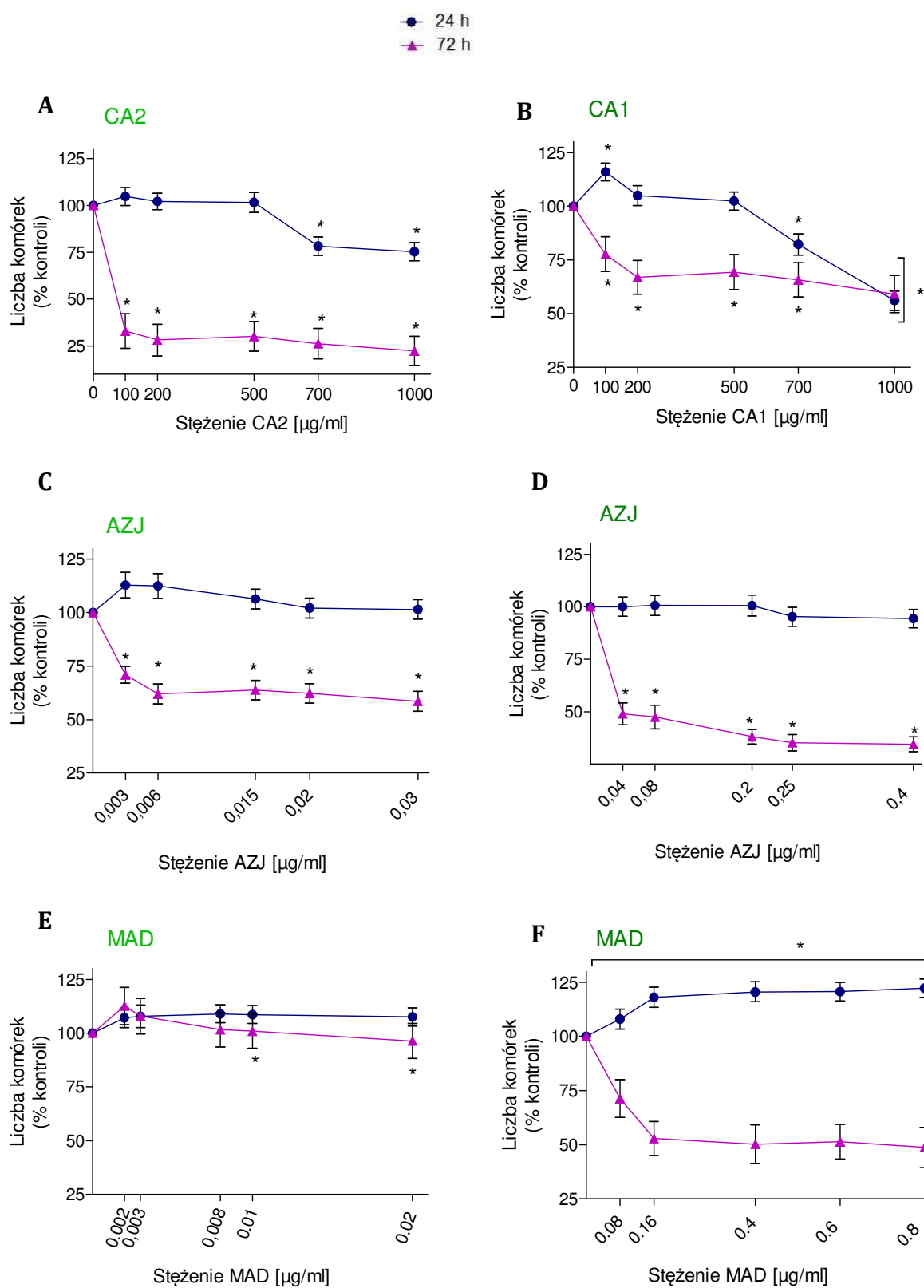
Potwierdzono również, że azjatykozyd w wyższych stężeniach nieznacznie, ale jednak w sposób istotny statystycznie obniżał żywotność keratynocytów (Ryc. 15 B). Z kolei, madekasozyd nieznacznie zwiększał ich żywotność (Ryc. 15 A, B).

1.4. Badanie wpływu wyciągów i saponin na aktywność proliferacyjną komórek naskórka – keratynocytów (HaCaT)

Badane wodne ekstrakty CA1 i CA2 we wszystkich testowanych stężeniach nie posiadały aktywności cytotoksycznej w stosunku do keratynocytów, dlatego oceniono ich wpływ na proliferację w teście z fioletem krystalicznym.

Testowane ekstrakty CA1 i CA2 hamowały namnażanie się keratynocytów (Ryc. 16 A, B). Jednak CA1 silniej hamował proliferację keratynocytów. Po 24 godzinnej inkubacji w najwyższym testowanym stężeniu zmniejszał namnażanie się komórek o 44% względem kontroli (Ryc. 16 B). Z kolei, ekstrakt CA2 dopiero po upływie 72 h, hamował namnażanie keratynocytów prawie o 80% względem kontroli (Ryc. 16 A).

Zarówno azjatykozyd, jak i madekasozyd wykazywały efekt antyproliferacyjny dopiero po 72 h inkubacji, hamując namnażanie o 75% (AZJ) i o 52% (MAD) względem kontroli (Ryc. 16 C, D, E, F).

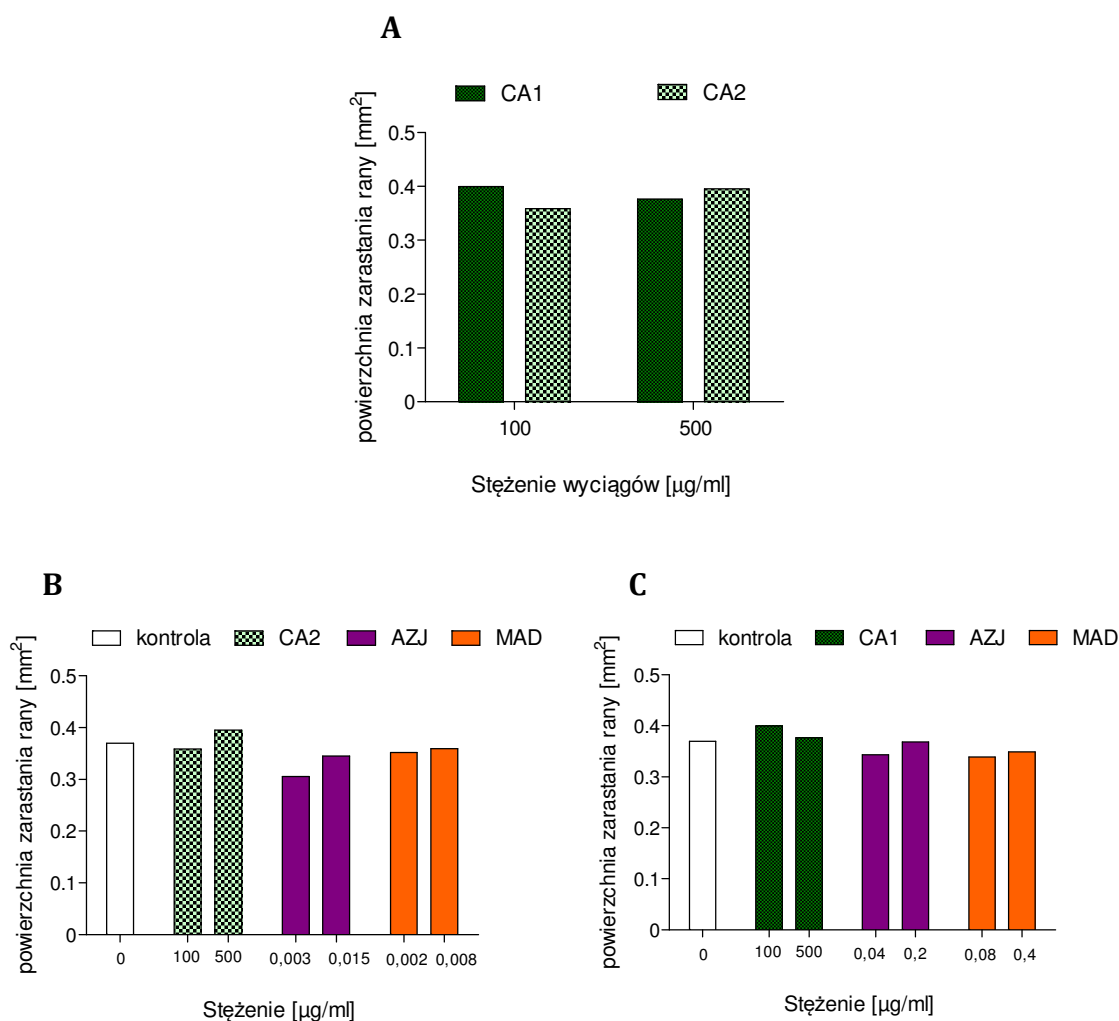


Rycina 16 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii HaCaT w teście z fioletem krystalicznym.

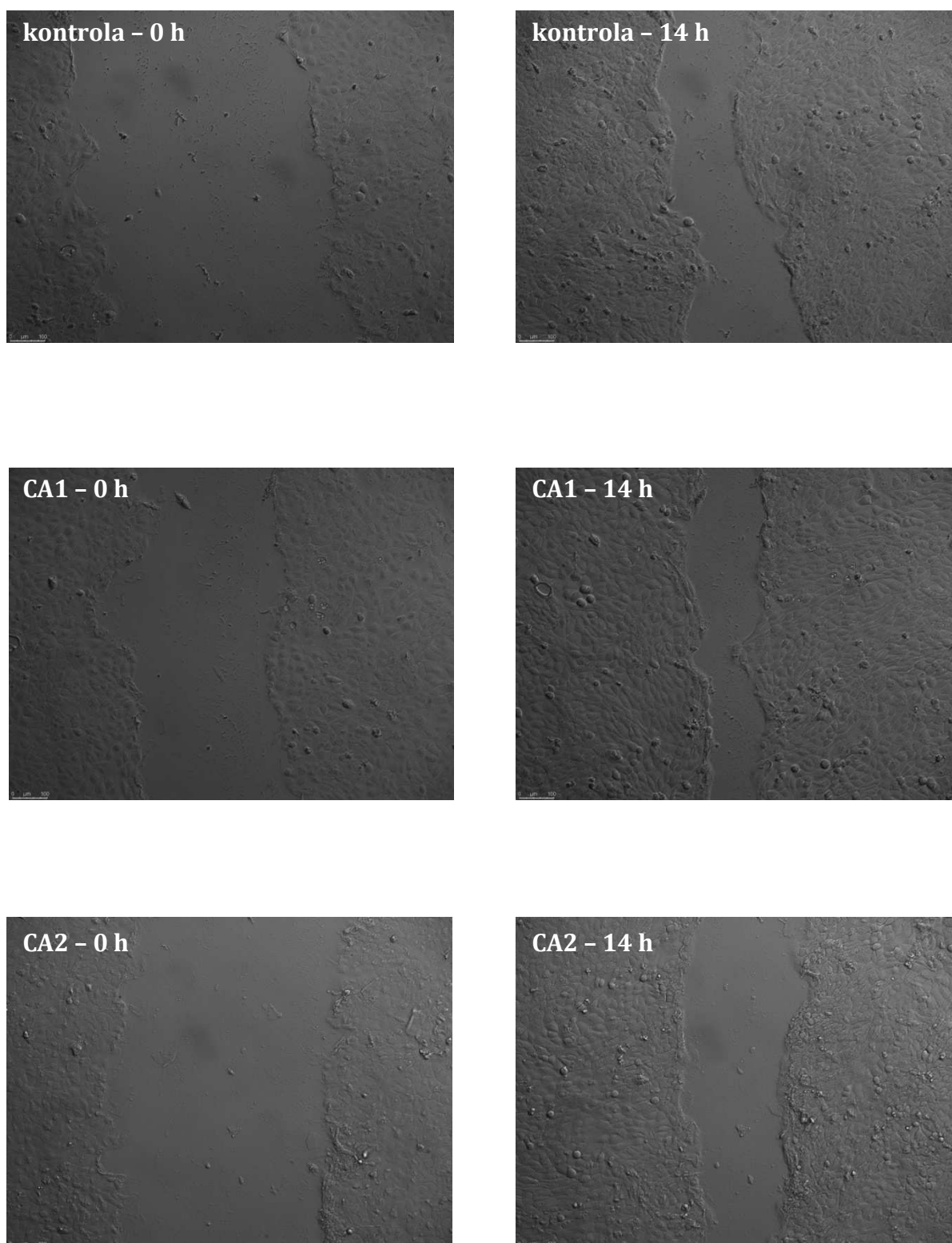
1.5. Badanie wpływu wyciągów i saponin na ruch kolektywny komórek naskórka – keratynocytów (HaCaT) w modelu zarastania rany *in vitro*

Stwierdzono, że podczas 14 godzinnej inkubacji keratynocytów z CA1 w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ i CA2 w stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$ doszło do zarośnięcia rany. W obu przypadkach powierzchnia rany była identyczna i obejmowała powierzchnię 0,4 mm^2 (Ryc. 17 A, Ryc. 18). Wraz ze wzrostem stężenia wyciągu CA1 wpływ na aktywność ruchową komórek uległ zmniejszeniu, podczas, gdy dla wyciągu CA2 zanotowano przeciwny efekt (Ryc. 17 B, C).

Dla azjatykozydu i madekasozydu w testowanych stężeniach nie wykazano wpływu na tempo zarastania rany.

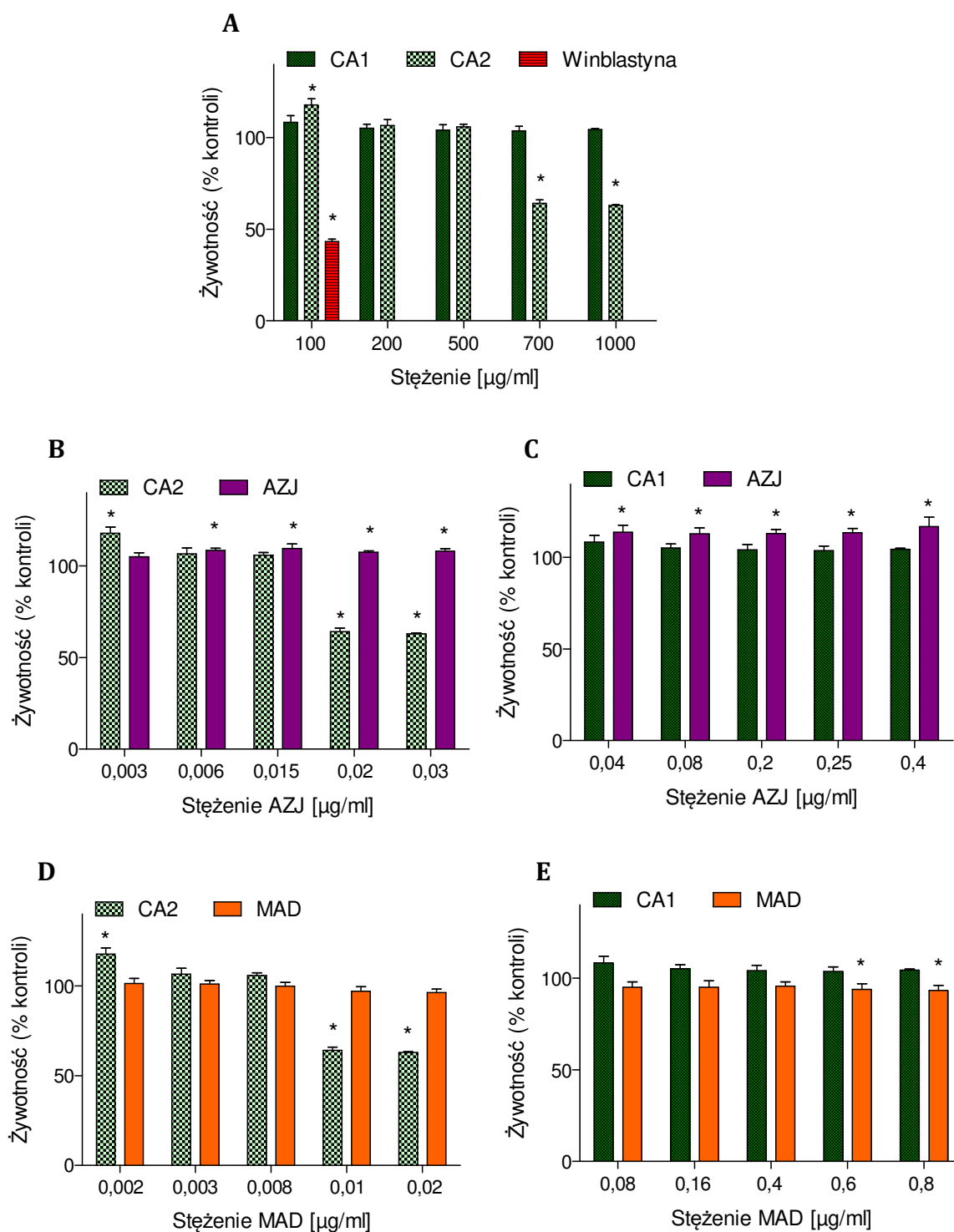


Rycina 17 Powierzchnia rany zarośnięta przez keratynocyty pod wpływem CA1, CA2, AZJ i MAD po 14 godzinnej obserwacji.



Rycina 18 Obraz mikroskopowy keratynocytów po wykonaniu rany w czasie zerowym i po 14 h pod wpływem wyciągu CA1 (100 $\mu\text{g/ml}$) i CA2 (500 $\mu\text{g/ml}$).

1.6. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek glejowych – astrocytów (C8D1A)



Rycina 19 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii C8D1A w teście MTT.

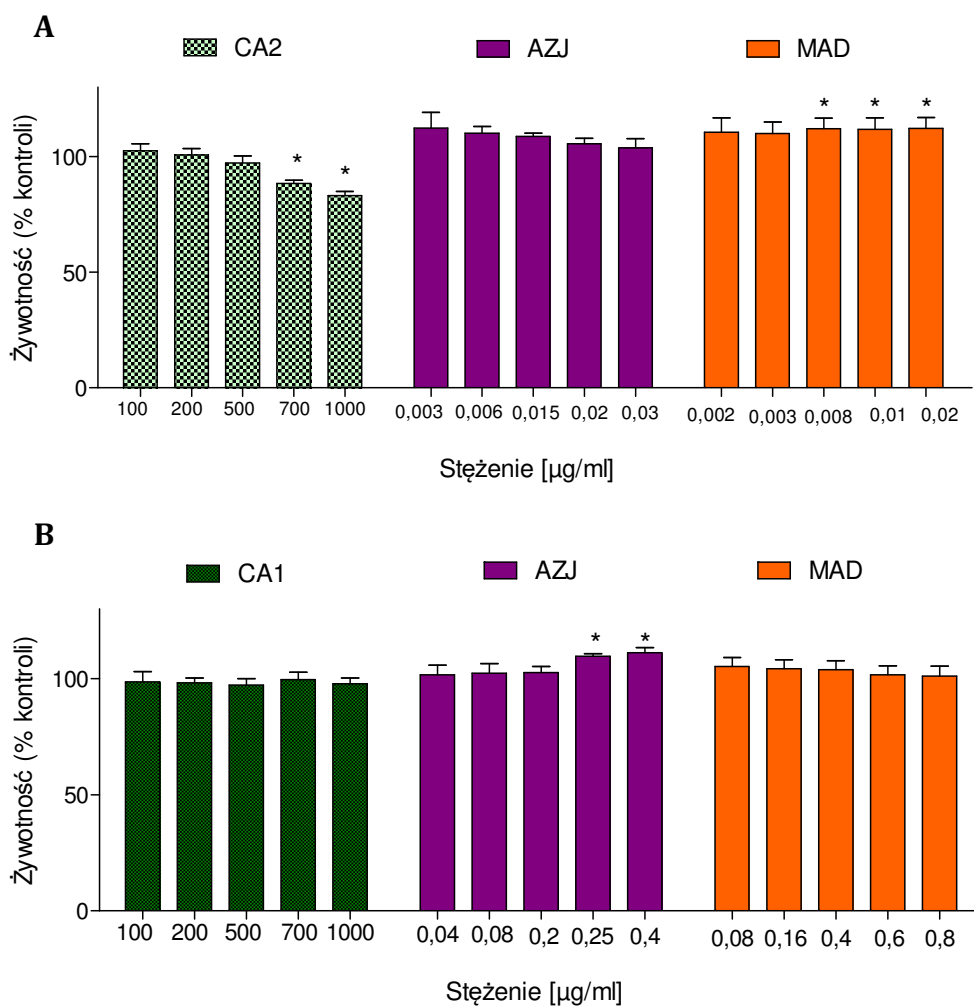
Żywotność astrocytów oceniono w teście MTT, gdzie winblastyna w stężeniu 100 µg/ml obniżała liczbę astrocytów prawie o 60% w stosunku do kontroli (Ryc. 19 A).

Wyciąg CA1 nie wykazywał działania cytotoksycznego w stosunku do komórek tej linii. Żywotność komórek była utrzymywana na poziomie kontroli (Ryc. 19 A). W przypadku wyciągu CA2, w dwóch najwyższych testowanych stężeniach 700 i 1000 µg/ml zaobserwowano spadek żywotności komórek (Ryc. 19 A). W stężeniu 700 µg/ml żywotność spadła o 36% względem kontroli. W porównaniu z winblastyną, która w najwyższym testowanym stężeniu 100 µg/ml obniżała żywotność astrocytów o 57% względem kontroli, można stwierdzić, że ekstrakt z rośliny *in vitro* w stężeniach 700 i 1000 µg/ml wykazywał działanie cytotoksyczne.

Analiza wyników wykazała, że ani azjatykozyd ani madekasozyd nie były odpowiedzialne za ten efekt. Żywotność komórek nieznacznie malała w obecności madekasozydu. W najwyższym stężeniu madekasozydu żywotność komórek wynosiła 93% (Ryc. 19 E). Azjatykozyd utrzymywał żywotność komórek na poziomie powyżej 100%, niezależnie od stężenia (Ryc. 19 B, C).

Żywotność astrocytów pod wpływem badanych wyciągów i saponin oszacowano także za pomocą testu z czerwienią obojętną. Analiza wyników testu z czerwienią obojętną potwierdziła cytotoksyczne działanie wyciągu CA2 (Ryc. 20 A). W najwyższym stężeniu 1000 µg/ml wyciąg z rośliny *in vitro* (CA2) obniżał żywotność astrocytów do 67% względem kontroli.

Potwierdzono również fakt, że azjatykozyd i madekasozyd nie były odpowiedzialne za cytotoksyczne działanie ekstraktu z rośliny *in vitro*. Obie saponiny utrzymywały żywotność astrocytów powyżej 100% (Ryc. 20 A).

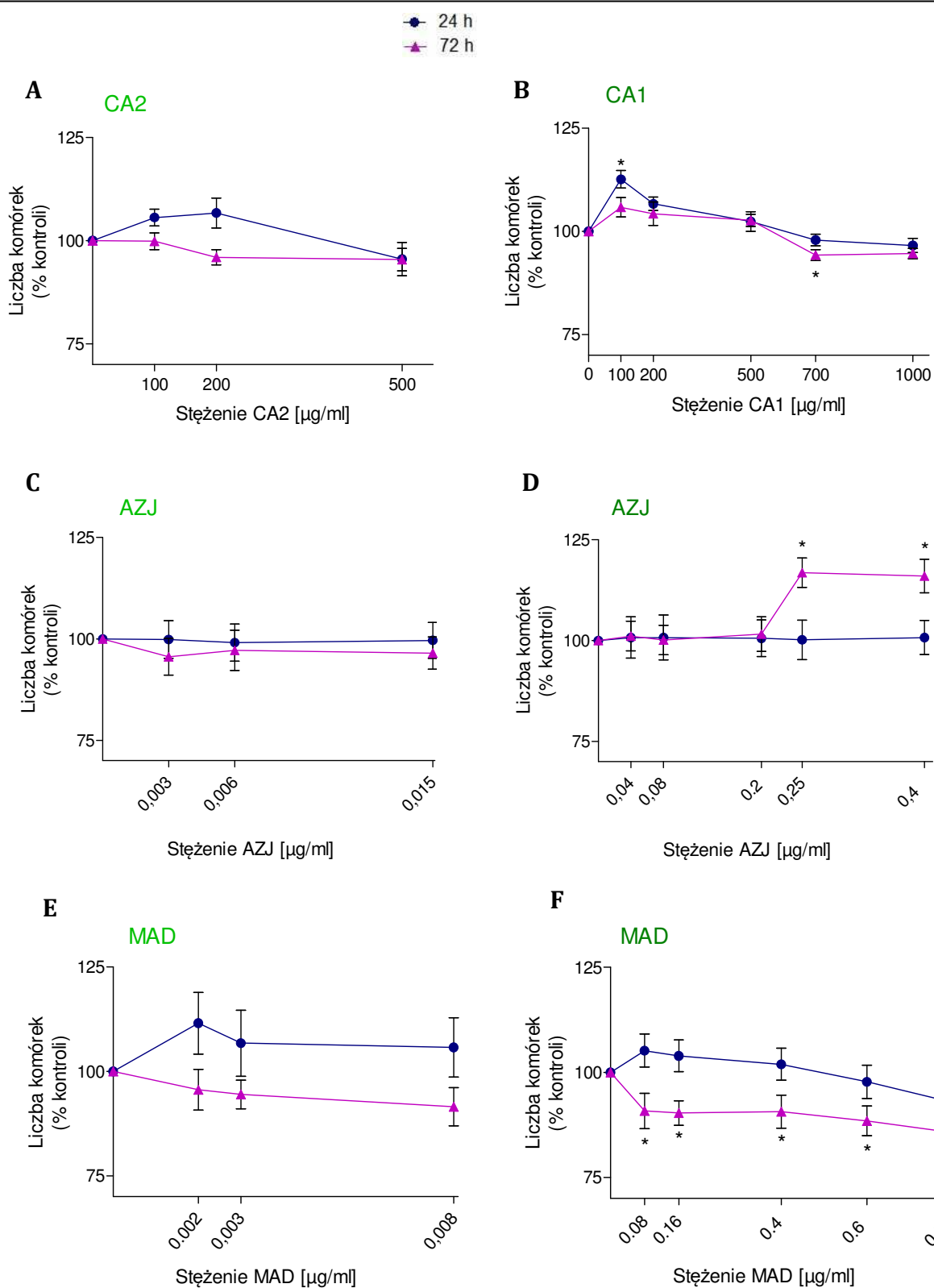


Rycina 20 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii C8D1A w teście z czerwienią obojętną.

