

KATEDRA FARMAKOGNOZJI WYDZIAŁU FARMACEUTYCZNEGO
UNIwersYTET Jagielloński COLLEGIUM MEDICUM

**Analiza fitochemiczna oraz aktywność biologiczna
wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron
canadensis* L. Cronq)**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Marek Ellnain

Kraków 2013

SKŁADAM SERDECZNE PODZIĘKOWANIA PROMOTOROWI
PANU PROFESOROWI DR HAB. ZBIGNIEWOWI JANECZKO ZA
POMOC W REALIZACJI PRACY, JEJ MERYTORYCZNE UKIERUNKOWANIE,
ORAZ POŚWIĘCONY CZAS

W REALIZACJI TEJ PRACY POMAGAŁO MI WIELE OSÓB
A W SZCZEGÓLNOŚCI:

Dr Agnieszka Galanty
Mgr Karolina Grabowska
Dr Irma Podolak
Dr Beata Starek-Świechowicz
Mgr Dorota Burakowska
Mgr Sylwia Luzar

DZIEKUJĘ WAM BARDZO!

SKŁADAM TAKŻE PODZIĘKOWANIA
KOLEŻANKOM I KOLEGOM
Z KATEDRY FARMAKOGNOZJI UJ CM
ZA ŻYCZLIWOŚĆ, WSPARCIE ORAZ MIŁĄ ATMOSFERĘ!

SPECJALNE PODZIĘKOWANIA KIERUJĘ DO MOJEJ ŻONY ROKSANY, ZA
WSPARCIE, ZROZUMIENIE ORAZ DUŻĄ POMOC PRZY OBSŁUDZE
NARZĘDZI PAKIETU OFFICE, DO KTÓREGO NIGDY NIE MIAŁEM
CIERPLIWOŚCI ☺ DZIĘKUJĘ RÓWNIEŻ CAŁEJ MOJEJ RODZINIE ZA
POMOC ORAZ WYROZUMIAŁOŚĆ

Spis treści

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	9
1. Wprowadzenie.....	10
2. Rodzaj <i>Erigeron</i> L.....	12
2.1. Przymiotno kanadyjskie (<i>Erigeron canadensis</i> L. Cronq).....	13
2.2. Systematyka i etymologia.....	13
2.3. Opis morfologiczny.....	14
2.4. Występowanie.....	14
2.5. Przymiotno kanadyjskie a rolnictwo.....	15
3. Skład chemiczny surowca.....	15
3.1. Flawonoidy.....	15
3.2. Garbniki pirogalolowe.....	16
3.3. Fenolokwasy.....	16
3.4. Olejek eteryczny.....	16
3.5. Sterole roślinne.....	17
3.6. Związki triterpenowe.....	18
3.7. Lipidy.....	18
3.8. Inne związki.....	18
4. Działanie oraz zastosowanie przetworów z przymiotna kanadyjskiego.....	19
4.1. Surowiec.....	19
4.2. Tradycyjne zastosowanie surowca.....	19
4.3. Oficjalne zastosowanie surowca oraz preparaty.....	20
4.4. Tradycyjne zastosowanie surowca w świetle współczesnych badań naukowych.....	21
4.4.1. Działanie przeciwzapalne.....	21
4.4.2. Działanie przeciwkrwotoczne oraz wpływ na elementy morfotyczne krwi.....	22
4.5. Inne profile aktywności wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego lub związków z nich wyizolowanych.....	23
4.5.1. Aktywność cytotoksyczna.....	23
4.5.2. Aktywność przeciwbakteryjna, przeciwwirusowa oraz przeciwgrzybicza.....	25
4.5.3. Aktywność nicienobójcza.....	26
4.5.4. Aktywność antyoksydacyjna.....	27
4.5.5. Aktywność hipotensyjna.....	27
5. Galaktozylodiacylloglicerole.....	28
5.1. Budowa oraz występowanie.....	28