1.7. Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek glejowych – astrocytów (C8D1A)

Ekstrakt CA1 nie wykazywał działania cytotoksycznego względem komórek astrocytów, dlatego cały zakres testowanych stężeń został wykorzystany do badań proliferacji. Z kolei, w przypadku ekstraktu CA2 do testu z fioletem krystalicznym wybrano tylko trzy niecytotoksyczne stężenia (100, 200 i 500 µg/ml).

Testowane ekstrakty CA1 i CA2 nieznacznie hamowały proliferację astrocytów (Ryc. 21 A, B).



Rycina 21 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii C8D1A w teście z fioletem krystalicznym.

Azjatykozyd w testowanych stężeniach nieznacznie wpływał na proliferację astrocytów. W niższych stężeniach utrzymywał liczbę komórek na poziomie kontroli, jednak w najwyższych stężeniach po 72 h inkubacji, w sposób istotny statystycznie podnosił liczbę komórek o 16% względem kontroli (Ryc. 21 C, D). Z kolei, madekasozyd hamował namnażanie się komórek na poziomie podobnym do ekstraktu CA1. Madekasozyd w najwyższym stężeniu 0,8 µg/ml, po 72h inkubacji hamował proliferację komórek o 15% względem kontroli (Ryc. 21 F). Wyniki wskazują, że madekasozyd może być odpowiedzialny za wpływ na proliferację jaki wywołuje ekstrakt z rośliny szklarniowej.

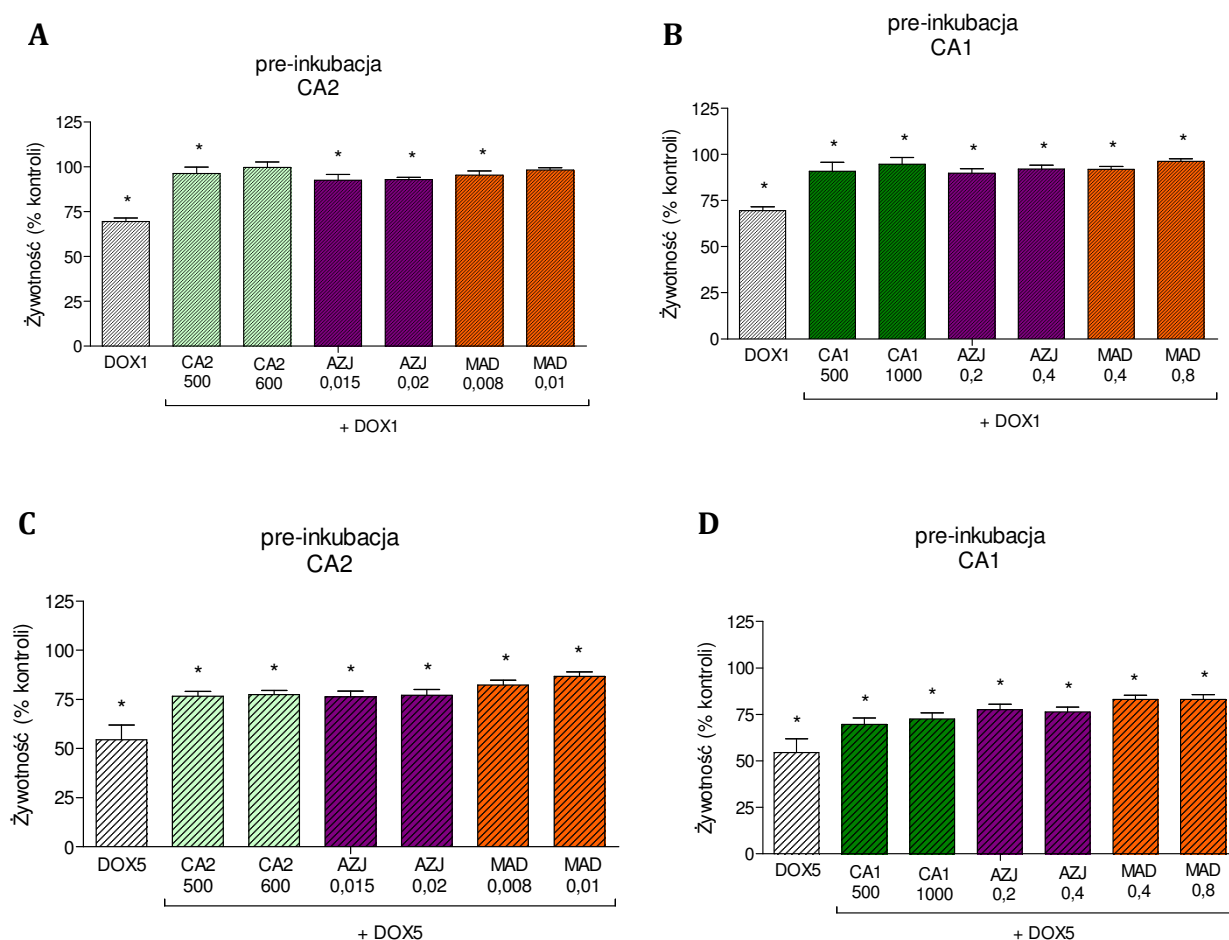
1.8. Wpływ wyciągów i saponin na aktywność glioprotekcyjną

Aktywność glioprotekcyjna wyciągów z wąkroty azjatyckiej oraz jej głównych składników aktywnych została do tej pory słabo poznana. Astrocyty linii CD81A zostały wykorzystane jako glejowy model do testów oceniających aktywność glioprotekcyjną wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej, azjatykozydu i madekasozydu. Do badań aktywności glioprotekcyjnej wybrano dwa stężenia wyciągu CA1 - 500 i 1000 µg/ml. Z kolei, wyciąg CA2 testowano w stężeniach 500 i 600 µg/ml. Do wywołania fizjologicznych zaburzeń i postępujących uszkodzeń w komórkach glejowych wykorzystano doksorubicynę, związek o działaniu cytotoksycznym.

W pierwszym eksperymencie, po wcześniejszej 24 godzinnej preinkubacji astrocytów z testowanymi wyciągami lub saponinami, do hodowli dodano doksorubicynę w stężeniu 1 lub 5 µM/ml i inkubowano przez kolejne 24 godziny. Następnie żywotność komórek oceniono testem MTT. Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost żywotności astrocytów w próbach badanych z wyciągami w porównaniu z doksorubicyną, co świadczy o działaniu ochronnym testowanych wyciągów przed uszkodzeniami wywoływanymi przez doksorubicynę (Ryc. 22). Doksorubicyna w stężeniu 1 µM obniżała żywotność o 30%, a w stężeniu 5 µM o 45%, podczas gdy wyciąg CA1 ochraniał komórki przed uszkodzeniami indukowanymi przez doksorubicynę, podnosząc żywotność komórek w stężeniu 500 µg/ml o 21% w stosunku do DOX1 i o 15% w stosunku do DOX5 (Ryc. 22 B, D). Nieco silniejszą

aktywnością charakteryzował się wyciąg CA2, który w stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$ podnosił żywotność o 27% w stosunku do DOX1 i o 22% w stosunku do DOX5 (Ryc. 22 A, C).

Zarówno azjatykozyd, jak i madekasozyd wykazywały ochronne działanie przed uszkodzeniami wywołanymi przez doksorubicynę. Zaobserwowano wzrost żywotności komórek po wcześniejszej ich inkubacji z saponinami (Ryc. 22). Niezależnie od testowanego stężenia azjatykozyd podnosił żywotność astrocytów o około 25% w stosunku do DOX1 i DOX5. Silniejszą aktywność wykazywał madekasozyd, podnosząc żywotność astrocytów o około 28% we wszystkich badanych stężeniach zarówno w stosunku do DOX1 jak i do DOX5.

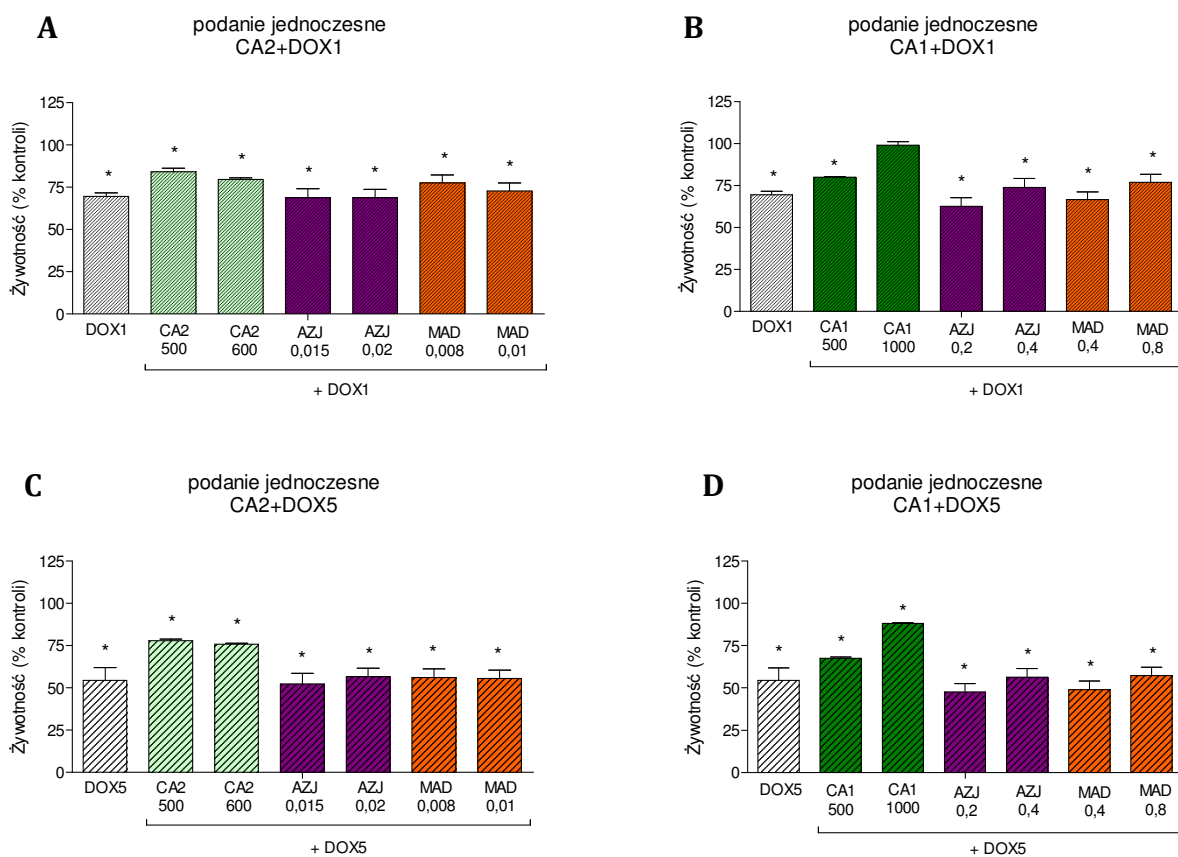


Rycina 22 Aktywność glioprotekcyjna CA1, CA2, AZJ i MAD poddanych inkubacji z astrocytami przed zastosowaniem doksorubicyny, oceniona w teście MTT.

W drugim wariancie eksperymentu astrocyty poddano jednoczesnej inkubacji z wyciągami z wąkroty azjatyckiej bądź azjatykozydem lub madekasozydem wraz z doksorubicyną w stężeniu 1 lub 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Po 24 godzinnej inkubacji żywotność komórek oceniono za pomocą testu MTT, co pozwoliło oszacować, czy testowane wyciągi i badane saponiny zapobiegają efektowi toksycznemu wywołanemu przez doksorubicynę. Zaobserwowano wzrost żywotności astrocytów w obecności badanych wyciągów (CA1/CA2) w porównaniu do doksorubicyny, co świadczy o tym, że wyciągi z wąkroty azjatyckiej zapobiegały efektowi toksycznemu wywoływanemu przez doksorubicynę (Ryc. 23). Doksorubicyna w stężeniu 1 μM obniżała żywotność o 30%, a w stężeniu 5 μM o 45%, podczas gdy wyciąg CA1 podnosił żywotność komórek, w najwyższym stężeniu 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 30% w stosunku do DOX1 i o 33% w stosunku do DOX5 (Ryc. 23 B, D). Z kolei, wyciąg CA2 działał najkorzystniej w stężeniu 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ podnosząc żywotność o 15% w stosunku do DOX1 i aż o 23% w stosunku do DOX5 (Ryc. 23 A, C). Azjatykozyd zastosowany wspólnie z chemioterapeutyką, podczas inkubacji z astrocytami, nie zapobiegał efektowi toksycznemu wywołanemu przez doksorubicynę, utrzymując żywotność komórek na poziomie porównywalnym z DOX1 i DOX5.

Analizując wyniki zaobserwowano, że badane wyciągi CA1 i CA2 wykazywały silniejszy efekt glioprotekcyjny, kiedy zostały zastosowane przed podaniem doksorubicyny w stężeniu 1 μM . W przypadku doksorubicyny w stężeniu 5 μM wyniki były niezależne od tego czy wyciągi zostały zastosowane przed doksorubicyną czy jednocześnie z nią.

Z kolei, w przypadku azjatykozydu i madekasozydu zaobserwowano różnice w żywotności w zależności od eksperymentu. Badane saponiny charakteryzowały się silniejszą aktywnością glioprotekcyjną zastosowane w preinkubacji z astrocytami przed doksorubicyną zarówno w stężeniu 1 i 5 μM . Podczas podania jednoczesnego, saponiny nie wykazywały aktywności glioprotekcyjnej.



Rycina 23 Aktywność glioprotekcyjna CA1, CA2, AZJ i MAD zastosowanych jednocześnie z doksorubicyną, oceniona w teście MTT.

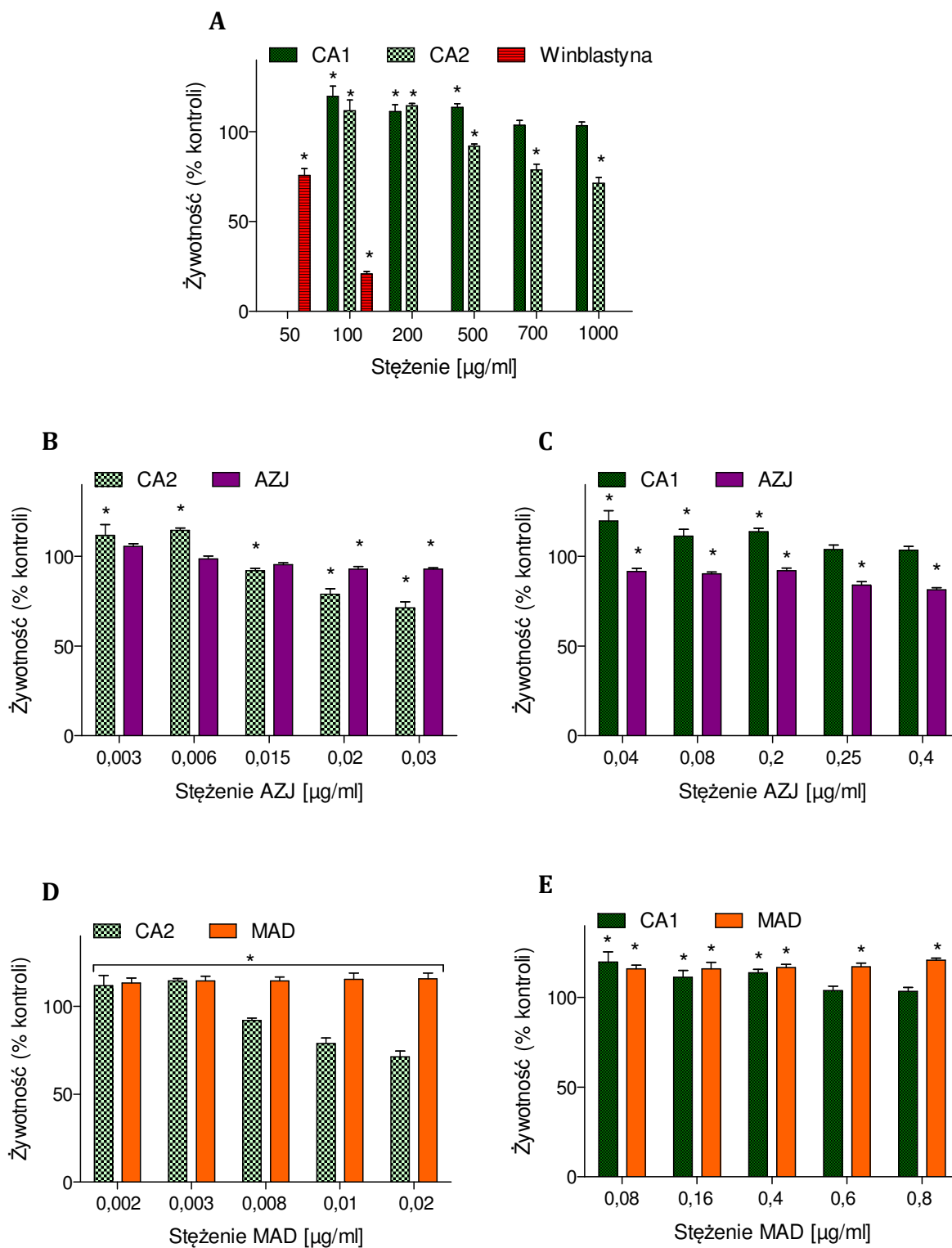
2. Aktywność wyciągów i saponin względem komórek nowotworowych

2.1. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek czerniaka skóry (A375)

Posługując się testem MTT oceniono żywotność komórek linii A375 pod wpływem badanych wyciągów, saponin i winblastyny, jako substancji referencyjnej. Wyniki wykazały, że winblastyna w stężeniu 50 µg/ml powodowała spadek przeżywalności komórek o 25%, a w stężeniu 100 µg/ml prawie o 80% w stosunku do kontroli (Ryc. 24 A).

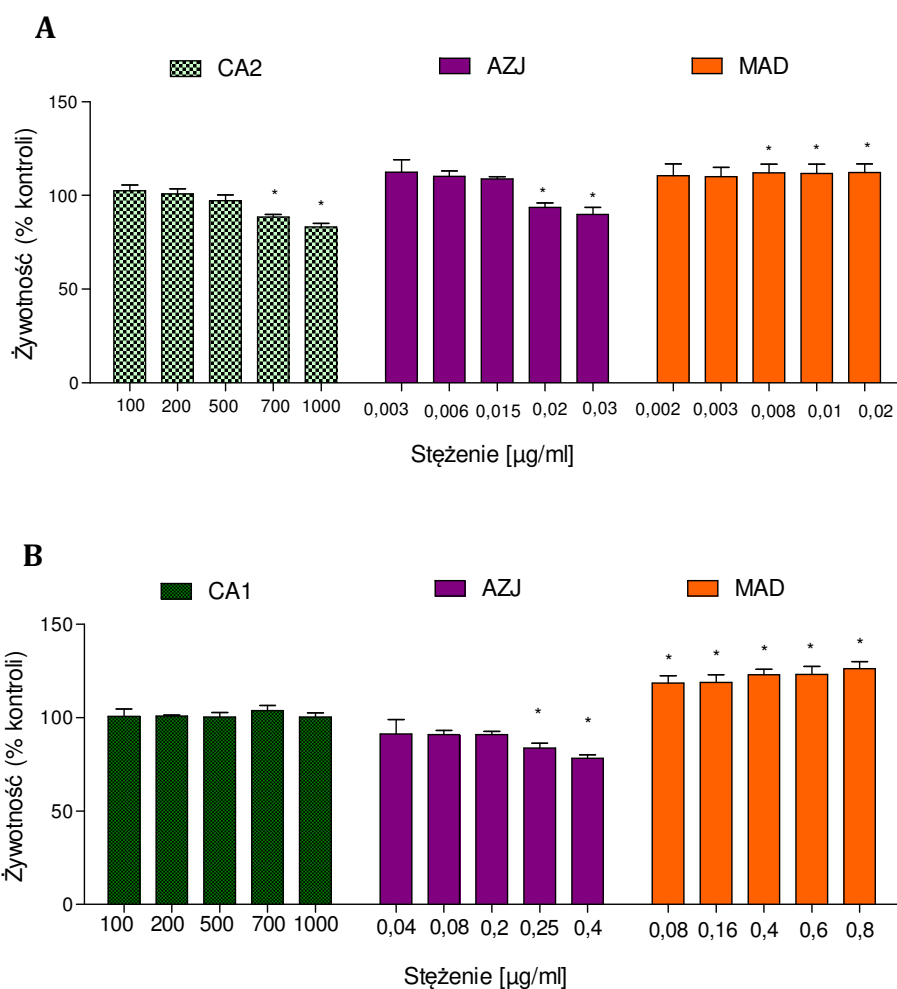
Ekstrakt CA1 nie wywoływał efektu cytotoksycznego, utrzymując żywotność komórek powyżej poziomu kontroli (Ryc. 24 A). Z kolei, ekstrakt CA2 obniżał żywotność komórek czerniaka. Efekt cytotoksyczny wywoływały dwa najwyższe stężenia ekstraktu CA2. W stężeniu 700 µg/ml odnotowano spadek żywotności o 22%, a w stężeniu 1000 µg/ml już o 29% względem kontroli (Ryc. 24 A).

Azjatykozyd działał cytotoksycznie w stosunku do komórek linii A375. Już w stężeniu 0,25 µg/ml obniżał liczbę żywych komórek o 16% względem kontroli (Ryc. 24 C), co w porównaniu z kontrolą referencyjną, świadczyło o jego silnej aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek czerniaka. Winblastyna w stężeniu 50 µg/ml działała cytotoksycznie w stosunku do komórek tej linii, obniżając ich żywotność o 25%. Z kolei, madekasozyd w najwyższym stężeniu 0,8 µg/ml podnosił żywotność komórek czerniaka o 27% względem kontroli (Ryc. 24 E).



Rycina 24 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii A375 w teście MTT.

Żywotność komórek A375 sprawdzono także w teście z czerwienią obojętną. Wyniki uzyskane w ramach testu z czerwienią obojętną potwierdziły wyniki uzyskane w teście MTT. Ekstrakt CA2 obniżał żywotność komórek czerniaka wywołując efekt cytotoksyczny w dwóch najwyższych stężeniach. W stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$ odnotowano spadek żywotności o 17% względem kontroli (Ryc. 25 A).



Rycina 25 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii A375 w teście z czerwienią obojętną.

Azjatykozyd obniżał żywotność komórek czerniaka, wywołując efekt cytotoksyczny w najwyższych stężeniach. W stężeniu 0,25 $\mu\text{g/ml}$ obniżał żywotność o 16% (Ryc. 25 B). W przypadku madekasozydu, wyniki analiz testu z czerwienią obojętną również były analogiczne do tych uzyskanych na podstawie testu MTT.