5.2. Aktywność galaktozylodiacyllogliceroli.....	29
5.2.1. Aktywność cytotoksyczna oraz działanie przeciwnowotworowe.....	29
5.2.2. Aktywność przeciwzapalna.....	30
5.2.3. Inne profile aktywności galaktozylodiacyllogliceroli.....	31
5.3. Badania ilościowe galaktozylodiacyllogliceroli.....	32
6. Cel i założenia pracy.....	34
II. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	35
7. Materiał i metody.	36
7.1. Chromatografia cienkowarstwowa, preparatywna, kolumnowa oraz średniociśnieniowa chromatografia kolumnowa (MPLC).....	36
7.2. Wzorce.....	36
7.3. Analiza spektralna.....	36
7.4. Test denaturacji albumin (albumin denaturation assay).....	36
7.5. Zwierzęta.....	37
7.6. Linie komórkowe.....	37
7.7. Pożywki do hodowli komórkowych.....	37
7.8. Odczynniki oraz materiały do hodowli komórkowych.....	37
7.8.1. Odczynniki do hodowli komórkowych.....	37
7.8.2. Materiały do hodowli komórkowych.....	37
7.9. Aparatura badawcza.....	38
8. Surowiec do badań.....	38
9. Analiza jakościowa.....	38
9.1. Ekstrakcja surowca.....	38
9.2. Porównawcza analiza jakościowa wyciągów metodą TLC.....	39
9.3. Izolacja związku EC ₁ i EC ₂ z zastosowaniem MPLC.....	40
9.4. Oczyszczanie związków EC ₁ i EC ₂ z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej TLCprep.....	41
9.5. Identyfikacja wyizolowanych związków metodami spektralnymi.....	41
9.5.1. ¹ H i ¹³ C NMR.....	41
9.5.2. FAB MS.....	48
9.6. Określenie profilu kwasów tłuszczowych wyizolowanych związków EC ₁ i EC ₂ metodą chromatografii gazowo-cieczowej.....	51
9.7. Potwierdzenie tożsamości wyizolowanych związków metodami chromatograficznymi (TLC, HPLC) poprzez porównanie z wzorcami.....	53

9.7.1. Porównawcza analiza TLC wyciągów metanolowych oraz wyizolowanych z nich związków z komercyjnie dostępnymi wzorcami galaktozylodiacylgliceroli.....	53
9.7.2. Porównawcza analiza HPLC wyizolowanych związków z komercyjnie dostępnymi wzorcami galaktozylodiacylgliceroli.....	55
9.7.3. Porównanie widm ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz FAB MS wyizolowanych związków EC_1 i EC_2 ze wzorcami mono- oraz digalaktozylodiacylglicerolu.....	58
10. Analiza ilościowa z wykorzystaniem metody densytometrycznej.....	61
10.1. Materiał roślinny.....	61
10.2. Roztwory wzorcowe.....	61
10.3. Chromatografia cienkowarstwowa TLC.....	61
10.4. Walidacja metody.....	63
10.5. Wyniki.....	64
11. Ocena wpływu wyciągów z suszonego i świeżego stabilizowanego ziela przymiotna kanadyjskiego na wybrane wskaźniki hematologiczne krwi, skład odsetkowy białych krwinek oraz na zjawisko emperipolezy w szpiku kostnym u szczurów.....	66
11.1. Ocena zmian wskaźników hematologicznych krwi.....	66
11.2. Badanie składu odsetkowego krwinek białych w krwi obwodowej.....	81
11.3. Ocena częstości występowania zjawiska emperipolezy.....	86
12. Ocena aktywności przeciwzapalnej in vitro metodą testu denaturacji albumin.....	89
13. Ocena aktywności cytotoksycznej wyciągów oraz wyizolowanych mono- i digalaktozylodiacylglicerolu względem ludzkich oraz szczurzych komórek nowotworu prostaty oraz prawidłowych komórek nabłonka prostaty.....	91
14. Omówienie i dyskusja wyników.....	94
14.1. Wprowadzenie.....	94
14.2. Uzasadnienie celu i założeń pracy.....	95
14.3. Analiza porównawcza wyciągów.....	97
14.3.1. Izolacja związków EC_1 i EC_2 z wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego.....	97
14.3.2. Identyfikacja związków EC_1 i EC_2	98
14.4. Ilościowa analiza zmian zawartości mono- oraz digalaktozylodiacylglicerolu w zależności od okresu wegetacji rośliny metodą densytometryczną.....	100
14.5. Ocena wpływu wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego na wybrane wskaźniki hematologiczne krwi u szczurów.....	102
14.5.1. Ocena wskaźników hematologicznych krwi.....	102
a) RBC (erytrocyty).....	102

b) HCT (hematokryt).....	103
c) MCV (średnia objętość krwinki czerwonej).....	103
d) HGB (stężenie hemoglobiny).....	104
e) MCH (średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej).....	104
f) MCHC (średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej).....	105
g) WBC (leukocyty).....	106
h) PLT (trombocyty).....	106
14.5.2. Ocena składu odsetkowego białych krwinek.....	107
14.5.3. Zjawisko emperipolezy w szpiku kostnym u szczurów.....	109
14.6. Ocena aktywności przeciwzapalnej wyizolowanych monogalaktozydylodiolacyloglicerolu i digalaktozydylodiolacyloglicerolu oraz wyciągów z surowca suszonego i świeżego stabilizowanego za pomocą testu denaturacji albumin (albumin denaturation assay).....	109
14.7. Ocena aktywności cytotoksycznej wyciągów z surowca suszonego i świeżego stabilizowanego oraz wyizolowanych mono- i digalaktozydylodiolacyloglicerolu.....	111
15. Wnioski.....	114
16. Streszczenie.....	116
Indeks tabel.....	117
Indeks rycin.....	119
Bibliografia.....	121

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wprowadzenie.