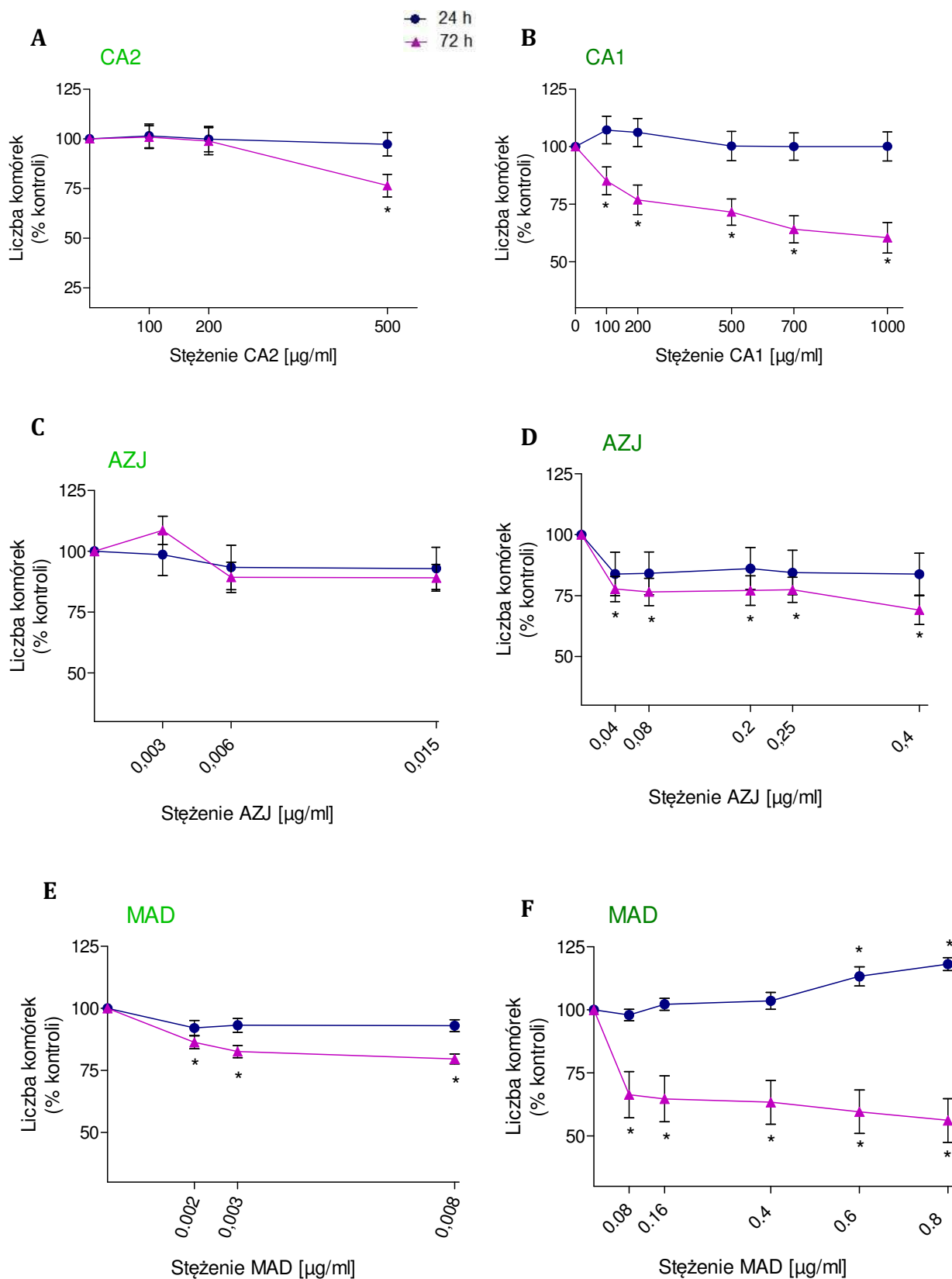
Madekasozyd wraz z rosnącym stężeniem podnosił liczbę żywych komórek, o 29% względem kontroli, w najwyższym stężeniu 0,8 µg/ml (Ryc. 25 B).

2.2. Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek czerniaka skóry (A375)

Ekstrakt CA1 nie wykazał działania cytotoksycznego, dlatego test z fioletem krystalicznym przeprowadzono stosując wszystkie stężenia wyciągów i saponin wykorzystywane w testach żywotności. Z kolei, w przypadku ekstraktu CA2 do testu z fioletem krystalicznym wybrano 3 niecytotoksyczne stężenia: 100, 200 i 500 µg/ml.

Testowane wyciągi z wąkroty azjatyckiej CA1 i CA2 wykazały podobny wpływ na proliferację komórek tej linii. 24 godzinna inkubacja komórek z ekstraktami utrzymywała ich liczbę na poziomie kontroli (Ryc. 26 A, B). Z kolei, po 72 h inkubacji zaobserwowano zahamowanie proliferacji komórek. W niecytotoksycznym stężeniu 500 µg/ml ekstrakt CA1 obniżał liczbę komórek o 28% (Ryc. 26 B), a ekstrakt CA2 o 23% względem kontroli (Ryc. 26 A). Ekstrakt CA1 w stężeniu 1000 µg/ml, hamował proliferację komórek prawie o 40% względem kontroli.

Proliferację komórek czerniaka skóry hamowały również obydwie saponiny obecne w testowanych wyciągach. Azjatykozyd w najwyższym testowanym stężeniu po 72 h inkubacji hamował proliferację komórek o 30% względem kontroli (Ryc. 26 D). Z kolei, madekasozyd w najwyższym badanym stężeniu po 72 h inkubacji hamował proliferację prawie o 50% względem kontroli (Ryc. 26 F).

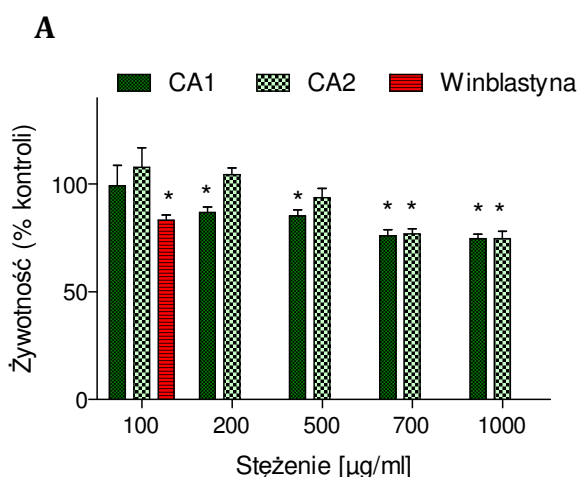


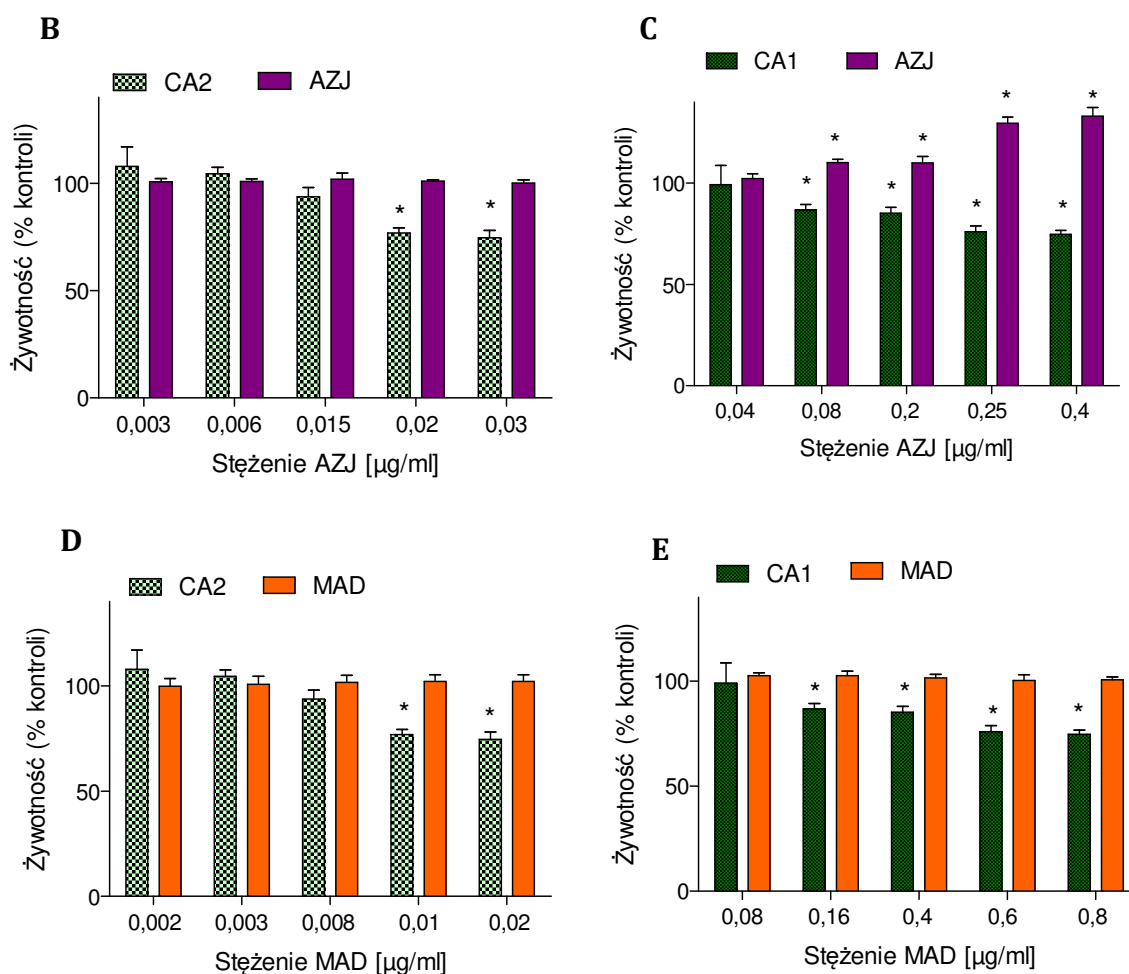
Rycina 26 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii A375 w teście z fioletem krystalicznym.

2.3. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek czerniaka (WM793)

W teście MTT oceniono wpływ wyciągów CA1 i CA2, saponin oraz winblastyny, którą użyto jako związku referencyjnego, na żywotność komórek linii WM793. Testowane wodne wyciągi CA1 i CA2 cechowały się aktywnością cytotoksyczną. Wyciąg CA1 już w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ obniżał żywotność prawie o 15% względem kontroli. Z kolei, w stężeniu 700 $\mu\text{g/ml}$ obydwie testowane ekstrakty obniżały żywotność o 24% względem kontroli (Ryc. 27 A). W porównaniu z kontrolą referencyjną, gdzie w najwyższym testowanym stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ zaobserwowano obniżenie żywotności o 17% (Ryc. 27 A) można stwierdzić chemoprewencyjny charakter testowanych wyciągów.

Aktywność cytotoksyczna wyciągów nie była wywołana przez żadną z saponin obecną w ekstraktach. Azjatykozyd w niskich stężeniach utrzymywał żywotność komórek na poziomie kontroli (Ryc. 27 B). Z kolei, w wyższych stężeniach w istotny statystycznie sposób podnosił żywotność komórek nowotworowych czerniaka (Ryc. 27 C). W dwóch najwyższych stężeniach azjatykozydu żywotność komórek WM793 wzrosła o około 30% w stosunku do kontroli.

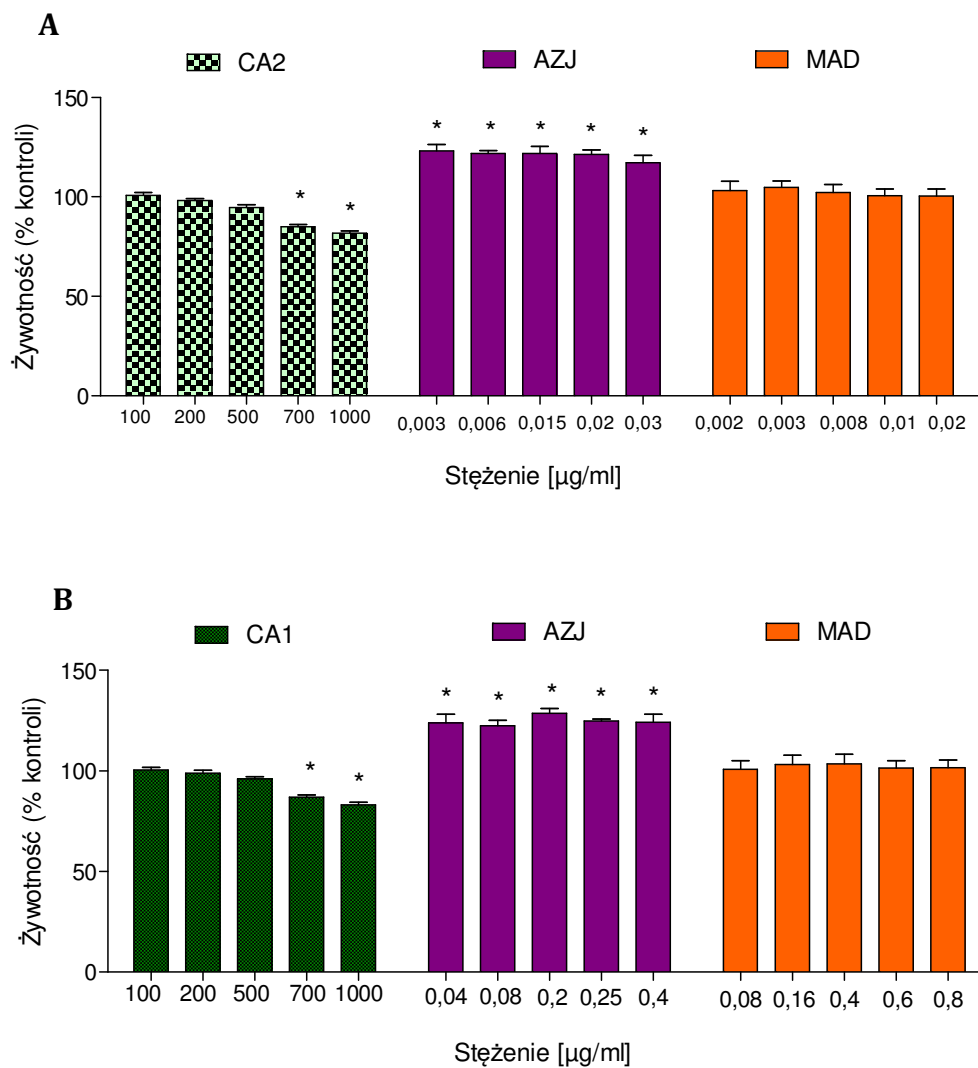




Rycina 27 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii WM793 w teście MTT.

Wyniki testu z czerwienią obojętną potwierdziły wyniki uzyskane w teście MTT. Wyciągi CA1 i CA2 w dwóch najwyższych stężeniach działały cytotoksycznie, obniżając żywotność komórek o około 15% względem kontroli (Ryc. 28).

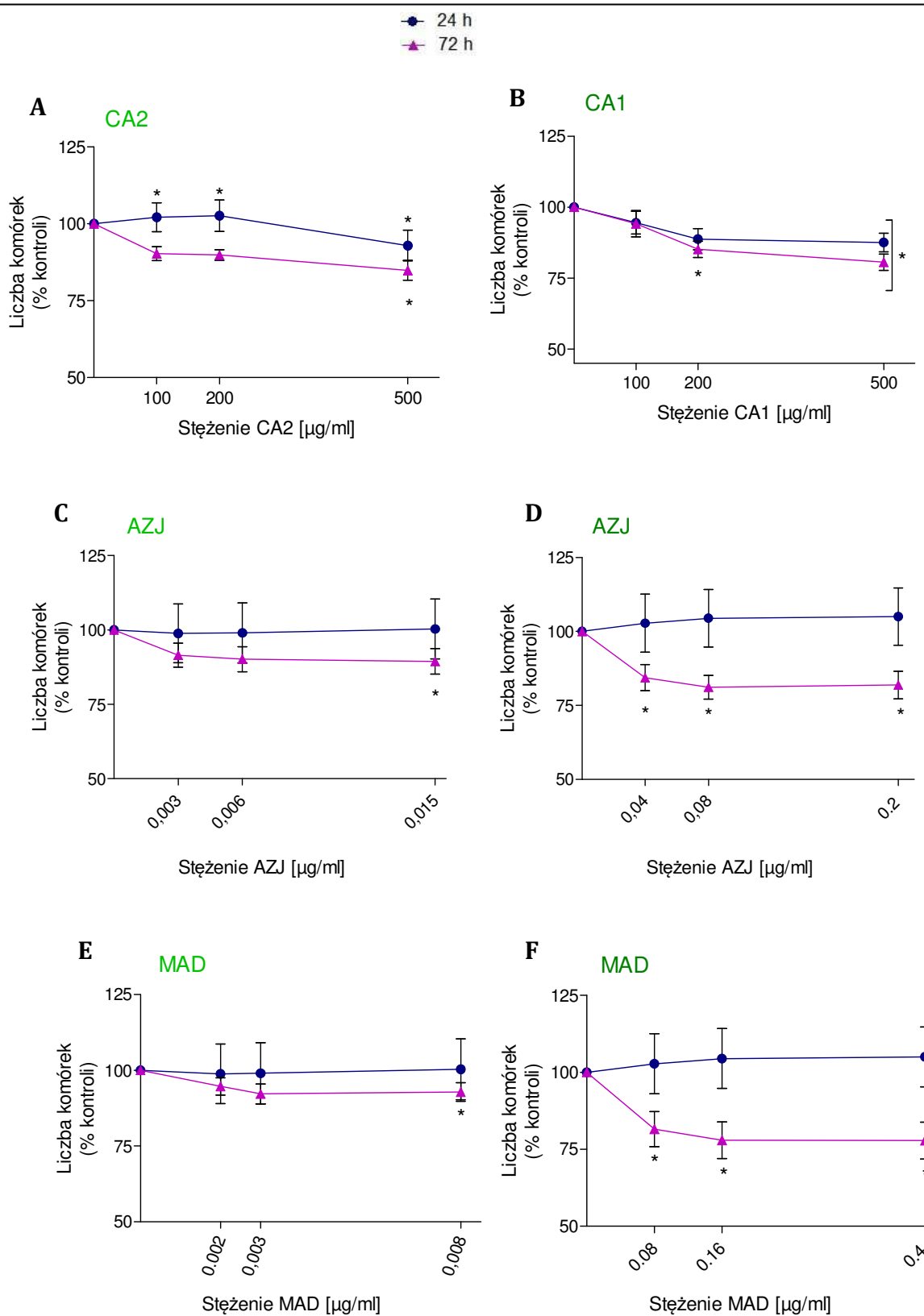
Ani azjatykozyd, ani madekasozyd nie miały działania cytotoksycznego w stosunku do linii WM793. Azjatykozyd niezależnie od stężenia utrzymywał żywotność komórek na poziomie około 120%, a madekasozyd na poziomie kontroli (Ryc. 28 A, B).



Rycina 28 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii WM793 w teście z czerwiecią obojętną.

2.4. Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek czarniaka (WM793)

Testowane ekstrakty CA1 i CA2 nie wykazywały aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek linii WM793 w stężeniach 100, 200 i 500 µg/ml i dlatego zostały wykorzystane w badaniach nad aktywnością proliferacyjną w teście z fioletem krystalicznym.



Rycina 29 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii WM793 w teście z fioletem krystalicznym.

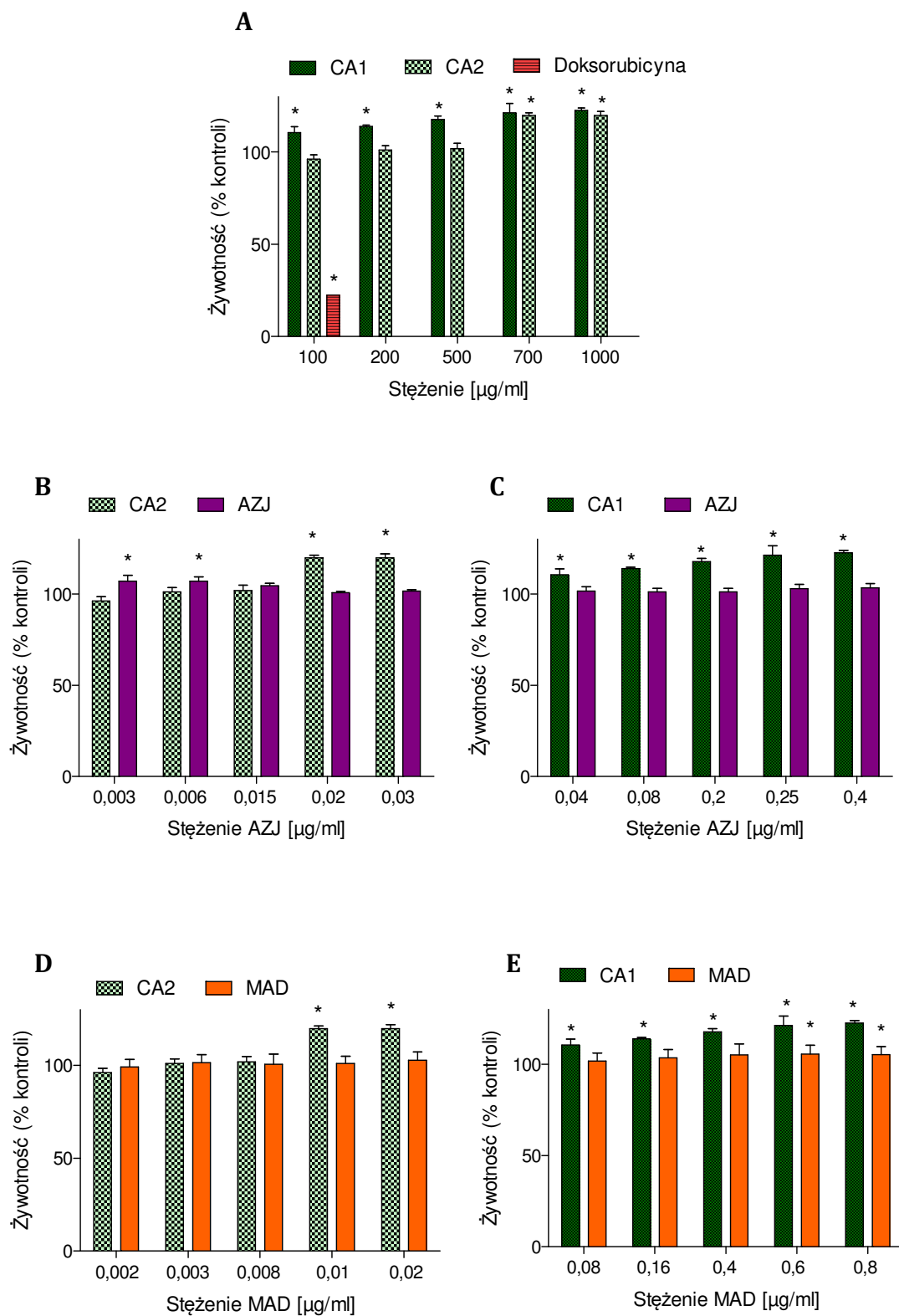
Testowane ekstrakty wykazywały aktywność cytostatyczną w stosunku do komórek czerniaka linii WM793. Ekstrakt CA1 już po 24 h w stężeniu 200 µg/ml hamował namnażanie się komórek o 11% względem kontroli, a jego aktywność cytostatyczna rosła wraz z czasem (Ryc. 29 B). Z kolei, ekstrakt CA2 dopiero po 72 h inkubacji, w najwyższym testowanym stężeniu 500 µg/ml hamował namnażanie komórek o 15% (Ryc. 29 A). Azjatykozyd już w stężeniu 0,04 µg/ml w tych samych warunkach również hamował proliferację o 15% względem kontroli (Ryc. 29 D). Silniejszą aktywnością cytostatyczną charakteryzował się madekasozyd, który po 72 h inkubacji w stężeniu 0,08 µg/ml hamował proliferację o 19%, a w stężeniu 0,4 µg/ml już o 28% względem kontroli (Ryc 29 E, F).

2.5. Badanie wpływu wyciągów i saponin na żywotność komórek nowotworowych wątroby – hepatocytów (HepG2)

Do oceny żywotności komórek linii HepG2 pod wpływem badanych wyciągów i saponin wykorzystano test MTT. Jako związek referencyjny zastosowano doksorubicynę, która w stężeniu 100 µg/ml obniżała żywotność komórek tej linii prawie o 80% względem kontroli (Ryc. 30 A).

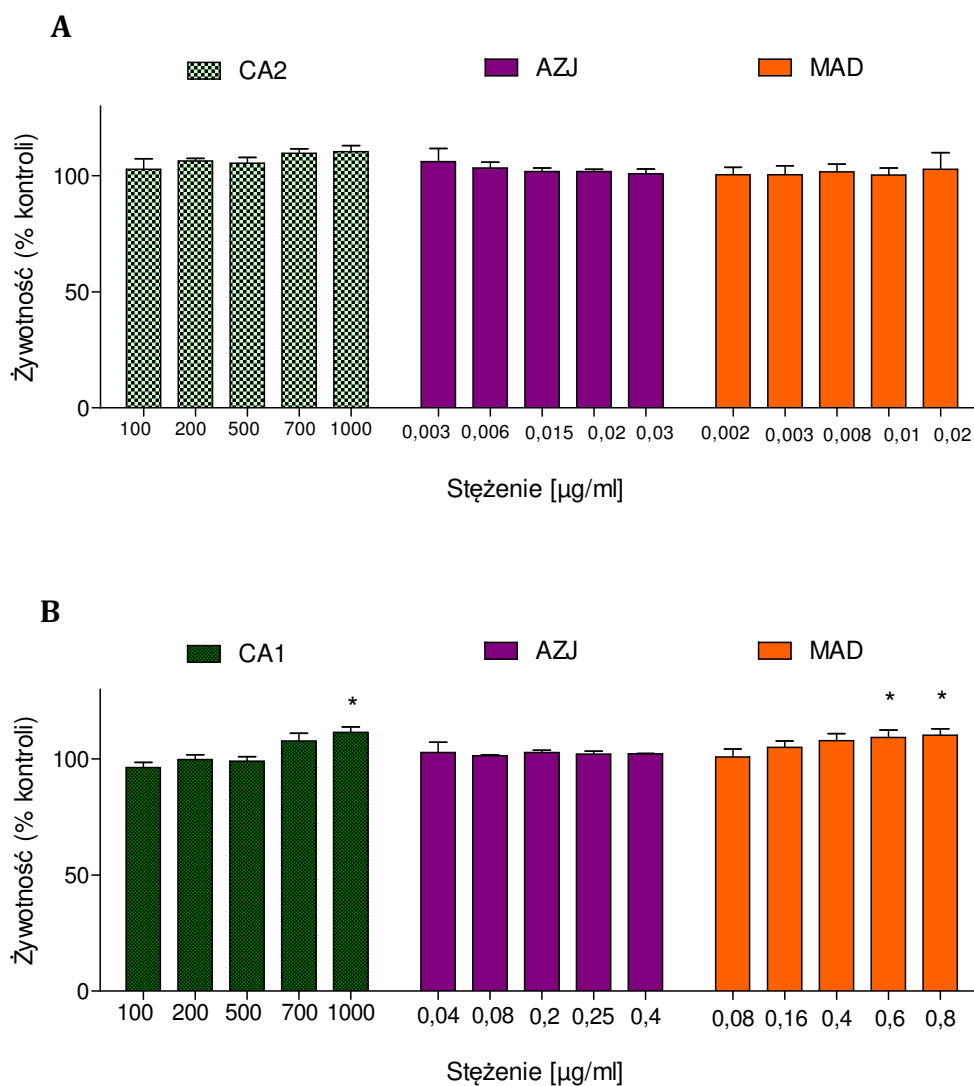
Nie zaobserwowano działania cytotoksycznego, ani testowanych wyciągów, ani azjatykozydu i madekasozydu. Obydwa testowane wyciągi CA1 i CA2 stymulowały żywotność komórek hepatocytów (Ryc. 30 A). W najwyższym stężeniu 1000 µg/ml podnosiły żywotność komórek o 30% (CA1) i 27% (CA2) w stosunku do kontroli.

Wyniki analiz sugerują, że zarówno azjatykozyd i madekasozyd nie wykazywały działania cytotoksycznego w stosunku do komórek linii HepG2. Obydwa związki we wszystkich testowanych stężeniach utrzymywały żywotność komórek na poziomie kontroli (Ryc. 30 B, C, D, E.).



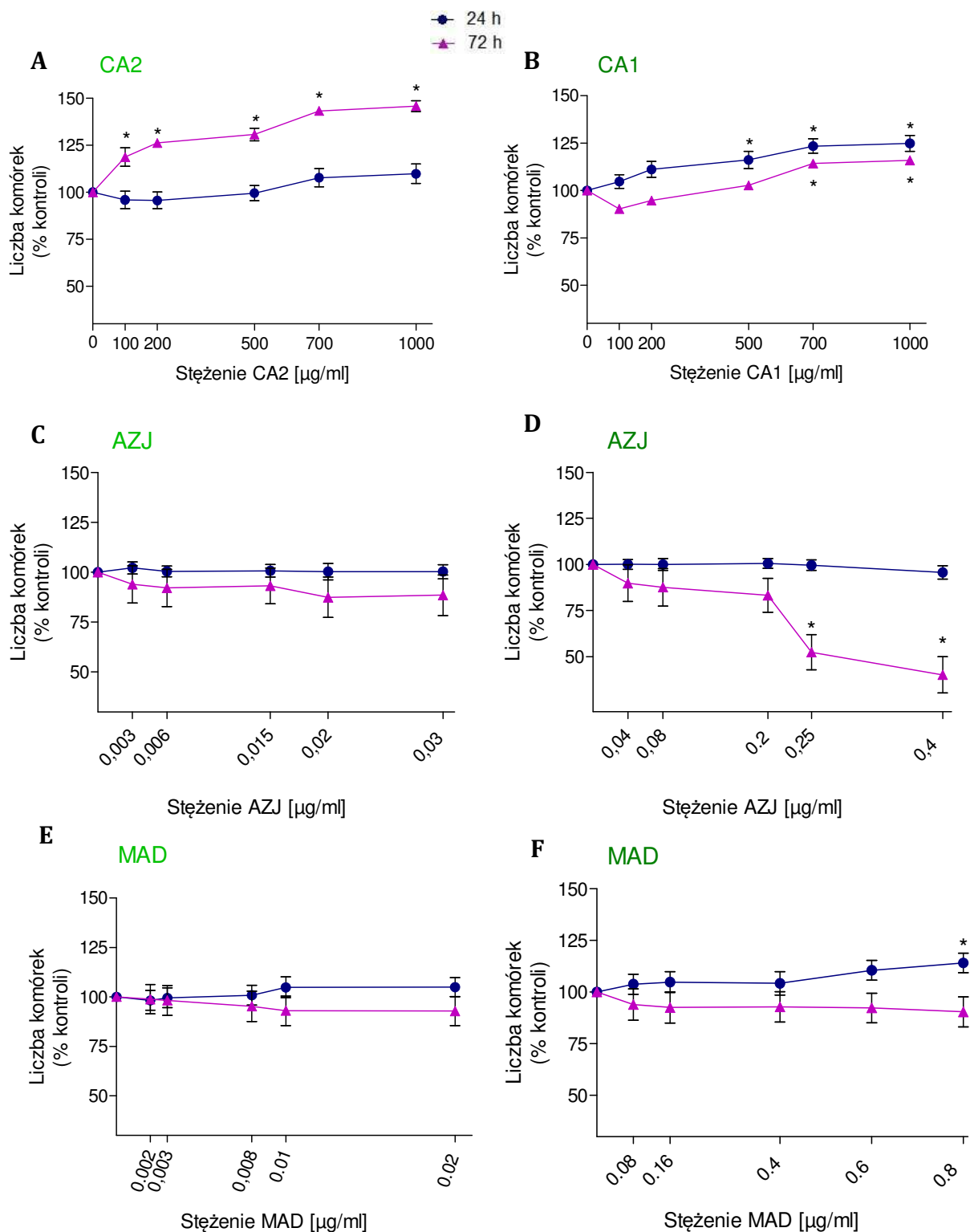
Rycina 30 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HepG2 w teście MTT.

Wyniki uzyskane w teście z czerwieniä obojętnä były porównywalne z wynikami testu MTT. Wyciągi CA1 i CA2 nie były cytotoksyczne w stosunku do komórek linii HepG2 (Ryc. 31). Azjatykozyd i madekasozyd również nie działały cytotoksycznie w stosunku do komórek tej linii (Ryc. 31 A, B). Testowane wyciągi i saponiny nie miały wpływu na aktywność endocytarnä komórek hepatocytów.



Rycina 31 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HepG2 w teście z czerwieniä obojętnä.

2.6. Badanie wpływu wyciągów i saponin na proliferację komórek nowotworowych wątroby – hepatocytów (HepG2)



Rycina 32 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii HepG2 w teście z fioletem krystalicznym.

Wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej nie wykazywały aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek linii HepG2, dlatego w teście z fioletem krystalicznym użyto całego zakresu badanych stężeń wyciągów CA1 i CA2.

Wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej CA1 i CA2 stymulowały namnażanie się komórek linii HepG2 (Ryc. 32 A, B). Szybszym i silniejszym wpływem na proliferację charakteryzował się wyciąg CA1, który w najwyższym stężeniu 1000 µg/ml już po 24h podnosił liczbę komórek do 125%. Po 72 h inkubacji hamował proliferację, jednak liczba żywych komórek utrzymywała się wciąż powyżej poziomu kontroli (Ryc. 32 B). Wyciąg CA2 również stymulował proliferację komórek HepG2. Po 72 h inkubacji w najwyższym testowanym stężeniu 1000 µg/ml obserwowano wzrost liczby żywych komórek do 145% (Ryc. 32 A).

Azjatykozyd po 24h inkubacji utrzymywał liczbę komórek na poziomie kontroli, jednak po 72h znacznie i w sposób istotny statystycznie hamował proliferację komórek linii HepG2 (Ryc. 32 C, D). W najwyższym testowanym stężeniu 0,37 µg/ml po 24 h inkubacji obniżał liczbę komórek do 87%, a po 72h już do 42%.

Madekasozyd nie wpływał na proliferację komórek linii HepG2 utrzymując ich liczbę na poziomie kontroli (Ryc. 32 E, F).

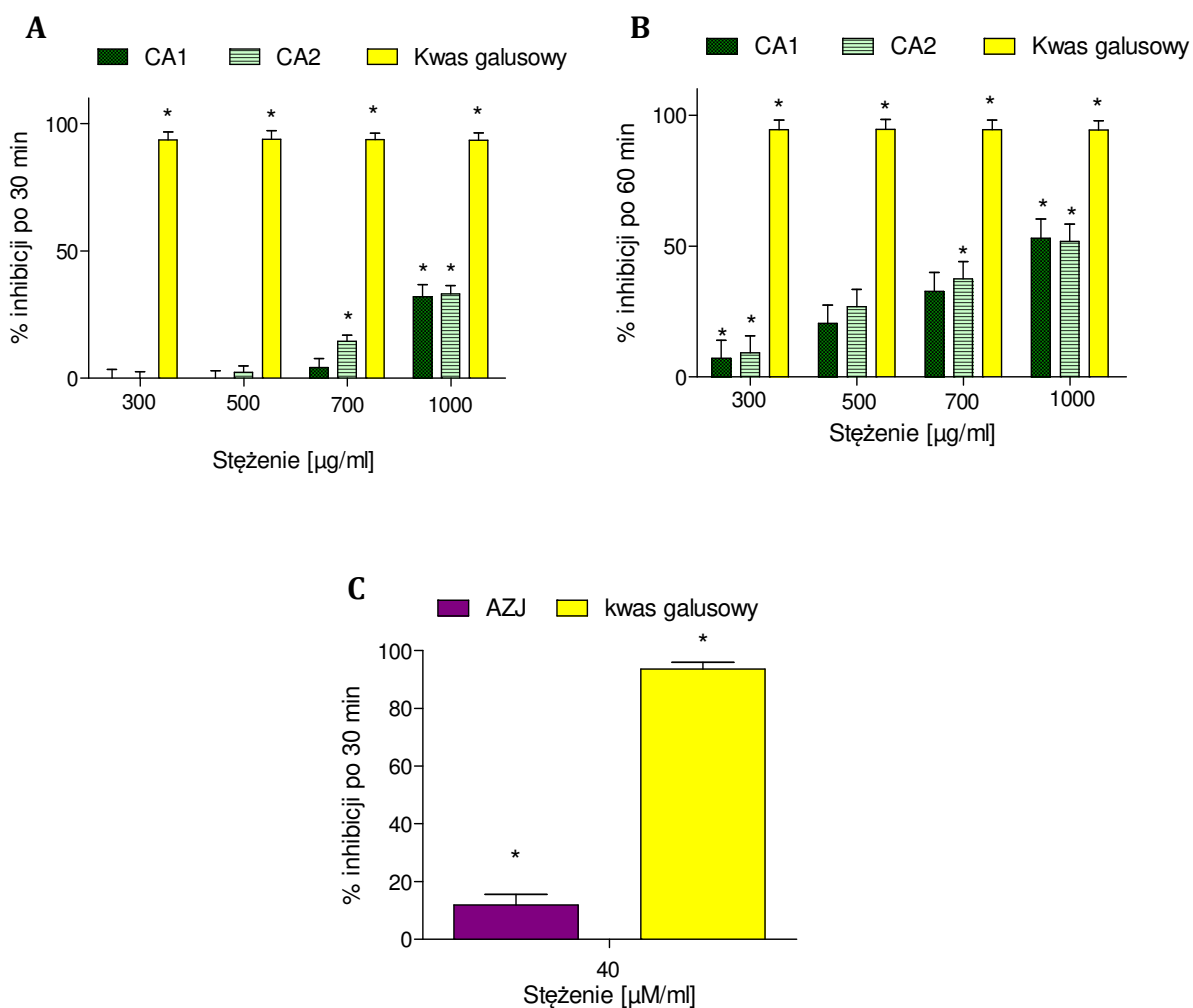
3. Badanie wpływu wyciągów i saponin na aktywność antyoksydacyjną

3.1. Zdolność wyciągów i saponin do dezaktywacji wolnych rodników

– test DPPH

Po 30 i/lub 60 minutowej inkubacji wyciągów CA1, CA2 i azjatykozydu w obecności DPPH oceniono ich zdolność do dezaktywacji wolnego rodnika. Jako kontroli referencyjnej użyto kwasu galusowego. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinie 33, jako zdolność badanych wyciągów i związków do przeciwdziałania reakcji utlenienia (w procencie inhibicji). W prezentowanej metodzie wysoki procent inhibicji świadczy o silnych właściwościach antyoksydacyjnych.

Z analizy wynika, że testowane wyciągi CA1 i CA2 wykazywały działanie przeciwutleniające (Ryc. 33 A, B).



Rycina 33 Zdolność CA1, CA2 i AZJ do dezaktywacji wolnego rodnika tlenowego DPPH.

W porównaniu z kwasem galusowym, którego procent inhibicji był na stałym wysokim poziomie, około 94%, zaobserwowano, że w przypadku wyciągów wraz z wydłużeniem czasu inkubacji i wzrostem stężenia, rosła również ich aktywność antyoksydacyjna (Ryc. 33 A, B). Po 30 minutach inkubacji zdolność wyciągów do dezaktywacji wolnego rodnika tlenowego obserwowano tylko w dwóch najwyższych stężeniach wyciągów 700 i 1000 µg/ml (Ryc. 33 A), a po 60 minutach już we wszystkich badanych stężeniach (Ryc. 33 B.). Obydwa wyciągi wykazywały działanie antyoksydacyjne na podobnym poziomie. W najwyższym badanym stężeniu 1000 µg/ml, po 30 minutowej inkubacji procent inhibicji wywoływany przez wyciągi wynosił około 33%, a po 60 minutach już powyżej 50%.

Azjatykozyd jedynie po 30 minutach inkubacji w najwyższym badanym stężeniu 40 $\mu\text{M}/\text{ml}$ wykazywał działanie antyoksydacyjne na poziomie 12% (Ryc. 33 C). Madekasozyd nie posiadał aktywności antyoksydacyjnej.

3.2. Zdolność wyciągów i saponin do redukcji jonów Fe(III) – test FRAP

Obydwa badane wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej posiadały aktywność antyoksydacyjną (Tabela 19) co potwierdza wyniki uzyskane w teście DPPH. Niewiele silniejszą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzował się wyciąg CA1 - 159 mg TE/ g s.m. vs CA2 - 138 mg TE/ g s.m.

Wartości ekwiwalentów Troloksu dotyczące testowanych wyciągów były dużo niższe w porównaniu z kwasem askorbinowym (AA), którego potencjał antyoksydacyjny jest prawie na takim samym poziomie, jak potencjał Troloksu (889 mg TE/g s.m. AA vs 1000 mg TE/g s.m. Troloksu). Azjatykozyd i madekasozyd nie wykazywały zdolności do redukcji jonów żelaza (III).

Tabela 19 Zdolność CA1 i CA2 do redukcji jonów żelaza (III) w teście FRAP.

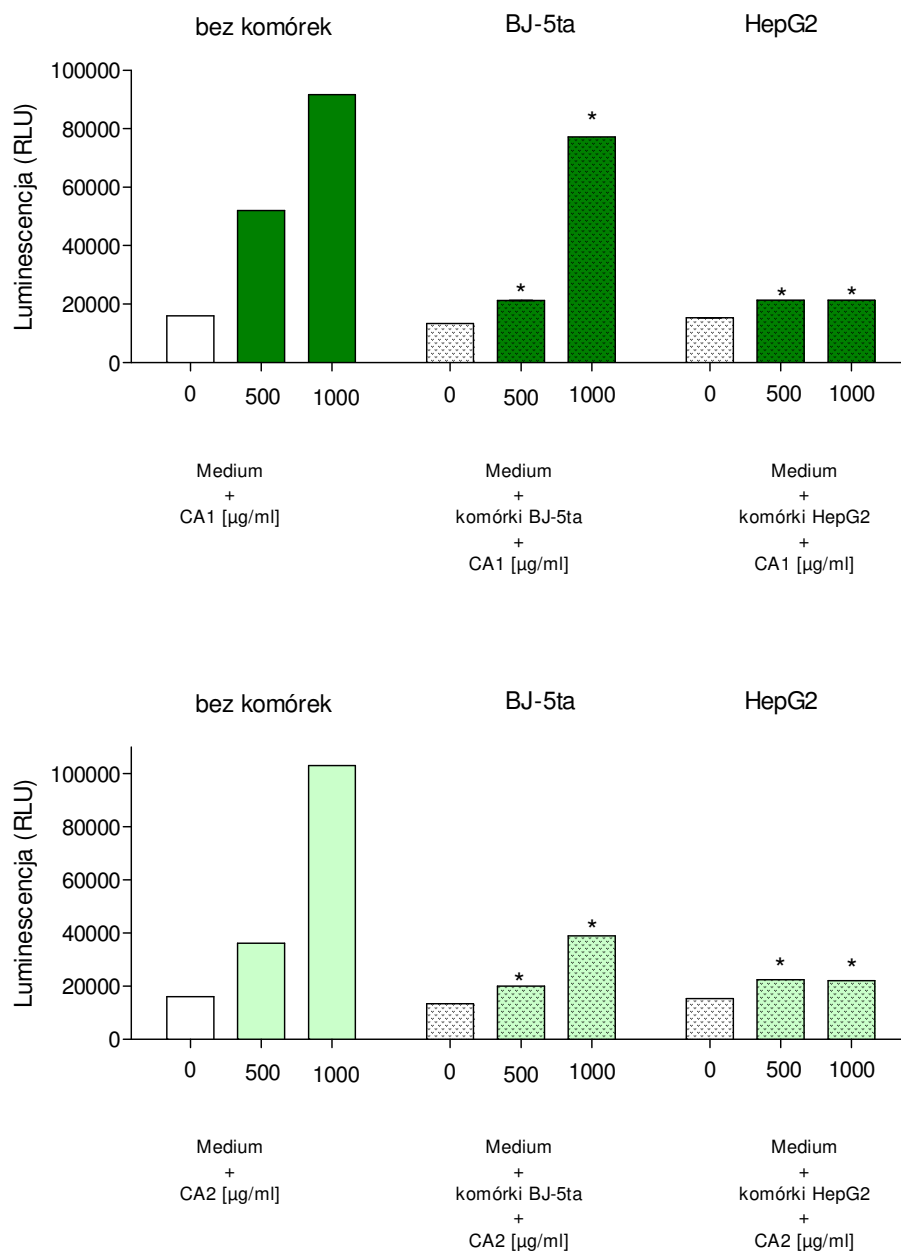
Substancja badana	Zdolność do redukcji jonów Fe(III) (mg TE/g suchej masy)
Wyciąg z rośliny szklarniowej (CA1)	159 *
Wyciąg z rośliny <i>in vitro</i> (CA2)	138 *
Kwas askorbinowy	889 *

3.3. Wpływ wyciągów na poziom reaktywnych form tlenu w hodowli komórek linii BJ-5ta i HepG2 – test ROS-Glo H₂O₂

Po 24 godzinnej inkubacji komórek linii BJ-5ta i HepG2 w obecności wyciągów CA1 i CA2 oceniono ich wpływ na poziom RFT w hodowli komórkowej za pomocą testu ROS-Glo H₂O₂. Test umożliwia chemiluminescencyjny pomiar ilości H₂O₂ powstającego w środowisku reakcji, co bezpośrednio przekłada się na poziom reaktywnych form tlenu. We wcześniej przeprowadzonych dwóch testach antyoksydacyjnych wykluczono silną aktywność przeciwutleniającą azjatykozydu i madekasozydu, dlatego saponiny nie zostały włączone do tego testu. Otrzymane wyniki przedstawione zostały jako średnia wartość luminescencji (RLU) uzyskana na podstawie pomiarów luminescencji badanych próbek. Im wyższa wartość RLU tym wyższy poziom wyprodukowanego H₂O₂.

Po przeprowadzeniu eksperymentu odnotowano obecność reaktywnych form tlenu w medium komórkowym bez komórek z zainkubowanymi wyciągami z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2). Poziom wyprodukowanego H₂O₂ spadał kiedy testowane wyciągi były inkubowane w obecności komórek linii BJ-5ta i HepG2 (Ryc. 34). Znaczący spadek poziomu H₂O₂ zaobserwowano w przypadku inkubacji wyciągów w obecności komórek linii HepG2. Obydwa wyciągi hamowały powstawanie H₂O₂ na podobnym poziomie, jednak w porównaniu z wartością RLU dla wyciągów inkubowanych z samym medium komórkowym to wyciąg CA1 w stężeniu 500 µg/ml obniżał wartość RLU czterokrotnie, a wyciąg CA2 w tym samym stężeniu obniżał wartość RLU dwukrotnie. Z kolei, w przypadku wyciągów CA1 i CA2 w stężeniu 1000 µg/ml obserwowano już ośmiokrotny spadek wartości RLU, a tym samym spadek wyprodukowanego H₂O₂ (Ryc. 34).

Dla fibroblastów obserwowano niższy spadek poziomu H₂O₂ powstałego w obecności wyciągów. Wyciąg z rośliny szklarniowej (CA1) w stężeniu 500 µg/ml obniżał czterokrotnie wartość RLU. Z kolei, wyciąg z rośliny *in vitro* (CA2) niezależnie od stężenia obniżał wartość RLU trzykrotnie (Ryc. 34).



Rycina 34 Wpływ CA1 i CA2 na poziom reaktywnych form tlenu w hodowli komórek linii BJ-5ta i HepG2 w teście ROS-Glo H_2O_2 .

4. Badanie aktywności mutagennej wyciągów – test Ames

Do badania aktywności mutagennej wyciągów zastosowano test Ames, do którego wybrano dwa szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 wchodzące w skład standardowego zestawu testowego zalecanego do przesiewowych badań mutagenności. Poszczególne szczepy są wrażliwe na mutageny wywołujące różne mutacje. Szczep *S.typhimurium* TA98 jest wrażliwy na działanie mutagenów wywołujących mutacje typu zmiany ramki odczytu, zaś szczep TA100 umożliwia wykrycie mutagenów wywołujących mutacje typu zamiany par zasad.

Aktywność mutagenną badanych wyciągów oceniono względem mutagenów wzorcowych dla poszczególnych szczepów, dla szczepu TA100 względem azydku sodu, a dla szczepu TA98 względem 4-nitro-*o*-fenylenodiaminy. Wyciągi CA1 i CA2 testowano w pięciu stężeniach 0.1, 0.5, 1.0, 1.25, 2.5 mg/płytką.

Na podstawie wyników uzyskanych w oparciu o analizę współczynnika mutagenności (MI), stwierdzono, że obydwa badane wyciągi z wąkroty we wszystkich testowanych stężeniach nie indukowały dwukrotnego wzrostu rewertantów *his+* w stosunku do kontroli negatywnej, czyli H₂O (ich współczynnik mutagenności, MI ≤ 2).