Przymiotno kanadyjskie (*Erigeron canadensis* L. Cronq) to roczna, rzadziej dwuletnia roślina ozima lub jara, która do Europy zawędrowała w XVI wieku z Ameryki Północnej. W Polsce pierwsze wzmianki na jej temat pojawiły się w wieku XVIII. Małe wymagania glebowe oraz klimatyczne, a także niesamowita zdolność do reprodukcji sprawiły, że roślina bardzo szybko rozprzestrzeniła się na terenie Europy, w tym także Polski, stając się trudnym do wyplenienia chwastem, powodującym duże straty w uprawach rolnych, ogrodach i zasiewach. Nie bez znaczenia dla rolnictwa pozostaje fakt, iż przymiotno kanadyjskie jest odporne na większość stosowanych współcześnie herbicydów takich jak parakwat, atrazyna czy chlorsulfuron. Występuje powszechnie na miedzach, ścierniskach, pastwiskach, suchych łąkach itp. Zasiedla także obszary ruderalne. Przymiotno kanadyjskie jest rośliną leczniczą, która od dawna stosowana była w medycynie tradycyjnej jako środek o działaniu przeciwkrwotocznym, przeciwzapalnym, przeciwbiegunkowym i moczopędnym. Obecnie na polskim rynku farmaceutycznym dostępny jest jeden preparat, w skład którego wchodzi wyciąg gęsty z ziela tej rośliny – HEMORIGEN®. Preparat ten polecany jest do stosowania jako środek wspomagający gojenie siniaków i podbiegnięć krwawych. Do niedawna wskazania obejmowały także nadmierne krwotoki różnego pochodzenia jak np. zbyt obfite miesiączki czy hemoroidy, jednak nie zostały one potwierdzone w odpowiednich badaniach. Na temat rośliny opublikowano wiele prac, których liczba stale wzrasta. Jak łatwo można się domyślić większość publikacji dotyczy oporności na środki chwastobójcze, co stanowi swego rodzaju wyznacznik skali tego problemu. Dużo jest także danych na temat chemizmu oraz aktywności biologicznej zarówno ekstraktów jak i wyizolowanych związków.

W Polsce temat ten nie jest popularny. Podstawowe informacje o roślinie oraz jej chemizmie i zastosowaniu w medycynie tradycyjnej zawdzięczamy takim autorom jak Strzelecka i Glinkowska czy Kostecka-Mądalska. Wspomnieć należy także o pracach dotyczących olejku eterycznego publikowanych głównie przez Lis i Górę z Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej oraz o pracach opisujących antyoksydacyjne właściwości wyciągów z przymiotna kanadyjskiego oraz ich wpływ na agregację płytek krwi i proces krzepnięcia opublikowanych głównie przez Saluk-Juszczak oraz Olas z Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego oraz Pawlaczyka z Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Wrocławskiej.

Jak wyżej wspomniano, medycyna tradycyjna poleca ziele przymiotna kanadyjskiego jako środek m.in. o działaniu przeciwkrwotocznym oraz przeciwzapalnym. Praktycznie jednak nie istnieją dane literaturowe, które potwierdzałyby taki profil działania surowca. Niektóre z doniesień

na temat działania rośliny, jak np. fakt, iż ziele przymiotna ma zwiększać liczbę płytek krwi oraz skracać czas jej krzepnięcia, nie znajdują żadnego poparcia w pracach eksperymentalnych. Nieznany pozostaje także mechanizm działania preparatu HEMORIGEN®, a skuteczność jego opiera się wyłącznie na przesłankach medycyny tradycyjnej. Bezpośrednim przyczynkiem do podjęcia tematu niniejszej pracy doktorskiej jest chęć zweryfikowania tradycyjnych wskazań do stosowania surowca jako środka o działaniu poprawiającym wskaźniki hematologiczne krwi oraz przeciwzapalnym. Nie bez znaczenia jest również aspekt poznawczy, mający na celu rozszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat przymiotna kanadyjskiego. W pracy porównano pod względem fitochemicznym wyciągi z surowca świeżego stabilizowanego i suszonego, a także dokonano oceny ich wpływu na wskaźniki hematologiczne krwi u szczurów oraz aktywności przeciwzapalnej. Biorąc pod uwagę liczne dane literaturowe dotyczące cytotoksycznej aktywności wyciągów z przymiotna kanadyjskiego, bądź niektórych wyizolowanych z nich związków, oceniono taką aktywność względem szczurzej linii komórek nowotworowych prostaty AT-2, ludzkiej linii komórek nowotworowych prostaty DU145 i PC3 oraz linii komórek prawidłowego nabłonka prostaty PNT-2. Praca niniejsza stanowi nie tylko podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat przymiotna kanadyjskiego jako rośliny leczniczej, ale także próbę naukowego uzasadnienia ludowych wskazań do stosowania surowca.