Na podstawie analizy wyników testu Ames stwierdzono, że testowane wyciągi CA1 i CA2 były pozbawione właściwości mutagennych (Tabela 20, str. 134).

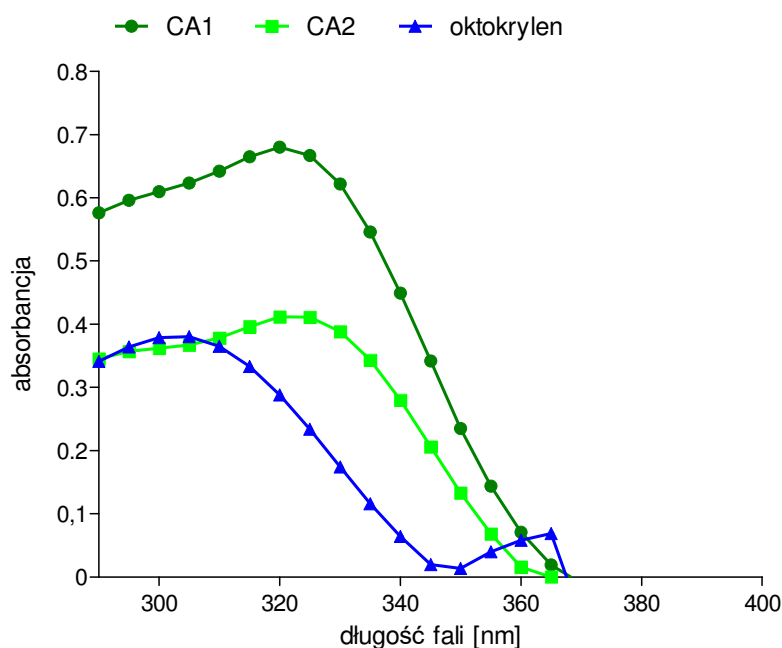
Tabela 20 Aktywność mutagenna wyciągów CA1 i CA2 oceniona w teście Ames.

		Liczba rewertantów na płytkę			
		<i>S. typhimurium</i> (TA98)		<i>S. typhimurium</i> (TA100)	
Testowane substancje	Stężenie (mg na płytkę)	Średnia ± SD	MI	Średnia ± SD	MI
CA1	2,5	2 ± 0,3	0,75	16,5±0,1	1
	1,25	0,6 ± 0,45	0,25	25,3±0,1*	1,6
	1,0	2 ± 0,45	0,75	29,7±0,1*	1,8
	0,5	1,6 ± 0,4	0,6	17±0,1	1
	0,1	2,6 ± 0,2	1	19±0,1	1,1
CA2	2,5	3,3 ± 0,5	1,2	29±0,1*	1,8
	1,25	2,6 ± 0,3	1	12,3±0,1	0,8
	1,0	1,3 ± 0,2	0,5	18,3±0,1	1,1
	0,5	2,3 ± 0,2	0,8	9±0,1*	0,5
	0,1	1 ± 0,5	0,3	10,3±0,1*	0,6
H ₂ O	0,005	2,6 ± 1,1		16±5,5	
NFDA ¹	0,005	464 ± 45	178		
AS ²	0,005			651,6±83,7	40

¹ 4-nitro-*o*-fenylenodiamina² azydek sodu

5. Zdolność wyciągów i saponin do absorpcji promieniowania UV

W ramach pracy zarejestrowano widma absorpcyjne w zakresie UV i na ich podstawie oszacowano aktywność fotoprotekcyjną testowanych wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej, azjatykozydu i madekasozydu. Zarejestrowano także widmo dla oktokrylenu (CRY), jednego z najczęściej używanych filtrów przeciwsłonecznych na rynku.



Rycina 35 Widma absorpcyjne w zakresie UV dla CA1 i CA2.

Analiza widm pozwoliła ustalić, że testowane wyciągi w stężeniu 200 µg/ml posiadały zdolność do pochłaniania UV zbliżoną do oktokrylenu testowanego w stężeniu 10 µg/ml (Ryc. 35). Maksimum absorpcji wszystkich testowanych substancji (CA1, CA2, CRY), mieściła się w zakresie fal krótkich promieniowania UVA (UVA2). Obydwa wyciągi w badanym stężeniu 200 µg/ml, posiadały podobne maksima absorpcji, odpowiednio: λ_{\max} CA1 = 321 nm, λ_{\max} CA2 = 322 nm. Z kolei λ_{\max} CRY w stężeniu 10 µg/ml wynosiło 303 nm. Intensywność absorpcji promieniowania UV jaką charakteryzował się wyciąg z rośliny szklarniowej (CA1), znacznie przewyższał intensywność absorpcji wyciągu z rośliny *in vitro* (CA2) i oktokrylenu (Ryc. 35).

V.Diskusja

Podczas projektowania nowych preparatów kosmetycznych niezwykle ważne są badania dotyczące aktywności biologicznej poszczególnych składników aktywnych. W trosce o zdrowie konsumentów, należy również zwrócić szczególną uwagę na badania nad bezpieczeństwem ich stosowania. W kosmetykach wykorzystuje się tysiące różnych substancji, a wiele z nich niestety nigdy nie zostało poddanych rzetelnym badaniom.

Wprowadzone na europejskim i polskim rynku kosmetycznym zmiany ustawodawcze dotyczące dopuszczania do obrotu kosmetyków posiadających w składzie substancje testowane na zwierzętach, są zgodne nie tylko z etyką w zakresie badań wykorzystujących zwierzęta, ale również z zasadą „3R” (ang. „*reduction, replacement, refinement*”). W badaniach tych kluczową pozycję zajmują testy z wykorzystaniem hodowli komórkowych *in vitro*. Testy bazujące na hodowlach komórkowych pozwalają na skrining wielu substancji kosmetycznych w szybszy i tańszy sposób, (w porównaniu z badaniami prowadzonymi na modelach zwierzęcych). Należy jednak pamiętać, że wyniki testów *in vitro* nie pozwalają na ocenę działania badanych substancji w odniesieniu do całego organizmu, a jedynie odnoszą się do procesów zachodzących w pojedynczych komórkach. Jednak w przypadku bardzo często nieprzebadanych składników kosmetycznych wyniki takich badań stanowią ogromną wartość, wskazują kierunek dla dalszych analiz i pozwalają na oszacowanie ich aktywności biologicznej.

Nowoczesna kosmetologia poświęca wiele uwagi składnikom pochodzenia roślinnego. Wyciągi roślinne i składniki naturalne wyizolowane z roślin cieszą się ogromną popularnością, jako substancje biologicznie aktywne, na których bazują całe linie kosmetyczne, a także produkty farmaceutyczne.

Światowa Organizacja Zdrowia określiła wąkrotę azjatycką jako jedną z najważniejszych na świecie roślin leczniczych [Azis i wsp. 2017]. Wyciągi z wąkroty azjatyckiej są źródłem wielu cennych składników aktywnych dzięki, którym przyspieszają gojenie się ran [Choochuay i wsp., 2016, Azis i wsp., 2017], wspomagają leczenie łuszczyca [Sampson i wsp., 2001], zapobiegają powstawaniu rozstępów skórnych [Mallol i wsp., 1991, Garcia-Hernandez i wsp., 2013], wykazują działanie przeciwstarzeniowe [Lee i wsp., 2006, Paolino i wsp., 2012] i antycellulitowe [Rawlings, 2006, Primastuti i wsp., 2013]. Wąkrota azjatycka jest rośliną o bogatym składzie,

dzięki któremu posiada szereg aktywności biologicznych, doskonale wpisujących się w wielokierunkowe potrzeby nowoczesnej kosmetologii.

Szerokie wykorzystanie wąkroty azjatyckiej w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym skutkuje tym, że roślina w stanie naturalnym jest zagrożona wyginięciem. Metodą alternatywną wykorzystywaną do pozyskiwania dużej ilości biomasy z wąkroty azjatyckiej, w celu otrzymywania z niej ekstraktów i składników aktywnych biologicznie, są kultury pędowe *in vitro*. Co więcej, jak donoszą dane literaturowe, ekstrakty wodne w porównaniu z metanolowymi charakteryzują się niższą cytotoksycznością, a tym samym są bezpieczniejsze dla komórek ludzkiego organizmu [Hanisa i wsp., 2014]. Spośród wielu rozpuszczalników wykorzystywanych do ekstrakcji, to właśnie woda jest najczęściej wykorzystywana w przemyśle. Zachowując wysoką wydajność ekstrakcji, producenci mają pewność bezpieczeństwa zastosowanego rozpuszczalnika dla ludzkiego organizmu [Offord i wsp., 2002]. Z tego powodu, w badaniach własnych zdecydowano się ocenić i porównać aktywność dwóch wyciągów z wąkroty azjatyckiej otrzymanych z rośliny z hodowli szklarniowej i z hodowli *in vitro*, które nie zostały do tej pory przebadane. Należy zwrócić uwagę, że badanie surowych ekstraktów oznacza pracę z mieszaniną różnych związków aktywnych biologicznie. Niektóre z nich mogą działać cytotoksycznie lub genotoksycznie, a inne mogą wykazywać aktywność cytoprotekcyjną lub antygenotoksyczną [Chippada i Vangalapati, 2012]. Aktywność biologiczna wyciągów roślinnych nierzadko wynika z synergistycznego działania różnych fitoskładników zawartych w ekstrakcie.

Badane wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej otrzymano z rośliny wyhodowanej w warunkach szklarniowych (CA1) i z rośliny wyhodowanej w warunkach *in vitro* (CA2). Do tej pory brak danych literaturowych na temat porównania aktywności biologicznej i bezpieczeństwa stosowania tych dwóch ekstraktów, a także na temat, czy ich aktywność jest uzależniona od zawartości w ekstraktach dwóch składników aktywnych, azjatykozydu (AZJ) i madekasozydu (MAD).

1. Aktywność wyciągów i saponin względem komórek prawidłowych

Bezpieczeństwo stosowania jest niezwykle ważnym aspektem w odniesieniu do stosowania ekstraktów wodnych z wąkroty azjatyckiej oraz ich głównych składników aktywnych, azjatykozydu i madekasozydu. Pomimo szerokiego stosowania składników pochodzenia naturalnego w preparatach kosmetycznych, niewiele z nich zostało dokładnie przetestowanych pod względem bezpieczeństwa ich stosowania. Badania nad efektem cytotoksycznym i wpływem na proliferację komórek skóry wydają się być bardzo ważnymi testami, które należy przeprowadzić w pierwszej kolejności.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej objęły dwa wodne wyciągi z wąkroty azjatyckiej i dwa główne składniki oznaczone w ekstraktach, azjatykozyd i madekasozyd. Badania nad bezpieczeństwem stosowania testowanych wyciągów i saponin przeprowadzono za pomocą dwóch różnych testów żywotności (MTT i z czerwienią obojętną) oraz testu z fioletem krystalicznym służącym do oceny ich wpływu na proliferację komórek fibroblastów, keratynocytów i astrocytów.

Z dostępnych danych literaturowych wynika, że do tej pory dużo dokładniej zostały przebadane wyciągi alkoholowe z wąkroty azjatyckiej. Porównując aktywność cytotoksyczną ekstraktów wodnych i metanolowych, to właśnie wyciągi wodne charakteryzowały się niższą cytotoksycznością [Hanisa i wsp., 2014].

Komórki skóry właściwej – fibroblasty (BJ-5ta)

Fibroblasty to komórki zlokalizowane w skórze właściwej odpowiedzialne za produkcję kolagenu i elastyny. W związku z tym są doskonałym modelem do testowania substancji kosmetycznych o potencjalnym działaniu przeciwstarzeniowym. Zanim jednak przeprowadzi się tego typu badania, należy ocenić bezpieczeństwo testowanych substancji w stosunku do komórek tej linii. Do tej pory bardzo nieliczne prace opisują wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej na komórki skóry [Maquart i wsp., 1990, Somboonwong i wsp., 2012]. Opisane do tej pory badania oceniające wpływ wąkroty azjatyckiej na komórki skóry, oparte są głównie na składnikach aktywnych pozyskanych z rośliny, azjatykozydzie, madekasozydzie i kwasie azjatykowym, a nie na surowych ekstraktach [Maquart i wsp., 1990, Lu i wsp., 2004, Lee i wsp., 2012].

Wszystkie testowane substancje, zarówno wyciągi z wąkroty azjatyckiej, jak i ich główne składniki aktywne, azjatykozyd i madekasozyd, były bezpieczne w stosunku do komórek fibroblastów, co potwierdzono zarówno w teście MTT, jak i w teście z czerwienią obojętną. Na podstawie analiz udało się ocenić nie tylko bezpieczeństwo stosowania, ale również aktywność biologiczną testowanych wyciągów z wąkroty azjatyckiej, azjatykozydu i madekasozydu w stosunku do komórek fibroblastów. Wszystkie testowane substancje stymulowały proliferację fibroblastów. W starzejącej się skórze ilość fibroblastów spada, co skutkuje zmniejszoną produkcją kolagenu i elastyny oraz zmniejszoną gęstością skóry. Pobudzanie fibroblastów do namnażania jest jednym z pożądaných efektów w kosmetykach przeciwstarzeniowych. Spośród wyciągów, silniejszą aktywnością charakteryzował się wyciąg z rośliny szklarniowej (CA1), który pobudzał namnażanie się fibroblastów, co nie tylko potwierdza bezpieczeństwo jego stosowania, ale również świadczy o tym, że ekstrakt z rośliny szklarniowej jest potencjalnym składnikiem o działaniu przeciwstarzeniowym, który nawet po długim czasie (72 h) inkubacji nie tracił aktywności stymulującej namnażanie się fibroblastów.

Podobną aktywność stymulującą namnażanie fibroblastów (HDF) zaobserwowali w swoich badaniach Azis i wsp. z tą różnicą, że do eksperymentów wykorzystali ekstrakt metanolowy, który jak donosi Hanisa i wsp. charakteryzuje się wyższym potencjałem cytotoksycznym niż wykorzystany w pracy doktorskiej ekstrakt wodny. Podobnego efektu nie zaobserwowano w przypadku miareczkowanego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej (TECA), który indukował syntezę kolagenu bez wpływu na namnażanie się fibroblastów [Maquart i wsp., 1990].

Działanie wyciągu z rośliny szklarniowej może być wywołane aktywnością madekasozydu, który również stymulował namnażanie komórek fibroblastów. Co więcej, efekt działania samego madekasozydu był silniejszy niż w przypadku działania całego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej otrzymanego z rośliny szklarniowej. Wynik ten wskazuje i potwierdza synergizm działania różnych składników zawartych w mieszaninie jaką jest ekstrakt. Obserwowany wzrost liczby fibroblastów pod wpływem madekasozydu pozwolił wyselekcjonować madekasozyd jako składnik o działaniu przeciwstarzeniowym. Jest to niezwykle istotna obserwacja, ponieważ do tej pory, to azjatykozyd, a nie madekasozyd był wskazywany jako składnik wyciągów z wąkroty azjatyckiej odpowiedzialny za pobudzanie komórek fibroblastów

do namnażania. Co więcej, w badaniach przeprowadzonych przez Wu i wsp. wykazano, że madekasozyd nie pobudzał fibroblastów do namnażania, wykazując równocześnie efekt przeciwstarzeniowy poprzez stymulowanie syntezy prokolagenu i kolagenu typu I i III.

Również azjatykozyd stymulował namnażanie fibroblastów, jednak jego aktywność nie była aż tak silna jak madekasozydu. Prezentowane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami na temat indukcji namnażania fibroblastów pod wpływem azjatykozydu [Lu i wsp., 2004, Lee i wsp., 2012]. Należy zwrócić uwagę na różnice w efekcie działania azjatykozydu w zależności od rodzaju fibroblastów wykorzystanych w badaniach. W pracy doktorskiej wykorzystano prawidłowe komórki fibroblastów, których namnażanie było stymulowane przez azjatykozyd. Z kolei, Tang i wsp. donoszą, że azjatykozyd hamował proliferację fibroblastów pozyskanych z keloidu w sposób zależny od dawki i czasu, co wywoływało pozytywny efekt w postaci prawidłowego bliznowacenia rany. Porównując te wyniki, można zauważyć selektywność działania azjatykozydu w stosunku do fibroblastów różnego pochodzenia.

Komórki naskórka – keratynocyty (HaCaT)

Prawidłowe keratynocyty to komórki występujące w naskórku, które kontaktują się z preparatem kosmetycznym, dlatego bezpieczeństwo testowanych wyciągów i saponin oceniono również w stosunku do komórek linii HaCaT. W wyniku analiz zaobserwowano cytotoksyczny wpływ wyższych stężeń azjatykozydu (0,2 – 0,4 µg/ml) w stosunku do keratynocytów. Maksymalne bezpieczne stężenie azjatykozydu określone na podstawie testu MTT wynosiło 0,08 µg/ml.

Z kolei, testowane w pracy doktorskiej wyciągi z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2) oraz madekasozyd były bezpieczne w stosunku do keratynocytów. Dzięki temu prowadzono dalsze analizy dotyczące oceny aktywności biologicznej w stosunku do keratynocytów. W przypadku keratynocytów potencjalna aktywność ekstraktów hamująca ich namnażanie mogłaby zostać wykorzystana w terapii łuszczycy, ponieważ jednym z patomechanizmów tej choroby jest nadmierna proliferacja tych komórek. Inhibicja proliferacji keratynocytów linii SVK-14 pod wpływem wodnego wyciągu z wąkroty azjatyckiej, azjatykozydu i madekasozydu została wcześniej opisana przez Sampson i wsp. Obydwa testowane w pracy doktorskiej wyciągi CA1 i CA2 hamowały

namnażanie się komórek keratynocytów. Silniejszą aktywnością antyproliferacyjną charakteryzował się wyciąg z rośliny szklarniowej (CA1). Azjatykozyd w bezpiecznym stężeniu dla komórek wykazywał nieznaczny wpływ hamujący ich namnażanie dopiero po 72 godzinnej inkubacji. Podobnie madekasozyd, po 72 godzinnej inkubacji hamował proliferację komórek linii HaCaT. Krótsza inkubacja komórek w obecności madekasozydu skutkowałą nieznaczną stymulacją proliferacji. Analiza wyników pozwoliła stwierdzić, że ekstrakty z *Centella asiatica* posiadały aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek ludzkiego naskórka. Na uwagę zasługuje fakt, że ani azjatykozyd ani madekasozyd nie były odpowiedzialne za to działanie. W przypadku ekstraktu z rośliny *in vitro* (CA2), zawarta w nim ilość azjatykozydu i madekasozydu była zbyt niska, aby wywołać efekt antyproliferacyjny.

Pozytywne wyniki dotyczące bezpieczeństwa i aktywności biologicznej testowanych wyciągów CA1 i CA2 były przesłanką do podjęcia dalszych badań nad wpływem niskich stężeń wyciągów na aktywność migracyjną keratynocytów w teście zarastania rany *in vitro*.

Proces gojenia ran jest złożony i obejmuje kilka skomplikowanych faz. Wkrótce po ustąpieniu zapalenia rany, następuje migracja fibroblastów i keratynocytów do rany. Komórki te następnie przylegają do brzegów rany i zaczynają proliferować [Lee i wsp., 2012]. Szybkość migracji komórek odnosi się do szybkości migracji w pewnych ramach czasowych. Zazwyczaj komórki migrują w kierunku pustych przestrzeni. Jednak należy zwrócić uwagę, że szybkość migracji zależy również od środowiska rany [Liang i wsp., 2007]. Stale poszukuje się związków, które przyspieszyłyby proces migracji komórek z tkanek otaczających do rany, a następnie stymulowały ich namnażanie w celu zarośnięcia rany. Jest wysoce prawdopodobne, że wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej mają pozytywny wpływ na szybkość migracji komórek naskórka. Proces gojenia się ran jest procesem fizjologicznym i w zdrowym organizmie nie wymaga dodatkowego wsparcia. Jednak u pacjentów chorujących np. na cukrzycę proces gojenia się zostaje zaburzony i należy odpowiednio zaopatrzyć ranę w celu jej jak najszybszego zagojenia.

Jak wspomniano wcześniej migracja, adhezja i proliferacja to podstawowe procesy zaangażowane w gojenie się ran na poziomie komórkowym. Najważniejszymi zaś komórkami biorącymi udział w tym procesie są keratynocyty i fibroblasty. Sugeruje się, że ruch keratynocytów na powierzchni rany wpływa na naprawę naskórka w procesie gojenia ran [Lee i wsp., 2012], dlatego do badań nad aktywnością wyciągów

CA1 i CA2 na tempo zarastania rany wybrano linię keratynocytów (HaCaT). Pozytywny wpływ testowanych wyciągów CA1 i CA2 na żywotność i proliferację keratynocytów spowodował prowadzenie dalszych badań pod kątem ich wpływu na migrację keratynocytów do rany przy użyciu testu zarastania rany *in vitro*. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono większe tempo zarastania rany przez keratynocyty pod wpływem wyciągu CA1, który już w najniższym testowanym stężeniu 100 µg/ml wykazywał identyczną aktywność, jak wyciąg CA2 w stężeniu 500 µg/ml. Zaobserwowano również, że wraz ze wzrastającym stężeniem wyciągu CA1, spada jego pozytywny wpływ na szybkość migracji keratynocytów. Podobnych obserwacji wpływu wodnego wyciągu z wąkroty azjatyckiej względem komórek RCE dokonali Ruszymach i wsp.

Wyciąg CA1 w najniższym testowanym stężeniu 100 µg/ml po 24 h inkubacji nie tylko w istotny statystycznie sposób pobudzał proliferację keratynocytów, ale również pozytywnie wpływał na tempo zarastania rany. Z kolei, wyciąg CA2 po 24 godzinnej inkubacji w stężeniu 500 µg/ml nie wywarł istotnego wpływu na proliferację komórek HaCaT, ale w istotny statystycznie sposób zwiększył migrację keratynocytów do rany. Uzyskane wyniki sugerują potencjalny efekt terapeutyczny wyciągów dla ponownej epitelializacji warstwy rogowej naskórka podczas procesu gojenia się ran. Podczas ponownej epitelializacji, keratynocyty namnażają się i różnicują, aby przywrócić ochronną funkcję warstwy rogowej naskórka. Skrócenie czasu migracji, a tym samym czasu gojenia się rany ma niezwykle istotny wpływ w przypadku trudno gojących się ran. Podobne wyniki uzyskali Ruszymach i wsp., którzy w wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzili, że wodny ekstrakt z wąkroty azjatyckiej badany w niższych stężeniach (62,5 ppm) wspomaga migrację komórek RCE (królicze komórki nabłonka warstwy rogowej). Komórki RCE migrowały szybciej i już po 2 dniach zaobserwowano całkowite zarośnięcie rany [Ruszymach i wsp., 2012]. Dane literaturowe donoszą również o pozytywnym wpływie metanolowej frakcji wyciągu z wąkroty azjatyckiej badanej w stężeniach 0,2 i 100 µg/ml, które w porównaniu do próby kontrolnej miały pozytywny wpływ na szybkość migracji komórek linii HaCaT [Azis i wsp., 2017]. Zwraca się również uwagę na inny aspekt wpływu wodnych wyciągów z wąkroty azjatyckiej w procesie gojenia się ran. Jak podają Somboonwong i wsp., wodne ekstrakty z wąkroty azjatyckiej charakteryzują się dużą

zawartością flawonoidów, o silnej aktywności antyoksydacyjnej, które redukują stres oksydacyjny w ranie, a tym samym przyspieszają jej gojenie.

Analiza wyników pozwoliła wykazać, że ani azjatykozyd, ani madekasozyd nie były odpowiedzialne za pozytywny wpływ wyciągów na tempo zarastania rany *in vitro*. Badane w pracy doktorskiej saponiny, azjatykozyd i madekasozyd nie wykazywały pozytywnego wpływu na tempo zarastania rany. Najprawdopodobniej wynika to ze zbyt niskich testowanych stężeń związków, które wynikały z ilości azjatykozydu i madekasozydu zawartych w badanych wyciągach. Dane literaturowe donoszą, że azjatykozyd przyspiesza o 20% migrację fibroblastów (aHDFs) i keratynocytów (aNHEKs) w porównaniu do próby kontrolnej. Wyniki badań wykazały również, że azjatykozyd ułatwia i stabilizuje adhezję komórek skóry. Azjatykozyd może więc zostać wykorzystany jako składnik sztucznej skóry właściwej, dzięki czemu przeszczepiony naskórek mógłby przyłączać się do niej szybciej i mocniej [Lee i wsp. 2012]. Wyniki tych badań potwierdzają eksperymenty *in vivo* przeprowadzone na myszach przez Wu i wsp, którzy udowodnili, że zarówno azjatykozyd jak i madekasozyd przyspieszają gojenie się ran. Co więcej, zaobserwowali, że w grupie leczonej madekasozydem rany goiły się szybciej w porównaniu do grupy leczonej azjatykozydem.

Komórki glejowe – astrocyty (C8D1A)

Ze względu na liczne doniesienia literaturowe o neuroprotekcijnym działaniu wąkroty azjatyckiej [Soumyanath i wsp., 2005, Soumyanath i wsp, 2012, Gray i wsp., 2015, Gray i wsp., 2016, Luo i wsp., 2018 Song i wsp., 2018], a także pozytywnym wpływie wyciągów z *Centella asiatica* na procesy poznawcze i zapamiętywanie do badań nad bezpieczeństwem włączono linię komórek glejowych – astrocytów.

Wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej testowane w pracy doktorskiej nie były do tej pory badane pod kątem ich bezpieczeństwa stosowania w stosunku do astrocytów. Do tej pory brak również doniesień naukowych o testach prowadzonych z wykorzystaniem azjatykozydu i madekasozydu w stosunku do tej linii komórkowej. Bezpieczeństwo stosowania wyciągu wodnego z *Centella asiatica* zostało już wcześniej udokumentowane w stosunku do komórek nowotworowych współczulnego układu nerwowego, linii SHSY i MC65 [Gray i wsp., 2014, Gray i wsp., 2015], jednak nie

prowadzono do tej pory analiz potwierdzających bezpieczeństwo testowanych wyciągów wodnych w stosunku do prawidłowych astrocytów.

Wyniki eksperymentów prowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykazały, że wyciąg otrzymany z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2) w najwyższym stężeniu 1000 µg/ml hamował proliferację oraz wykazywał działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek astrocytów, obniżając ich żywotność aż o 40%. Wyniki te mogą świadczyć o działaniu neurotoksycznym ekstraktu z rośliny *in vitro*. Efektu cytotoksycznego nie zaobserwowano natomiast w przypadku wyciągu z rośliny szklarniowej (CA1), azjatykozydu i madekasozydu, co świadczy o bezpieczeństwie ich stosowania w stosunku do astrocytów.

Pozytywne wyniki uzyskane w ramach badania bezpieczeństwa stały się przyczynkiem do badań aktywności glioprotekcyjnej testowanych wyciągów i saponin w stężeniach bezpiecznych dla astrocytów.

Wąkrota azjatycka posiada udokumentowane działanie neuroprotekcyjne, jednak o działaniu glioprotekcyjnym wiadomo niewiele. Biorąc pod uwagę fakt, że komórki glejowe są odpowiedzialne za właściwe funkcjonowanie komórek nerwowych – ich kondycja w obrębie układu nerwowego jest niezwykle ważna. Dowiedziono, że astrocyty nie tylko biorą udział w utrzymaniu prawidłowej homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym, chronią komórki nerwowe przed uszkodzeniem, ale odpowiadają również, za przewodnictwo nerwowe i komunikację komórek nerwowych. Wszystkie te aktywności warunkują zachowanie swoistego mikrośrodowiska w obrębie ośrodkowego układu nerwowego i umożliwiają właściwe funkcjonowanie komórek nerwowych [Liu i Chopp, 2016]. W badaniach *in vitro* stwierdzono aktywność neuroprotekcyjną wyciągu wodnego [Gray i wsp., 2015], azjatykozydu [Song i wsp., 2018] i madekasozydu [Luo i wsp., 2018]. Prowadzono również szerokie badania nad zdolnością neuroregeneracyjną kwasu azjatykowego, w ramach których wykazano jego zdolność do promowania wydłużania neurytów komórek SH-SY5Y [Soumyanath i wsp., 2005]. Wyniki tych badań zostały również poparte eksperymentami *in vivo* przeprowadzonymi na szczurach [Haleagrahara i Ponusamy, 2010] i myszach [Gray i wsp., 2016], w których testowano wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej.

Uszkodzenie komórek wywołane stresem oksydacyjnym jest związane zarówno z postępowaniem starzenia się, jak i z wieloma zaburzeniami neurodegeneracyjnymi, takimi jak np. choroba Parkinsona. Wiele badań wykazało powiązania pomiędzy stresem

oksydacyjnym, a rozwojem chorób neurodegeneracyjnych. Wolne rodniki tlenowe łatwo uszkadzają cząsteczki biologiczne, a takie uszkodzenie może ostatecznie doprowadzić do apoptozy komórkowej lub martwicy [Guo i wsp., 2013]. Badania przeprowadzone pośmiertnie u osób chorujących na Parkinsona wykazały, że wiele lipidów, białek i kwasów nukleinowych (w tym DNA) w mózgu uległo zniszczeniu w wyniku stresu oksydacyjnego [Haleagrahara i wsp., 2011]. Apoptoza komórek neuronalnych odgrywa kluczową rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Zmiany neuronalne występujące podczas starzenia się, w niektórych przypadkach mogą również powodować upośledzenie zdolności poznawczych [Gray i wsp., 2016].

Wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej CA1 i CA2 testowane w ramach pracy doktorskiej nie były do tej pory badane pod kątem ich aktywności glioprotekcyjnej.

W celu indukcji uszkodzeń w astrocytach, mających naśladować uszkodzenia komórek glejowych, w modelu eksperymentalnym wykorzystano doksorubicynę (DOX) – chemioterapeutyk o działaniu cytotoksycznym. Wyniki badań przeprowadzonego eksperymentu potwierdziły spadek żywotności astrocytów inkubowanych w obecności doksorubicyny (Ryc. 22, str. 112). Jednakże preinkubacja z wyciągami CA1 i CA2 z wąkroty azjatyckiej znacząco podnosiła żywotność komórek, co świadczy o ochronnym działaniu ekstraktów przed uszkodzeniami indukowanymi przez doksorubicynę (Ryc. 22, str. 112). Również preinkubacja z azjatykozydem i madekasozydem pozytywnie wpływa na żywotność komórek, traktowanych następnie doksorubicyną. Podobne wyniki uzyskano preinkubując z azjatykozydem komórki śródbłonna mózgu ludzkiego (hBMECs), co zapobiegało toksycznemu działaniu amyloidu β , znanego z neurotoksyczności i charakterystycznego dla choroby Alzheimera [Song i wsp., 2018]. Wyniki uzyskane po preinkubacji astrocytów z madekasozydem były również zgodne z danymi uzyskanymi przez Luo i wsp., którzy wykazali, że preinkubacja komórek z madekasozydem chroni komórki mikroglejowe (linia BV2) przed uszkodzeniem. Co więcej, wykazano, że madekasozyd działa neuroprotekcyjne ponieważ moduluje aktywność antyoksydacyjną, przeciwzapalną i przeciwapoptotyczną komórek [Luo i wsp., 2018]. Badania prowadzone przez Su i wsp. wykazały, że madekasozyd działa ochronnie przeciwko uszkodzeniom wywołanym przez doksorubicynę w modelu badawczym neurotoksyczności [Su i wsp. 2015].

Rosnącą żywotność astrocytów zaobserwowano również przy jednoczesnym zastosowaniu wyciągów z wąkroty azjatyckiej CA1/CA2/azjatykozydu/madekasozydu z

doksorubicyną, co wskazuje na ich działanie zapobiegające efektowi toksycznemu wywoływanemu przez doksorubicynę (Ryc. 23 str. 114). Wyniki badań przeprowadzonych przez Gray i wsp., również potwierdziły, że wodny ekstrakt z wąkroty azjatyckiej posiadał działanie neuroprotektoryjne. Autorzy wykazali, że ekstrakt zmniejszył poziom wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, a także indukował ekspresję genów odpowiedzi antyoksydacyjnej. Dane te sugerują wpływ wyciągu wodnego z wąkroty azjatyckiej na biogenezę mitochondrialną RFT, która w połączeniu z aktywacją genów odpowiedzi antyoksydacyjnej i normalizacją homeostazy wapnia prawdopodobnie przyczynia się do jej neuroprotektoryjnego działania przeciwko toksycznemu działaniu A β [Gray i wsp., 2015].

Azjatykozyd po podaniu jednoczesnym z doksorubicyną nie zapobiegał jej efektowi toksycznemu, utrzymując żywotność komórek na poziomie porównywalnym z doksorubicyną.

Z kolei, madekasozyd wykazywał najsilniejsze działanie ochronne. Jednoczesne zastosowanie madekasozydu i doksorubicyny (DOX1 i DOX5) skutkowało wzrostem żywotności komórek astrocytów (Ryc. 23 str. 114).

2. Aktywność wyciągów i saponin względem komórek nowotworowych

Czerniak skóry jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z komórek melanocytarnych i według Krajowego Rejestru Nowotworów jest najczęstszą przyczyną zgonów wśród chorych na nowotwory złośliwe. W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost liczby chorych, jest to nawet około 3100 nowych zachorowań rocznie [Rutkowski i Wysocki, 2017]. Istnieje wiele czynników ryzyka rozwoju czerniaka skóry, jednak za najistotniejsze uznaje się, nadmierną ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe, jak również kumulacyjną ekspozycję na Słońce połączoną z oparzeniami słonecznymi [Rutkowski i Wysocki, 2017, Ruka i wsp., 2009]. Czerniak jest nowotworem niezwykle opornym na chemioterapię, która jest skuteczna zaledwie u 15-20% chorych. Należy zwrócić uwagę, że można zapobiegać zachorowaniom na czerniaka, poprzez stosowanie odpowiedniej ochrony przeciwsłonecznej. Aplikacja kremów z filtrem o wysokim faktorze, osłona ciała odpowiednimi ubraniami, a także unikanie solarium i edukacja o jego szkodliwym

wpływie, powinny skutkować ograniczeniem ekspozycji na główny czynnik etiologiczny choroby, a tym samym przyczynić się do spadku zachorowalności.

Jak donoszą dane literaturowe, prawie 60% komercyjnie dostępnych środków przeciwnowotworowych jest pochodzenia naturalnego [Kumari i wsp., 2016]. Liczne badania naukowe potwierdzają aktywność przeciwnowotworową wyciągów z wąkroty azjatyckiej, jednak nie badano ich aktywności przeciwko komórkom nowotworowym czerniaka skóry uwzględnionym w pracy doktorskiej. Wąkrota azjatycka jako roślina o potwierdzonym działaniu przeciwstarzeniowym i promieniochronnym staje się potencjalnym składnikiem kosmetycznym, który w preparatach dla skóry dojrzałej mógłby zarazem działać chemoprewencyjnie. Ciekawym aspektem wydaje się również, że najwyższy wskaźnik zapadalności na czerniaka odnotowuje się w Australii, która jest również naturalnym miejscem bytowania wąkroty azjatyckiej. Potencjalny efekt przeciwnowotworowy wąkroty azjatyckiej mógłby więc zostać szybko wykorzystany, a zarazem wpisać się w ekologiczno-lokalny trend produkcji kosmetyków.

Cytotoksyczność wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej została udowodniona w stosunku do komórek nowotworowych raka płuca (A549) i raka nerek (BHK-1) [Pittella i wsp., 2009]. Jednak aktywność przeciwnowotworowa wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej nie była do tej pory testowana w stosunku do komórek czerniaka uwzględnionych w pracy doktorskiej.

Do tej pory pod kątem aktywności przeciwnowotworowej dużo dokładniej niż wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej zostały przebadane wyciągi alkoholowe. Badacze potwierdzili działanie cytotoksyczne etanolowego ekstraktu z liści w stosunku do komórek nowotworowych płuca (A549) [Naidoo i wsp., 2017]. Wykazano również, że metanolowe ekstrakty z wąkroty azjatyckiej i wyizolowane z nich składniki aktywne działają proapoptotycznie w stosunku do komórek raka sutka (MCF-7), a także wykazują działanie antyproliferacyjne w stosunku do ludzkich komórek: gruczolakoraka żołądka (MK-1), szyjki macicy (HeLa) i mysich komórek czerniaka (B16F10) [Yoshida i wsp., 2005, Babykutty i wsp., 2009].

Badane w pracy doktorskiej saponiny wyizolowane z wąkroty azjatyckiej, azjatykozyd i madekasozyd, również posiadają udowodnione działanie przeciwnowotworowe. Wykazano, że madekasozyd, badany w dużo wyższych stężeniach niż testowano w pracy doktorskiej, hamuje proliferację i migrację komórek

nowotworowych linii HepG2 i SMMC-77 [Li i wsp., 2016]. Z kolei, azjatykozyd, jest odpowiedzialny za inhibicję proliferacji komórek nowotworowych sutka linii MCF-7 [Al-Saeedi, 2014]. Sugeruje się, że azjatykozyd, w warunkach *in vitro* nie posiada tak silnej aktywności, jak w warunkach *in vivo*, co podyktowane jest szybkim przekształceniem azjatykozydu do kwasu azjatykowego, który następnie działa w organizmie. To właśnie kwas azjatykowy jest najdokładniej przebadanym w modelu komórkowym komponentem wyciągów z wąkroty azjatyckiej. Wykazano, że indukuje apoptozę komórek czerniaka ludzkiego (SK-MEL-2), jak również ludzkich komórek raka jajnika (SKOV3 i OVCAR-3), zachowując przy tym selektywność działania, nie wpływając negatywnie na żywotność komórek prawidłowych [Park i wsp., 2005, Ren i wsp., 2016].

Komórki czerniaka skóry (A375)

Jedynie ekstrakt otrzymany z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2) obniżał żywotność komórek czerniaka skóry linii A375 (Ryc. 24 B, str. 116). W porównaniu ze związkiem referencyjnym, winblastyną, efekt cytotoksyczny ekstraktu został wywołany przez dużo wyższe stężenia, jednak należy zwrócić uwagę, że ekstrakt z wąkroty azjatyckiej jest substancją roślinną, a czerniak skóry nowotworem opornym na chemioterapię, przez co uzyskane wyniki cytotoksyczności na tym poziomie mogą świadczyć o chemoprewencyjnym działaniu ekstraktu (CA2).

Analiza wyników cytotoksyczności pozwoliła stwierdzić, że za aktywność cytotoksyczną ekstraktu z rośliny *in vitro* nie były odpowiedzialne obecne w nim saponiny. Azjatykozyd obniżał żywotność komórek czerniaka, wywołując efekt cytotoksyczny w najwyższych stężeniach. Jednak w ekstrakcie z rośliny *in vitro* nie notowano tak wysokich stężeń azjatykozydu.

Uzyskane wyniki wpływu badanych wyciągów na proliferację komórek linii A375, świadczą o ich aktywności cytostatycznej, gdzie silniejszą aktywnością charakteryzował się wyciąg z rośliny szklarniowej (CA1). W przypadku aktywności antyproliferacyjnej, obydwie saponiny obecne w wyciągach mogły być odpowiedzialne za cytostatyczne działanie wyciągu, ponieważ zarówno azjatykozyd i madekasozyd w dawkozależny sposób hamowały proliferację komórek czerniaka skóry.

Komórki czerniaka – przerzut z płuca (WM793)

Linia komórek czerniaka przerzutu z płuca (WM793) była bardziej wrażliwa na działanie testowanych wyciągów. Obydwa wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej obniżały żywotność komórek tej linii, a także hamowały namnażanie wykazując działanie chemoprewencyjne i cytostatyczne (Ryc. 27 A, str. 120; Ryc. 29 A, B, str. 123). Należy zwrócić uwagę, że powyższa aktywność cytotoksyczna wyciągów nie była wywołana przez żadną z saponin obecną w ekstraktach, ani azjatykozyd ani madekasozyd nie działały cytotoksycznie w stosunku do komórek linii WM793. Zaobserwowano nawet, że azjatykozyd podnosił żywotność komórek tej linii. Jednak zarówno azjatykozyd jak i madekasozyd wykazywały działanie cytostatyczne, hamując namnażanie się komórek czerniaka. Silniejszą aktywnością cytostatyczną charakteryzował się madekasozyd.

Analizując wyniki dotyczące cytotoksycznego wpływu badanych wyciągów w stosunku do komórek czerniaka, a także biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki badań własnych, należy zwrócić uwagę na selektywność działania ekstraktów, czyli jednoczesną cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych i bezpieczeństwo w stosunku do komórek prawidłowych.

Analiza wyników dotyczących komórek prawidłowych skóry (keratynocytów i fibroblastów) i nowotworowych skóry (A375) wykazała, że ekstrakt z wąkroty azjatyckiej otrzymany z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2) działał w stosunku do nich w sposób selektywny. Ekstrakt z rośliny *in vitro* był cytotoksyczny w stosunku do komórek opornego na terapię czerniaka skóry, a zarazem był bezpieczny w stosunku do prawidłowych komórek skóry.

Z kolei, w przypadku linii nowotworowej czerniaka WM793, już obydwie testowane wyciągi CA1 i CA2 działały selektywnie cytotoksycznie w stosunku do komórek tej linii i komórek prawidłowych keratynocytów, fibroblastów i astrocytów.

Komórki nowotworowe wątroby (HepG2)

Doniesienia literaturowe [Jorge i Jorge, 2005], o potencjalnym działaniu hepatotoksycznym wąkroty azjatyckiej przyczyniły się do włączenia komórek linii HepG2 do badań nad bezpieczeństwem. Wyniki badań własnych wykazały, że testowane wyciągi nie wykazywały działania hepatocytotoksycznego, wręcz przeciwnie, podnosiły żywotność komórek linii HepG2, co świadczy o bezpieczeństwie ich stosowania. Analiza wyników wskazuje, że za aktywność stymulującą namnażanie się komórek linii HepG2 nie były odpowiedzialne saponiny triterpenowe, azjatykozyd i madekasozyd obecne w wyciągach, ponieważ wykazywały one działanie przeciwstawne do testowanych wyciągów. Co więcej, należy zwrócić uwagę na synergizm działania różnych składników obecnych w mieszaninie jaką jest wyciąg z rośliny *Centella asiatica* – wyciągi stymulowały proliferację, a saponiny ją hamowały. Świadczy to o tym, że inny składnik lub ich mieszanina były odpowiedzialne za efekt stymulujący namnażanie komórek linii HepG2.

Naidoo i wsp. donoszą o hamującym proliferację wpływie ekstraktu metanolowego z wąkroty azjatyckiej w stosunku do komórek linii HepG2. Z kolei, obydwa badane w pracy doktorskiej wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej stymulowały namnażanie się komórek linii HepG2. W porównaniu z wynikami uzyskanymi przez Naidoo i wsp. można po raz kolejny stwierdzić, że wyciągi wodne działają bezpieczniej i skuteczniej niż wyciągi alkoholowe. Silniejszym wpływem na proliferację charakteryzował się wyciąg z rośliny szklarniowej, zawierający wyższe stężenia azjatykozydu i madekasozydu. Jednak to nie saponiny obecne w ekstrakcie były odpowiedzialne za działanie stymulujące proliferację, ponieważ zarówno azjatykozyd i madekasozyd hamowały namnażanie komórek linii HepG2. Uzyskane wyniki badań są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Liu i wsp., którzy również wykazali, że madekasozyd hamuje namnażanie się komórek linii HepG2, a także zgodne ze stwierdzeniem, że to wolne kwasy, a nie ich estry obecne w wąkrocie azjatyckiej mogą być odpowiedzialne za aktywność biologiczną wyciągów [Coldren i wsp., 2003]. Możliwe więc, że za wzmożone namnażanie się komórek wątroby odpowiedzialny był kwas azjatykowy, posiadający udowodnione działanie cytoprotekcyjne w stosunku do komórek linii HepG2 [Qi i wsp., 2017].

3. Aktywność antyoksydacyjna wyciągów i saponin

Wolne rodniki są wysoce reaktywnymi cząstkami, które odgrywają ogromną rolę w etiologii tzw. chorób cywilizacyjnych (np. nowotworów). Skuteczna walka z wszechobecnym stresem oksydacyjnym i chorobami będącymi jego następstwem, polega na wsparciu naturalnych systemów obronnych organizmu. Substancje roślinne charakteryzują się dużą zawartością składników o potencjale antyoksydacyjnym.

Wyciągi otrzymane z wąkroty azjatyckiej są bogatym źródłem wielu składników aktywnych. Niektóre z nich mogą być donorami wolnych elektronów przez co inaktywują wolne rodniki tlenowe. Szczególnie duża zawartość związków polifenolowych i flawonoidowych pozwala ekstraktom z wąkroty azjatyckiej na silną aktywność antyoksydacyjną, przez co mają też wpływ na hamowanie procesów starzenia się skóry i całego ludzkiego organizmu [Subhasree i wsp., 2009].

Istnieje szereg metod wykorzystywanych do oceny aktywności antyoksydacyjnej. Ze względu na szybką i niedrogą analizę, najbardziej rozpowszechnione są metody *in vitro*, oparte najczęściej na reakcjach chemicznych zachodzących pomiędzy antyoksydantem, a wolnymi rodnikami (np. DPPH) lub jonami metali (np. FRAP). Najnowocześniejszymi metodami do oceny aktywności antyoksydacyjnej są te, które wykorzystują modele komórkowe (np. ROS-Glo H₂O₂). Wyniki tych analiz stanowią ogromną wartość, ponieważ w odróżnieniu od testów chemicznych, uwzględniają metabolizm i transport komórkowy oraz są prowadzone w warunkach fizjologicznych (pH, temperatura) [Koss-Mikołajczyk i wsp., 2017].

Żadna z metod oznaczania działania antyoksydacyjnego nie może być uznana za uniwersalną. Właściwości antyoksydacyjne wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej omawianych w pracy doktorskiej badano za pomocą trzech metod oceniających różne mechanizmy działania przeciwutleniającego. Należą do nich dwie metody chemiczne: redukcji rodnika (DPPH) i oznaczania siły redukcyjnej jonów żelaza (FRAP) oraz metoda komórkowa (ROS-Glo H₂O₂).

Zdolność badanych substancji do dezaktywacji wolnych rodników - test DPPH

Obydwa testowane wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2) były obdarzone zdolnością do dezaktywacji wolnego rodnika tlenowego, która rosła wraz ze stężeniem i czasem inkubacji (Ryc. 33 A, B, str. 129). Porównywalna aktywność antyoksydacyjna dwóch ekstraktów świadczy o podobnej zawartości związków fenolowych w badanych ekstraktach. Jednak aktywność antyoksydacyjna wyciągów CA1 i CA2 była dużo niższa niż wykorzystanego w eksperymencie związku referencyjnego – kwasu galusowego. Potencjał antyoksydacyjny testowanych wyciągów nie był aż tak silny jak ekstraktów, o których donoszą Pittella i wsp. oraz Kumari i wsp., według których wodny ekstrakt z wąkroty azjatyckiej był silniejszym przeciwutleniaczem niż referencyjny Trolox. Z kolei, w zgodzie z uzyskanymi w pracy doktorskiej wynikami badań pozostają rezultaty otrzymane przez Jain i wsp. oraz Orhan i wsp., u których badane wyciągi alkoholowe z wąkroty azjatyckiej charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością antyoksydacyjną [Jain i wsp., 2008, Orhan i wsp., 2013]. Wykazano również, że zdolność wyciągów metanolowych z wąkroty azjatyckiej do zmiatania wolnych rodników tlenowych jest ściśle powiązana ze zdolnością ekstraktów do zapobiegania peroksydacji lipidów [Jain i wsp., 2008].

W przypadku ekstraktów pozyskanych z roślin, produkt o stałej jakości chemicznej nie jest możliwy do odtworzenia. Każda partia ekstraktów zawiera różne ilości fitoskładników [Azis i wsp. 2017]. Co więcej, skład chemiczny wyciągów roślinnych, a co z tego wynika ich aktywność biologiczna różni się w zależności od miejsca pozyskania surowca [James i wsp., 2011]. Dlatego w przypadku badań aktywności biologicznej surowych, niestandardyzowanych ekstraktów roślinnych możliwe jest uzyskanie odmiennych od siebie wyników badań.

W ramach eksperymentu udało się również oszacować słaby potencjał antyoksydacyjny dla azjatykozydu (Ryc. 33 C, str. 129). Aktywność antyoksydacyjną azjatykozydu oszacowano również w badaniach *in vivo* na szczurach przeprowadzonych przez Shukla i wsp., którzy wykazali, że zewnętrzna aplikacja azjatykozydu na ranę powodowała wzrost enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej, co finalnie skutkowało przyspieszeniem procesu gojenia się rany [Shukla i wsp., 1999b].

Zdolność badanych substancji do redukowania jonów Fe(III) - test FRAP

Wyniki wykazały, że obydwie badane wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2) były obdarzone zdolnością do redukcji jonów żelaza (III) (Tabela 19, str. 130).

Piśmiennictwo dowodzi, że wyciągi etanolowe z wąkroty azjatyckiej posiadają umiarkowaną aktywność przeciwutleniającą oznaczoną w teście FRAP [Orhan i wsp. 2013]. W porównaniu z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy można stwierdzić, że zarówno wodne jak i alkoholowe ekstrakty z wąkroty azjatyckiej są obdarzone umiarkowaną zdolnością do redukcji jonów żelaza (III).

Wielu autorów zaobserwowało, że w przypadku ekstraktów roślinnych wodnych i alkoholowych zachodzi wysoka korelacja pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną wyciągów (wykazana w teście FRAP i DPPH), a zawartością w ekstrakcie składników frakcji fenolowej [Fernandes i wsp., 2016, Jemli i wsp., 2016, Wang i wsp., 2001]. Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej pozwoliły oszacować aktywność antyoksydacyjną testowanych wyciągów. Na podstawie danych literaturowych można wnioskować, że za tą aktywność są odpowiedzialne właśnie składniki frakcji fenolowej.

Aktywność antyoksydacyjna wyciągów z wąkroty azjatyckiej w hodowli ludzkich fibroblastów i hepatocytów - test ROS-Glo H₂O₂

Metoda ROS-Glo H₂O₂ pozwala na ocenę aktywności przeciwutleniającej w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*, ponieważ uwzględnia fizjologiczny zakres pH, temperaturę oraz przemiany metaboliczne zależne od komórki.

W przebiegu eksperymentu zaobserwowano, że wyciągi CA1 i CA2 produkowały więcej wolnych rodników w obecności samego medium hodowlanego niż w obecności medium hodowlanego i komórek linii fibroblastów (BJ-5ta) i hepatocytów (HepG2) (Ryc. 34, str. 132). Taki mechanizm działania jest powszechny dla polifenoli, które ulegają reakcji abiotycznej w medium hodowlanym w celu wytworzenia H₂O₂. Reakcja abiotyczna jest reakcją rośliny na pochodzący z zewnątrz czynnik stresowy. Wyprodukowany nadtlenek wodoru dyfunduje do komórki, gdzie jest eliminowany za pomocą wewnątrzkomórkowej katalazy. Porównanie ze sobą próbek badanych wyciągów z komórkami do próbek badanych wyciągów bez komórek, które są poza tym identyczne, pozwala rozróżnić pomiędzy zależnymi i niezależnymi od komórki

zmianami poziomu wolnych rodników tlenowych [Sang i wsp., 2005, Long i wsp., 2010]. Spadek stężenia H_2O_2 w komórkach, a co za tym idzie spadek luminescencji po dodaniu testowanych wyciągów z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2) świadczy o ich charakterze antyoksydacyjnym.

Udowodniono, że nierównowaga zachodząca w organizmie pomiędzy oksydantami i antyoksydantami skutkuje rozwojem stresu oksydacyjnego, który prowadzi do uszkodzeń struktur komórkowych, głównie materiału genetycznego komórki. Obecnie zwraca się uwagę, że uszkodzenie DNA, zwłaszcza oksydacyjne, przyspiesza proces starzenia [Allsopp i wsp., 1992, Guinot i wsp., 2002].

Wolne rodniki tlenowe powstają w skórze również pod wpływem promieniowania UV, przyczyniając się do fotostarzenia skóry [Zegarska i Woźniak, 2006, Pacholczyk i wsp., 2014]. Testowane wyciągi wywołują w komórkach skóry mechanizmy ochronne, które umożliwiają im na reagowanie na stres oksydacyjny, redukując poziom nadtlenu wodoru w hodowli komórek fibroblastów (Ryc. 34, str. 132). Może być to czynnik odpowiedzialny za wpływ wyciągów na przeciwdziałanie reakcji fotostarzenia. Analiza wyników wykazała, że malejący poziom H_2O_2 był uzależniony od obecności fibroblastów. Wynika z tego, że komórki skóry inkubowane w obecności wyciągów z wąkroty azjatyckiej poprzez redukcję poziomu H_2O_2 są w stanie przeciwdziałać procesom starzenia się skóry. Co więcej, jak wykazano w badaniach wpływu CA1 i CA2 na żywotność fibroblastów, testowane wyciągi w dawkozależny sposób stymulowały żywotność fibroblastów (Ryc. 11 A, str. 97). Zestawienie ze sobą tych wyników wskazuje na to, że aktywność antyoksydacyjna wyciągów może być powiązana z ich wpływem na żywotność komórek skóry.

Kiedy zostaje zachwiana równowaga pomiędzy powstawaniem, a usuwaniem z organizmu wolnych rodników tlenowych, dochodzi do reakcji utleniania, czyli stresu oksydacyjnego, który następnie, między innymi uszkadza DNA w komórce, utlenia błony komórkowe i obniża stężenie ATP w komórce. Wyciągi z wąkroty azjatyckiej w znaczący sposób redukowały poziom nadtlenu wodoru w hodowli komórek HepG2. Może to być czynnik odpowiedzialny za wzrost żywotności komórek tej linii wykazany w badaniach wpływu wyciągów CA1 i CA2 na żywotność hepatocytów (Ryc. 30 A, str. 125).

Silniejszą zdolnością do redukcji reaktywnych form tlenu charakteryzował się wyciąg z rośliny *in vitro*, co może świadczyć o wyższym stężeniu polifenoli w tym wyciągu w porównaniu z wyciągiem z rośliny szklarniowej.

Ciekawym aspektem, na który należy zwrócić uwagę jest działanie antyoksydacyjne flawonoidów u kobiet ciężarnych. Ebeboni i wsp. zwracają uwagę, że ciąża jest okresem w życiu kobiety, w którym ze względu na zmiany metaboliczne zachodzące w organizmie wzrasta poziom stresu oksydacyjnego. Ekstrakty wodne z wąkroty azjatyckiej (w porównaniu np. z alkoholowymi) są najbogatsze we flawonoidy, które przyjmowane w diecie mogą pomóc pokryć zapotrzebowanie na antyoksydanty [Somboonwong i wsp., 2012, Ebeboni i wsp., 2019]. Zestawienie ze sobą wyników uzyskanych w ramach badań własnych i danych literaturowych pozwala ocenić wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej jako potencjalne składniki o działaniu antyoksydacyjnym, które po potwierdzeniu bezpieczeństwa stosowania, mogłyby być wykorzystywane u kobiet w ciąży, tym bardziej, że z powodzeniem są stosowane u ciężarnych, zapobiegając powstawaniu rozstępów [Mallol i wsp., 1991, Garcia-Hernandez i wsp., 2013].

Aktywność antyoksydacyjna wyciągów z wąkroty azjatyckiej może być również wykorzystywana w terapii nowotworów. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na myszach z wyidukowanym chłoniakiem, udowodniono, że metanolowy ekstrakt z wąkroty azjatyckiej powodował wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej, a także samych antyoksydantów glutationu i kwasu askorbinowego, których aktywność w przebiegu choroby zostaje zahamowana [Jayashree i wsp., 2003].

4. Aktywność mutagenna wyciągów – test Ames

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że żaden z testowanych wyciągów z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2) nie był obdarzony aktywnością mutagenną, ponieważ wartość $MI < 2$. Sposób w jaki wyciągi z wąkroty azjatyckiej hamują mutagenność testowanych szczepów bakteryjnych najlepiej opisują Hayatsu i wsp. oraz Florinsiah i wsp. Badacze zwracają uwagę, że brak działania mutagennego ekstraktów z wąkroty azjatyckiej może być spowodowany obecnością w nich chlorofilu i antyoksydantów. Chlorofil może hamować aktywność policyklicznych mutagenów poprzez tworzenie z nimi kompleksów [Hayatsu i wsp., 1993, Florinsiah i wsp., 2013]. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami na temat braku aktywności mutagennej wyciągów z wąkroty azjatyckiej zarówno wodnych [Florinsiah i wsp., 2013]

jak i standaryzowanych na zawartość azjatykozydu [Deshpande i wsp., 2015], udowodnione zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*. Ze względu na brak działania mutagennego testowanych ekstraktów oraz brak doniesień literaturowych na temat aktywności mutagennej *Centelli asiatica* lub jakichkolwiek składników pozyskanych z rośliny, analizie mutagenności nie poddano saponin obecnych w ekstraktach, azjatykozydu i madekasozydu.

5. Aktywność fotoprotekcyjna wyciągów i saponin

Promieniowanie UV to zaledwie 5% promieniowania słonecznego docierającego do Ziemi. Nie zmienia to faktu, że jest to promieniowanie silne i mogące niekorzystnie wpływać na ludzkie zdrowie. Większość, bo aż 95% docierającego do Ziemi promieniowania ultrafioletowego stanowi promieniowanie UVA (320-400 nm), które dzieli się na UVA2 (320-340 nm) i UVA1 (340-400 nm). Promieniowanie UVA przenika przez chmury, szkło i naskórek, docierając nawet do komórek skóry właściwej. UVA sprzyja powstawaniu w skórze wolnych rodników i jest odpowiedzialne m.in. za fotostarzenie się i rozwój nowotworów skóry. Z kolei, promieniowanie UVB jest zatrzymywane przez szkło, a także przez chmury. Jednak ludzki naskórek nie stanowi dla nich bariery i promieniowanie UVB wnika głębiej do skóry powodując oparzenia i nowotwory skóry. Skuteczną ochronę przed niekorzystnymi skutkami promieniowania ultrafioletowego na skórę stanowią filtry przeciwsłoneczne.

Badania naukowe donoszą jednak o toksycznym działaniu niektórych syntetycznych filtrów przeciwsłonecznych. Udowodniono, że mogą one działać mutagenie, jak również wpływać na receptory estrogenowe. Co więcej, duże stężenia różnych filtrów UV oznaczono w wodach rzek, przez co mogą działać toksycznie na całe środowisko naturalne [Park i wsp., 2017]. Badane wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej otrzymane z rośliny szklarniowej (CA1) i z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2) absorbują całkowicie promieniowanie UV w zakresie promieniowania UVB i UVA2, a także częściowo w zakresie promieniowania UVA1 (Ryc. 35, str. 135), co klasyfikuje wyciągi w stężeniu 200 µg/ml jako potencjalne filtry przeciwsłoneczne. Możliwe, że mogłyby one zwiększyć ofertę stosowanych filtrów UV. Wyciągi z wąkroty azjatyckiej obdarzone działaniem promieniochronnym mogą zostać wykorzystane przez producentów

preparatów kosmetycznych jako składniki aktywne kosmetyków (filtry UV) oraz jako składniki pomocnicze (ochrona kosmetyku przed promieniowaniem UV).

Należy zwrócić uwagę, że testowane wyciągi charakteryzowały się szerszym zakresem absorpcji niż oktokrylen (CRY), który jest jednym z najczęściej wykorzystywanych w kosmetykach filtrem przeciwsłonecznym. Intensywność absorpcji promieniowania UV jaką charakteryzował się wyciąg z rośliny szklarniowej, znacznie przewyższała intensywność absorpcji wyciągu z rośliny *in vitro* i oktokrylenu. Pomimo różnic w testowanych stężeniach (CA1, CA2: 200 µg/ml, CRY: 10 µg/ml), jest to niezwykle zadowalający wynik na korzyść wyciągów z wąkroty azjatyckiej.

Do tej pory podobne badania nad ochronnym wpływem wodno-alkoholowego wyciągu z wąkroty azjatyckiej przeprowadzili Hashim i wsp. Badacze wykazali, że wyciąg z wąkroty azjatyckiej pochłania promieniowanie ultrafioletowe w zakresie fal UVA i UVB, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi na podstawie eksperymentu przeprowadzonego w ramach pracy doktorskiej [Hashim i wsp., 2011].

Aktywność fotoprotekcyjna wyciągów z wąkroty azjatyckiej może być spowodowana ich działaniem antyoksydacyjnym i zawartością składników triterpenowych [Agati i wsp., 2013]. Zestawiając ze sobą wyniki aktywności antyoksydacyjnej i działania fotoprotekcyjnego, uzyskanych na podstawie badań własnych, również można zaobserwować taką zależność. W wyniku eksperymentów antyoksydacyjnych, wykazano, że badane wyciągi CA1 i CA2 były obdarzone porównywalną aktywnością antyoksydacyjną oraz porównywalnym działaniem fotoochronnym.

6. Aktywność wyciągów i saponin rozjaśniająca przebarwienia

W ramach badań własnych oceniono także wpływ badanych wyciągów z wąkroty azjatyckiej (CA1 i CA2), azjatykozydu i madekasozydu na aktywność tyrozynazy, która jest kluczowym enzymem w szlaku syntetycznym melaniny. Okazało się niestety, że ani testowane wyciągi, ani ich główne składniki aktywne nie hamowały aktywności tyrozynazy, tak więc nie blokowały powstawania melaniny.

Podobne wyniki można znaleźć w danych literaturowych, gdzie udowodniono, że etanolowy ekstrakt z wąkroty azjatyckiej również nie hamował aktywności tyrozynazy [Orhan i wsp., 2013]. Z kolei, Kwon i wsp. udowodnili, że wyciągi wodne

z wąkroty azjatyckiej zamknięte w nanokapsułkach hamowały aktywność tyrozynazy silniej niż kwas askorbinowy. Badacze po raz kolejny udowodnili, że wodny ekstrakt z wąkroty azjatyckiej zamknięty w nanocząstkach działał skuteczniej w porównaniu z surowym ekstraktem [Kwon i wsp., 2012].

VI. Podsumowanie i wnioski końcowe

Kluczową pozycję w badaniach alternatywnych zajmują testy *in vitro*, w tym testy z wykorzystaniem hodowli komórkowych. Należy zwrócić uwagę, że wyniki testów *in vitro* nie pozwalają na pewną ocenę działania badanych substancji w odniesieniu do całego organizmu, a jedynie odnoszą się do procesów zachodzących w pojedynczych komórkach. Jednak w przypadku bardzo często słabo przebadanych składników kosmetycznych, rzetelne wyniki takich analiz stanowią ogromną wartość, są wskazówką do dalszych badań, a przy obecnym rozwoju metod *in vitro*, pozwalają nawet na oszacowanie potencjalnej aktywności biologicznej w stosunku do całego organizmu.

Zgodnie z założonymi celami badawczymi, jak również wychodząc naprzeciw europejskim standardom opracowywania nowoczesnych kosmetyków, przeprowadzone badania zostały zrealizowane poprzez zastosowanie wybranych nowoczesnych metod alternatywnych *in vitro*, zgodnych z najnowszymi wymogami narzuconymi przez prawo unijne, które umożliwiają szybką wstępną ocenę działania związków przy równoczesnym zachowaniu rzetelności uzyskanych wyników.

W ramach pracy przetestowano dwa wodne wyciągi z wąkroty azjatyckiej oraz ich główne składniki aktywne azjatykozyd i madekasozyd, w stężeniach odpowiadających ich zawartości w wyciągach.

1. W badaniach własnych po raz pierwszy porównano aktywność biologiczną wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej otrzymanych z roślin pochodzących z hodowli szklarniowej i z hodowli *in vitro* oraz wykazano, że nie zawsze ich aktywność biologiczna jest uzależniona od dwóch głównych składników aktywnych azjatykozydu i madekasozydu.
2. Badania wykazały, że testowane wyciągi są bezpieczne w stosunku do keratynocytów, fibroblastów i hepatocytów, a także nie są obdarzone potencjałem mutagennym oraz w różnym stopniu działają cytotoksycznie i hamują proliferację komórek nowotworowych czerniaka.
3. Dowiedziono selektywności działania ekstraktów CA1 i CA2, czyli aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek nowotworowych i bezpieczeństwa w stosunku do komórek prawidłowych.
4. Uzyskane wyniki pozwoliły potwierdzić aktywność glioprotekcyjną i fotoprotekcyjną testowanych wyciągów CA1 i CA2.
5. Stwierdzono, że obydwie testowane wyciągi posiadają potencjalną aktywność przeciwstarzeniową.

6. Po raz pierwszy zwrócono uwagę na bardzo silną aktywność przeciwstarzeniową i glioprotekcyjną madekasozydu.
7. Wyciągi CA1 i CA2 wykazują pozytywny wpływ na szybkość migracji keratynocytów, dzięki czemu mogą przyspieszać naskórkowanie rany.

Podsumowując powyższe dane można stwierdzić, że wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej CA1 i CA2 są obdarzone ciekawą aktywnością biologiczną w kontekście zastosowań kosmetycznych. Nierzadko badane saponiny charakteryzowały się silniejszą aktywnością biologiczną w stosunku do wodnych wyciągów z wąkroty azjatyckiej.

VII.Literatura

1. Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiol Biochem.* 2013; 72: 35-45.
2. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 10114-10118.
3. Al-Saeedi FJ. Study of the cytotoxicity of asiaticoside on rats and tumour cells. *BMC Cancer.* 2014; 14: 220-233.
4. Anukunwithaya T, Tantisira MH, Tantisira B, Khemawoot P. Pharmacokinetics of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 in Rats. *Planta Med.* 2017; 83(8):710-717.
5. Arumugam T, Ayyanar M, Pillai YJK, Sekar T. Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica*. *Bangladesh J Pharmacol.* 2011; 6: 55-60.
6. Assessment report on *Centella asiatica* (L.) Urban, herba. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). 2010.
7. Azis HA, Taher M, Ahmed AS, Sulaiman WMAW, Susanti D, Chowdhury SR, Zakaria ZA. In vitro and In vivo wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. *South African Journal of Botany.* 2017; 108: 163-174.
8. Babu TD, Kuttan G, Padikkala J. Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. *J Ethnopharmacol.* 1995; 48(1): 53-57.
9. Babykutty S, Padikkala J, Sathiadevan PP, Vijayakurup V, Azis TK, Srinivas P, Gopala S. Apoptosis induction of *Centella asiatica* on human breast cancer cells. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2008; 6(1): 9-16.
10. Barbosa NR, Pittella F, Gattaz WF. *Centella asiatica* water extract inhibits iPLA2 and cPLA2 activities in rat cerebellum. *Phytomedicine.* 2008; 15(10): 896-900.
11. Bian GX, Li GG, Yang Y, Liu RT, Ren JP, Wen LQ, Guo SM, Lu QJ. Madecassoside reduces ischemia-reperfusion injury on regional ischemia induced heart infarction in rat. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(3): 458-463.
12. Bilbao I, Aguirre A, Zabala R, Gonzalez R, Raton J, Diaz-Perez JL. Allergic contact dermatitis from butoxyethyl nicotinic acid and *Centella asiatica* extract. *Contact Dermatitis.* 1995; 33: 435.
13. Bonfill M, Mangas S, Cusidó RM, Osuna L, Piñol MT, Palazón J. Identification of triterpenoid compounds of *Centella asiatica* by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20(2): 151-153.
14. Bonte F, Dumas M, Chaudagne C, Meybeck A. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Med.* 1994; 60(2): 133-135.
15. Brinkhaus B, Linder M, Schuppan D, Hahn G. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine.* 2000; 7(5): 427-448.
16. Bylka W, Znajdek-Awiżeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postep Derm Alergol.* 2013; 1: 46-49.
17. Bylka W, Znajdek-Awiżeń P, Studzińska-Sroka E, Dańczak-Pazdrowska A, Brzezińska M. *Centella asiatica* in Dermatology: An Overview. *Phytoterapy Research.* 2014; 28: 1117-1124.
18. Cesarone MR, Belcaro G, De Sanctis MT, Incandela L, Cacchio M, Bavera P, Ippolito E, Bucci M, Griffin M, Geroulakos G, Dugall M, Buccella S, Kleyweght S, Cacchio M.

- Effects of the total triterpenic fraction of *Centella asiatica* in venous hypertensive microangiopathy: a prospective, placebo-controlled, randomized trial. *Angiology*. 2001a; 52(2): 15-18.
19. Cesarone MR, Incandela L, De Sanctis MT, Belcaro G, Bavera P, Bucci M, Ippolito E. Evaluation of treatment of diabetic microangiopathy with total triterpenic fraction of *Centella asiatica*: a clinical prospective randomized trial with a microcirculatory model. *Angiology*. 2001b; 52: 549-554.
 20. Cheng CL, Guo JS, Luk J, Koo MW. The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. *Life Sci*. 2004; 74(18): 2237-2249.
 21. Chippada S, Vangalapati M. Cytotoxic and genotoxic effects of *Centella asiatica* extract in the cultured human peripheral blood lymphocytes. *Research in Pharmacy*. 2012; 2(4): 31-40.
 22. Chippada SC, Volluri SS, Bammidi SR, Vangalapati M. In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilization. *Rasyan J Chem*. 2011; 4(2): 457-460.
 23. Choochuay K, Sawatdee S, Chanthorn W. The efficacy of topical spray containing *Centella asiatica* extract on excision wound healing in rats. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*. 2016; 2: 132-133.
 24. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2001; 117(5): 1218-1224.
 25. Ciężyńska M, Bednarski I, Lesiak A. Rola TGF- β w skórnej fotodestrukcji i kancerogenezie. *Forum Dermatologicum*. 2016; 2: 60-63.
 26. Coldren CD, Hashim P, Ali JM, Oh SK, Sinskey AJ, Rha C. Gene Expression Changes in the Human Fibroblast Induced by *Centella asiatica* Triterpenoids. *Planta Med*. 2003; 69: 725-732.
 27. Danese P, Carnevali C, Beratazzoni G. Allergic contact dermatitis due to *Centella asiatica* extract. *Contact Dermatitis*. 1994; 31: 201.
 28. Deshpande PO, Mohan V, Thakurdesai P. Preclinical Safety Assessment of Standardized Extract of *Centella asiatica* (L.) Urban Leaves. *Toxicol Int*. 2015; 22(1): 10-20.
 29. Dhankalakshmi P, Shamsudin M, Xavier TF. Biological efficacy of *Centella asiatica* (L.) urban against opportunistic pathogens. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2018; 8(1): 209-213.
 30. Dziennik Urzędowy Komisji Europejskiej 2006/257/WE. 2006.
 31. Ebeboni VJ, Dickenson JM, Sivasubramaniam SD. Antioxidative effects of flavonoids and their metabolites against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in a human first trimester trophoblast cell line. *Food Chem*. 2019; 272: 117-125.
 32. El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Adv Pharmacol Sci*. 2016:1-6.
 33. Eun HC, Lee AY. Contact dermatitis due to Madecassol. *Contact Dermatitis*. 1985; 13: 310-313.
 34. Farmakopea Polska X T1. 2014: 1405-1406.
 35. Fernandes RP, Trindade MA, Tonin FG, Lima CG, Pugine SM, Munekata PE, Lorenzo JM, de Melo MP. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts

- by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *J Food Sci Technol*. 2016; 53(1): 451-460.
36. Florinsiah L, Farida Zuriana MY, Rajab NF, Nurshahirah, Norfazalina N, Suiziana Zaila CF. Mutagenicity Effect of *Centella asiatica* in Aqueous Extract by Using Ames Test. *The Open Conference Proceedings Journal*. 2013; 4: 83-87.
 37. García Hernández JÁ, Madera González D, Padilla Castillo M, Figueras Falcón T. Use of a specific anti-stretch mark cream for preventing or reducing the severity of striae gravidarum. Randomized, double-blind, controlled trial. *Int J Cosmet Sci*. 2013; 35(3): 233-237.
 38. Gnanapragasam A, Ebenezar KK, Sathish V, Govindaraju P, Devaki T. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci*. 2004; 76(5): 585-597.
 39. Gohil JK, Patel JA, Gajjar AK. Phramacological Review on *Centella asiatica*: A potential Herbal Cure-all. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 72(5): 546-556.
 40. Gomes J. Contact dermatitis due to *Centella asiatica*. *Contact Dermatitis*. 2010; 62: 54-55.
 41. Govindan G, Sambandan TG, Govindan M, Sinskey A, Vanessendelft J, Adenan I, Rha CK. A bioactive polyacetylene compound isolated from *Centella asiatica*. *Planta Med*. 2007; 73: 597-599.
 42. Gray NE, Harris CJ, Quinn JF, Soumyanath A. *Centella asiatica* modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice. *J Ethnopharmacol*. 2016; 180: 78-86.
 43. Gray NE, Morr e J, Kelley J, Maier CS, Stevens JF, Quinn JF, Soumyanath A. Caffeoylquinic acids in *Centella asiatica* protect against amyloid- β toxicity. *J Alzheimers Dis*. 2014; 40(2): 359-73.
 44. Gray NE, Sampath H, Zweig JA, Quinn JF, Soumyanath A. *Centella asiatica* Attenuates Amyloid- β -Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *J Alzheimers Dis*. 2015; 45(3): 933-46.
 45. Guinot C, Malvy DJ, Ambroisine L, Latreille J, Mauger E, Tenenhaus M, Morizot F, Lopez S, Le Fur I, Tschachler E. Relative contribution of intrinsic vs extrinsic factors to skin aging as determined by a validated skin age score. *Arch Dermatol*. 2002; 138(11): 1454-1460.
 46. Guo DJ, Li F, Yu PH, Chan SW. Neuroprotective effects of luteolin against apoptosis induced by 6-hydroxydopamine on rat pheochromocytoma PC12 cells. *Pharm Biol*. 2013; 51(2): 190-196.
 47. Guo JS, Cheng CL, Koo MWL. Inhibitory Effects of *Centella asiatica* Water Extract and Asiaticoside on Inducible Nitric Oxide Synthase During Gastric Ulcer Healing in Rats. *Planta Med*. 2004; 70: 1150-1154.
 48. Haftek M, Mac-Mary S, Le Bitoux MA, Creidi P, Seit e 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*. 2008; 17(11): 946-952.
 49. Haleagrahara N, Ponnusamy K. Neuroprotective effect of *Centella asiatica* extract (CAE) on experimentally induced parkinsonism in aged Sprague-Dawley rats. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2010; 35(1): 41-47.

50. Haleagrahara N, Siew CJ, Mitra NK, Kumari M. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. *Neurosci Lett*. 2011; 500(2): 139-143.
51. Hanisa H, Mohdazmi ML, Suhaila M, Hakim MN. Effects of *Centella asiatica* L., *Curcuma Longa* L., and *Strobilanthes crispus* L., extracts on 3 kidney cell lines: in vitro cytotoxicity analysis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 6(2): 388-392.
52. Hashim P, Sidek H, Helan MH, Sabery A, Palanisamy UD, Ilham M. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules*. 2011; 16(2): 1310-1322
53. Hausen BM. *Centella asiatica* (Indian pennyworth), an effective therapeutic but a weak sensitizer. *Contact Dermatitis*. 1993; 29: 175-179.
54. Hayatsu H, Negishi T, Arimoto S, Hayatsu T. Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutat Res*. 1993; 290(1): 79-85.
55. Heidari M, Heidari-Vala H, Sadeghi MR, Akhondi MM. The inductive effects of *Centella asiatica* on rat spermatogenic cell apoptosis in vivo. *J Nat Med*. 2012; 66(2): 271-278.
56. Hou Q, Li M, Lu YH, Liu DH, Li CC. Burn wound healing properties of asiaticoside and madecassoside. *Exp Ther Med*. 2016; 12(3): 1269-1274.
57. Izu R, Aguirre A, Gil N, Diaz-Perez JL. Allergic contact dermatitis from a cream containing *Centella asiatica* extract. *Contact Dermatitis*. 1992; 26: 192-213.
58. Jain PK, Ravichandran V, Sharma S, Agrawal RK. The antioxidant Activity of Some Medicinal Plants. *Turk J Biol*. 2008; 32: 197-202.
59. James J, Dubery I. Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography*. 2011; 1: 82-87.
60. James JT, Dubery IA. Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*. 2009; 14: 3922-3941.
61. Jayashree G, Kurup Muraleedhara G, Sudarslal S, Jacob VB. Anti-oxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. *Fitoterapia*. 2003; 74(5): 431-434.
62. Jorge OA, Jorge AD. Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005; 97: 115-124.
63. Karłowicz-Bodalska K, Han S, Han T, Miranowicz M, Bodalska A. *Centella asiatica* (L.) Urban, syn. *Hydrocotyle asiatica* L. – wążkrota azjatycka – znana roślina lecznicza Dalekiego Wschodu. *Postępy Fitoterapii*. 2013; 4: 225-235.
64. Koss-Mikołajczyk I, Baranowska M, Namieśnik J, Bartoszek A. Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fito związków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji. *Postępy Hig Med Dosw*. 2017; 71: 1-16.
65. Król D. Wążkrota azjatycka (*Centella asiatica* L.) – właściwości lecznicze. *Postępy Fitoterapii*. 2010; 2: 101-105
66. Kumari S, Deori M, Elancheran R, Kotoky J, Devi R. In vitro and In vivo Antioxidant, Anti-hyperlipidemic Properties and Chemical Characterization of *Centella asiatica* (L.) Extract. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 400-412.
67. Kwon MC, Choi WY, Seo YC, Kim JS, Yoon CS, Kim HS, Ahn J, Lee HY. Enhancement of the Skin-Protective Activities of *Centella asiatica* L. Urban by a Nano encapsulation Process. *Journal of Biotechnology*. 2012. 157: 100-106.

68. Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR, Kim M. Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology*. 2006; 131(4): 1208-1217.
69. Lee JH, Kim HL, Lee MH, You KE, Kwon BJ, Seo HJ, Park JC. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine*. 2012; 19(13): 1223-1227.
70. Lee YS, Jin DQ, Kwon EJ, Park SH, Lee ES, Jeong TC, Nam DH, Huh K, Kim JA. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular CA^{2+} release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. *Cancer Letters*. 2002; 186: 83-91.
71. Li Z, You K, Li J, Wang Y, Xu H, Gao B, Wang J. Madecassoside suppresses proliferation and invasiveness of HGF-induced human hepatocellular carcinoma cells via PKC-cMET-ERK1/2-COX-2-PGE2 pathway. *Int Immunopharmacol*. 2016; 33: 24-32.
72. Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*. 2007; 2(2): 329-333.
73. Liu M, Dai Y, Li Y, Luo Y, Huang F, Gong Z, Meng Q. Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice. *Planta Med*. 2008; 74(8): 809-15.
74. Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2016; 144: 103-120.
75. Long LH, Hoi A, Halliwell B. Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Arch Biochem Biophys*. 2010; 501(1): 162-169.
76. Lu L, Ying K, Wei S, Fang Y, Liu Y, Lin H, Ma L, Mao Y. Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Int J Dermatol*. 2004; 43(11): 801-807.
77. Luo Y, Wang C, Li WH, Liu J, He HH, Long JH, Yang J, Sui X, Wang S, You Z, Wang YA. Madecassoside protects BV2 microglial cells from oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury via inhibition of the toll-like receptor 4 signaling pathway. *Brain Res*. 2018; 1679: 144-154.
78. Mallol J, Belda MA, Costa D, Noval A, Sola M. Prophylaxis of Striae gravidarum with a topical formulation. A double blind trial. *Int J Cosmet Sci*. 1991;13(1): 51-57.
79. Maquart FX, Bellon G, Gillery P, Wegrowski Y, Borel JP. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connect Tissue Res*. 1990; 24(2): 107-120.
80. Meeran M, Goyal SN, Suchal K, Sharma C, Patil CR, Ojha SK. Pharmacological Properties, Molecular Mechanisms, and Pharmaceutical Development of Asiatic Acid: A Pentacyclic Triterpenoid of Therapeutic Promise. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9: 1-35.
81. Milani M, Sparavigna A. The 24-hour skin hydration and barrier function effects of a hyaluronic 1%, glycerin 5%, and *Centella asiatica* stem cells extract moisturizing fluid: an intra-subject, randomized, assessor-blinded study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017; 10: 311-315.
82. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000; 455: 29-60.

83. Mutua PM, Gicheru MM, Makanya AN, Kiama SG. Anti-Proliferative Activities of *Centella Asiatica* Extracts on Human Respiratory Epithelial Cells *in vitro*. *Int J Morphol*. 2013; 31(4): 1322-1327.
84. Naidoo DB, Phulukdaree A, Anand K, Sewram V, Chaturgoon AA. *Centella asiatica* Fraction-3 Suppresses the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Anti-Oxidant Pathway and Enhances Reactive Oxygen Species-Mediated Cell Death in Cancerous Lung A549 Cells. *J Med Food*. 2017; 20(10): 959-968.
85. Nenadis N, Tsimidou M. Observation on the Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using Rapid 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Tests. *JACOS*. 2002; 79 (12): 1191-1195.
86. Norzaharaini MG, Wan Norshazwani WS, Hasmah A, Nor Izani NJ, Rapeah S. A preliminary Study on the Antimicrobial Activities of Asiaticoside and Asiatic Acid against Selected Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Health and the Environment Journal*. 2011; 2(1): 23-26.
87. Offord EA, Gautier JC, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Krämer K, Applegate LA. Photoprotective potential of lycopene, carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free. Rad. Bio. Med*. 2000; 32: 1293-1303.
88. Orhan EI, Atasu E, Senol AF, Ozturk N, Demirci B, Das K, Sekeroglu N. Comparative studies on Turkish and Indian *Centella asiatica* (L.) Urban (gotu kola) samples for their enzyme inhibitory and antioxidant effects and phytochemical characterization. *Industrial Crops and Products*. 2013; 47: 316-322.
89. Orhan IE. *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:1-8.
90. Pacholczyk M, Ferenc T, Czernicki J. Wpływ słonecznego promieniowania ultrafioletowego (UV) na organizm człowieka. Część I: Charakterystyka wybranych właściwości fizykochemicznych i biologicznych promieniowania UV. *Acta Balneologica*. 2014; 1(135): 20-26.
91. Paolino D, Cosco D, Cilurzo F, Trapasso E, Morittu VM, Celia C, Fresta M. Improved *in vitro* and *in vivo* collagen biosynthesis by asiaticoside-loaded ultradeformable vesicles. *Journal of Controlled Release*. 2012; 162: 143-151.
92. Park BC, Bosire KO, Lee ES, Lee YS, Kim JA. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Lett*. 2005; 218(1): 81-90.
93. Park CB, Jang J, Kim S, Kim YJ. Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017; 137: 57-63.
94. Pittella F, Dutra RC, Junior DD, Lopes MT, Barbosa NR. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *Int J Mol Sci*. 2009; 10(9): 3713-3721.
95. Pointel JP, Boccalon H, Cloarec M, Ledevhat C, Joubert M. Titrated Extract of *Centella Asiatica* (TECA) in the Treatment of Venous Insufficiency of the Lower Limbs. *Angiology-The Journal of Vascular Diseases*. 1987; 46-50.
96. Pragada RR, Veeravalli KK, Chowdary KP, Routhu KV. Cardioprotective activity of *Hydrocotyle asiatica* L. in ischemia-reperfusion induced myocardial infarction in rats. *J Ethnopharmacol*. 2004; 93(1): 105-108.
97. Primastuti RF, Wih WL, Mun'im A. Effect of a Combination of Extract of *Centella asiatica* L. Leaves and Extract of Green Coffee (*Coffea canephora robusta* P.)

- Beans in a Cream Preparation for Grade 1-3 Cellulite and Slimming. Makara Journal of Science. 2013; 17: 1-5.
98. Qi F, Yang L, Tian Z, Zhao M, Liu S, An J. Neuroprotective effects of Asiaticoside. *Neurak Regen Res.* 2014; 9(13): 1275-1282.
 99. Qi Z, Ci X, Huang J, Liu Q, Yu Q, Zhou J, Deng X. Asiatic acid enhances Nrf2 signaling to protect HepG2 cells from oxidative damage through Akt and ERK activation. *Biomed Pharmacother.* 2017; 88: 252-259.
 100. Ratz-Łyko A, Arct J. Kosmetyczne i dermatologiczne właściwości *Centella asiatica*. *Pol J Cosmetol.* 2015; 18(1): 25-30.
 101. Rawlings AV. Cellulite and its treatment. *International Journal of Cosmetic Science.* 2006; 28: 175-190.
 102. Ren L, Cao QX, Zhai FR, Yang SQ, Zhang HX. Asiatic acid exerts anticancer potential in human ovarian cancer cells via suppression of PI3K/Akt/mTOR signalling. *Pharm Biol.* 2016; 54(11): 2377-2382.
 103. Rodrigues da Rocha PB, Santos Souza B, Andrade LM, Maretoo RN, Lima EM, Taveira SF. Development of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for Asiaticoside Quantification in Different Skin Layers after Topical Application of a *Centella asiatica* Extract. *Planta Med.* 2017; 83(18):1431-1437.
 104. Rogowski-Tylman M, Narbutt J, Woźniacka A, Lesiak A. Udział metaloproteinazy - 8 oraz ścieżki TGF- β /Smad w fotostarzeniu skóry. *Forum Dermatologicum.* 2016; 2: 114-119.
 105. Rossi ABR, Vergnanini AL. Cellulite: a review. *European Academy of Dermatology and Venerology.* 2000; 14: 251-262.
 106. Ruka W, Krzakowski M, Placek W, Rutkowski P, Nowecki ZI, Fijuth J, Nasierowska-Guttmejer A, Jeziorski A, Rudnicka L, Murawa P, Słusznik J, Potemski P, Zaucha R, Wysocki PJ, Polkowski W, Kamińska-Winciorek G, Bajcar S, Biernat W, Towpik E. Czerniaki skóry – zasady postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. *Onkol. Prak. Klin.* 2009; 1: 20-32.
 107. Ruszymah BH, Chowdhury SR, Manan NA, Fong OS, Adenan MI, Saim AB. Aqueous extract of *Centella asiatica* promotes corneal epithelium wound healing *in vitro*. *J Ethnopharmacol.* 2012; 140(2): 333-338.
 108. Rutkowski P, Wysocki PJ. i wsp. Cutaneous melanomas. *Oncol Clin Pract.* 2017; 13: 241-258.
 109. Safety Assessment of *Centella asiatica*-derived Ingredients as Used in Cosmetics. 2015.
 110. Sampson JH, Raman A, Karlsen G, Navsaria H, Leigh IM. In vitro keratinocyte antiproliferant effect of *Centella asiatica* extract and triterpenoid saponins. *Phytomedicine.* 2001; 8(3): 230-235.
 111. Sang S, Hou Z, Lambert JD, Yang CS. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(11-12): 1704-1714.
 112. Sawatdee S, Choochuay K, Chanthorn W, Srichana T. Evaluation of the topical spray containing *Centella asiatica* extract and its efficacy on excision wounds in rats. *Acta Pharm.* 2016 ; 66(2): 233-244.
 113. Shukla A, Rasik AM, Dhawan BN. Asiaticoside-induced Elevation of Antioxidant Levels in Healing Wounds. *Phytoter Res.* 1999b; 13: 50-54.
 114. Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *J Ethnopharmacol.* 1999a; 65(1): 1-11.

115. Siddique YH, Ara G, Beg T, Faisal M, Ahmad M, Afzal M. Antigenotoxic role of *Centella asiatica* L. extract against cyproterone acetate induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(1): 10-7.
116. Siddiqui BS, Aslam H, Ali ST, Khan S, Begum EtS. Chemical constituents of *Centella asiatica*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2007; 9(4): 407-414.
117. Singh S, Gautam A, Sharma A, Batra A. *Centella asiatica* (L.): a plant with immense medicinal potential but threatened. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010; 4: 9-17.
118. Somboonwong J, Kankaisre M, Tantisira B, Tantisira MH. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *BMC Complement Altern Med*. 2012; 12: 103-109.
119. Somchit MN, Sulaiman MR, Zuraini A, Samsuddin L, Somchit N, Israf DA, Moin S. Anticonceptive and anti-inflammatory effects of *Centella asiatica*. *Indian Journal of Pharmacology*. 2004; 36(6): 377-380.
120. Song D, Jiang X, Liu Y, Sun Y, Cao S, Zhang Z. Asiaticoside Attenuates Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induced by A β 1-42 via Inhibiting the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 1-13.
121. Soumyanath A, Zhong YP, Gold SA, Yu X, Koop DR, Bourdette D, Gold BG. *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation in-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 2005; 57(9): 1221-1229.
122. Soumyanath A, Zhong YP, Henson E, Wadsworth T, Bishop J, Gold BG, Quinn JF. *Centella asiatica* Extract Improves Behavioral Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Investigation of a Possible Mechanism of Action. *Int J Alzheimers Dis*. 2012: 1-9.
123. Stępień-Wyrobiec O, Hrycek A, Wyrobiec G. Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) – budowa, mechanizmy oddziaływania oraz jego rola w patogenezie toczenia rumieniowatego układuwego. *Postępy Hig Med Dosw*. 2008; 62: 688-693.
124. Su Z, Ye J, Qin Z, Ding X. Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Scientific Reports*. 2015; 5: 1-14.
125. Subban R, Veerakumar A, Manimaran R, Hashim KM, Balachandran I. Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.). *J Nat Med*. 2008; 62 :369–373.
126. Subhasree B, Baskar R, Laxmi Keerthana R, Lijina Susan R, Rajasekaran P. Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. *Food Chemistry*. 2009; 115: 1213-1220.
127. Surini S, Djajadisastra J. Formulation and in vitro Penetration Study of Transfersomes Gel Containing Gotu Kola Leaves Extract (*Centella asiatica* L. Urban). *J Young Pharm*. 2018; 10(1): 27-31.
128. Talabani AN. An in vivo Evaluation of the Effectiveness of Gotu Kola (*Centella asiatica*) on Inhibiting the Growth of Selected Microorganisms in Human Saliva. *J Bagh College Dentistry*. 2016; 28(1): 174-178.
129. Tang B, Zhu B, Liang Y, Bi L, Hu Z, Chen B, Zhang K, Zhu J. Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF- β /Smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF- β RI and TGF- β RII in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res*. 2011; 303(8): 563-572.
130. Tiwari S, Gehlot S, Gambhir IS. *Centella asiatica*: a concise drug review with probable clinical uses. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2011; 7: 38-44.

131. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol.* 2006; 168(6): 1861-1868.
132. Vasavi HS, Arun AB, Rekha PD. Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016; 49(1): 8-15.
133. Visweswari G, Prasad KS, Chetan PS, Lokanatha V, Rajendra W. Evaluation of the anticonvulsant effect of *Centella asiatica* (gotu kola) in pentylenetetrazol-induced seizures with respect to cholinergic neurotransmission. *Epilepsy Behav.* 2010; 17(3): 332-335.
134. Wang SY, Zheng W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(10): 4977-4982.
135. Wu F, Bian D, Xia Y, Gong Z, Tan Q, Chen J, Dai Y. Identification of Major Active Ingredients Responsible for Burn Wound Healing of *Centella asiatica* Herbs. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 1-13.
136. Xing Y, Ji Q, Li X, Ming J, Zhang N, Zha D, Lin Y. Asiaticoside protects cochlear hair cells from high glucose-induced oxidative stress via suppressing AGEs/RAGE/NF- κ B pathway. *Biomed Pharmacother.* 2017; 86: 531-536.
137. Yen GC, Chen HY, Peng HH. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39(11): 1045-53.
138. Yoshida M, Fuchigami M, Nagao T, Okabe H, Matsunaga K, Takata J, Karube Y, Tsuchihashi R, Kinjo J, Mihashi K, Fujioka T. Antiproliferative Constituents from Umbelliferae Plants VII. Active Triterpenes and Rosmarinic Acid from *Centella asiatica*. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(1): 173-175.
139. Zaidan MR, Noor Rain A, Badrul AR, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop Biomed.* 2005; 22(2): 165-170.
140. Zainol MK, 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 Chemistry.* 2003; 8: 575-581.
141. Zakęs N, Studzińska-Sroka E, Bylka W. Inhibitory tyrozynazy z grzybów i porostów jako regulatory melanogenezy. *Postępy Fitoterapii.* 2015; 4: 244-249.
142. Zegarska B, Woźniak M. Przyczyny wewnątrzpochodnego starzenia się skóry. *Gerontologia Polska.* 2006; 14(4): 153-159.
143. Żelaszczyk D, Waszkielewicz A, Marona H. Kolagen – struktura oraz zastosowanie w kosmetologii i medycynie estetycznej. *Estetol Med. Kosmetol.* 2012; 2(1): 14-20.

VIII. Spis tabel i rycin

Spis tabel

Tabela 1 Systematyka gatunku <i>Centella asiatica</i>	21
Tabela 2 Skład chemiczny <i>Centella asiatica</i>	26
Tabela 3 Udokumentowane aktywności kosmetyczne i terapeutyczne wyciągów z wąkroty azjatyckiej (CA) i jej głównych składników aktywnych.....	53
Tabela 4 Linie komórek eukariotycznych i warunki ich hodowli.....	67
Tabela 5 Przygotowanie roztworów roboczych CA1 i CA2.....	68
Tabela 6 Przygotowanie roztworów roboczych CA1 i CA2.....	69
Tabela 7 Przygotowanie roztworów roboczych azjatykozydu.....	70
Tabela 8 Przygotowanie roztworów roboczych azjatykozydu.....	71
Tabela 9 Przygotowanie roztworów roboczych madekasozydu.	72
Tabela 10 Przygotowanie roztworów roboczych madekasozydu.....	72
Tabela 11 Przygotowanie roztworów roboczych kwasu galusowego.....	73
Tabela 12 Przygotowanie roztworów roboczych kwasu askorbinowego i Troloksu.....	74
Tabela 13 Skład roztworu soli Vogel-Bonner.....	76
Tabela 14 Skład 0,1 M buforu fosforanowego.....	77
Tabela 15 Skład agaru powierzchniowego.....	79
Tabela 16 Skład podłoża minimalnego.....	79
Tabela 17 Zawartość azjatykozydu i madekasozydu obecna w poszczególnych stężeniach wyciągu CA1.	95
Tabela 18 Zawartość azjatykozydu i madekasozydu obecna w poszczególnych stężeniach wyciągu CA2.	95
Tabela 19 Zdolność CA1 i CA2 do redukcji jonów żelaza (III) w teście FRAP.....	130
Tabela 20 Aktywność antymutagenna wyciągów CA1 i CA2 oceniona w teście Ames.	134

Spis rycin

Rycina 1 Morfologia rośliny <i>Centella asiatica</i> . [http://nl.wikipedia.org. Dostęp dnia: 26.10.2018]	22
Rycina 2 Obszary naturalnego bytowania <i>Centella asiatica</i> . [źródło: http://freeimages.com. Dostęp dnia: 25.10.2018]	22

Rycina 3 Związki o mniejszym znaczeniu oznaczone w liściach i kłączu <i>Centella asiatica</i>]	23
Rycina 4 Przebieg procesu spalania tłuszczu.	40
Rycina 5 Ścieżka TGFβ/Smad w komórce, odpowiedzialna za regulację ekspresji genów dla kolagenu typu I.	44
Rycina 6 Wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej, azjatykozydu i madekasozydu na etapy gojenia się ran.	51
Rycina 7 Zasada działania testu MTT.	80
Rycina 8 Zasada działania testu DPPH.	87
Rycina 9 Zasada działania testu FRAP.	88
Rycina 10 Zasada działania testu ROS-Glo H ₂ O ₂ .	90
Rycina 11 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii BJ-5ta w teście MTT.	97
Rycina 12 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii BJ-5ta w teście z czerwienią obojętną.	99
Rycina 13 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii BJ-5ta w teście z fioletem krystalicznym.	100
Rycina 14 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HaCaT w teście MTT.	101
Rycina 15 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HaCaT w teście z czerwienią obojętną.	102
Rycina 16 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii HaCaT w teście z fioletem krystalicznym.	104
Rycina 17 Powierzchnia rany zarośnięta przez keratynocyty pod wpływem CA1, CA2, AZJ i MAD po 14 godzinnej obserwacji.	105
Rycina 18 Obraz mikroskopowy keratynocytów po wykonaniu rany w czasie zerowym i po 14 h pod wpływem wyciągu CA1 (100 µg/ml) i CA2 (500 µg/ml).	106
Rycina 19 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii C8D1A w teście MTT.	107
Rycina 20 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii C8D1A w teście z czerwienią obojętną.	109
Rycina 21 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii C8D1A w teście z fioletem krystalicznym.	110

Rycina 22 Aktywność glioprotekcyjna CA1, CA2, AZJ i MAD poddanych inkubacji z astrocytami przed zastosowaniem doksorubicyny, oceniona w teście MTT.....	112
Rycina 23 Aktywność glioprotekcyjna CA1, CA2, AZJ i MAD zastosowanych jednocześnie z doksorubicyną, oceniona w teście MTT.....	114
Rycina 24 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii A375 w teście MTT.	116
Rycina 25 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii A375 w teście z czerwienią obojętną.....	117
Rycina 26 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii A375 w teście z fioletem krystalicznym.....	119
Rycina 27 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii WM793 w teście z czerwienią obojętną.....	121
Rycina 28 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii WM793 w teście z czerwienią obojętną.....	122
Rycina 29 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii WM793 w teście z fioletem krystalicznym.....	123
Rycina 30 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HepG2 w teście MTT.....	125
Rycina 31 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na żywotność komórek linii HepG2 w teście z czerwienią obojętną.....	126
Rycina 32 Wpływ CA1, CA2, AZJ i MAD na proliferację komórek linii HepG2 w teście z fioletem krystalicznym.....	127
Rycina 33 Zdolność CA1, CA2 i AZJ do dezaktywacji wolnego rodnika tlenowego DPPH.	129
Rycina 34 Wpływ CA1 i CA2 na poziom reaktywnych form tlenu w hodowli komórek linii BJ-5ta i HepG2 w teście ROS-Glo H ₂ O ₂	132
Rycina 35 Widma absorpcji promieniowania UV dla CA1 i CA2.....	135