2. Rodzaj *Erigeron* L.

Rodzaj *Erigeron* L. (syn. *Conyza*) liczy około 300 gatunków. Należą do niego rośliny zielne jednoroczne, dwuletnie lub byliny. Są to pospolite rośliny łąkowe lub chwasty, choć kilka z nich stało się przedmiotem badań naukowych ze względu na swoje interesujące właściwości. Rośliny te występują głównie w klimacie umiarkowanym, a największe ich skupienie zaobserwować można na terenach Ameryki Północnej. Najistotniejszymi cechami budowy morfologicznej są całobrzegie, rzadziej piłkowane liście oraz kwiaty poligamiczne, dimorficzne lub trimorficzne. Nazwa *erigeron* wywodzi się z języka greckiego i powstała wskutek złożenia dwóch słów: *eri* – wcześniej oraz *geron* – starzec. Pochodzi ona od białego puchu *pappusa* pojawiającego się na owocach, który ma za zadanie ułatwić ich przenoszenie przez wiatr. W Polsce spotkać możemy między innymi takie gatunki jak *Erigeron alpinus* (Przymiotno alpejskie), *Erigeron annuus* (Przymiotno białe), *Erigeron hungaricus* (Przymiotno węgierskie), *Erigeron acer* (Przymiotno ostre), *Erigeron droebachiensis* (Przymiotno nagie), *Erigeron macrophyllus* (Przymiotno karpackie) oraz inne, niewymienione tu gatunki [1]. W literaturze naukowej spotkać można wzmianki na temat kilku przedstawicieli rodzaju *Erigeron* L. Jednym z bardziej interesujących jest *Erigeron breviscapus*. Wyciąg wodny z tej rośliny jest lekiem stosowanym w tradycyjnej medycynie chińskiej w dusznicy bolesnej, zaburzeniach krążenia mózgowego oraz udarach [2]. Jedną z najważniejszych substancji czynnych występujących w surowcu jest glikozyd flawonoidowy - skutelareina. W kilku eksperymentach farmakologicznych przeprowadzonych *in vivo* dowiedziono jej neuroprotektoryjnego oraz przeciwutleniającego działania w zwierzęcych modelach niedokrwiennej udaru mózgu [3] oraz hamującego wpływu względem izoenzymu 1A2 mikrosomalnego układu enzymatycznego cytochromu P450 [4]. Ciekawymi przedstawicielami rodzaju są też *Conyza aegyptiaca*, z którego wyciągi metanolowe wykazują aktywność przeciwbakteryjną i przeciwwirusową [5], *Erigeron linifolius* (syn. *Conyza linifolia* Wild. Taechh.), zawierający acetylowane glikozydy pinenowe o silnym działaniu antymutagennym [6], oraz *Erigeron bonariensis* - o właściwościach przeciwbakteryjnych, a także pewnej aktywności cholinergicznej [7].

2.1. Przymiotno kanadyjskie (*Erigeron canadensis* L. Cronq).

Przymiotno kanadyjskie jest rośliną jednoroczną, ozimą lub jarą należącą do rodziny Astrowatych (*Asteraceae*). Jego ojczyzną jest Ameryka Północna, obecnie jednak powszechnie występuje na terenie Europy, dokąd zostało zawleczone przez migrujące ptaki lub, jak podają niektóre źródła, przybyło wewnątrz wypchanych zwierząt sprowadzonych do Muzeum Historii Naturalnej w Paryżu [8]. Pierwsza wzmianka o roślinie pochodzi z 1655 roku. Przymiotno zostało wymienione w Katalogu Ogrodu Botanicznego w Blois. Nazwę gatunkową *Erigeron canadensis*, nadał roślinie Linneusz w roku 1753 w dziele *Species Plantarum*.

2.2. Systematyka i etymologia.

Przymiotno kanadyjskie umieszczone jest w następującym układzie systematycznym:

GROMADA: *Spermatophyta* – Nasienne

PODGROMADA: *Angiospermae (Magnoliophytina)* – Okrytonasienne

KLASA: *Dicotyledones* – Dwuliścienne

RZĄD: *Asterales* – Astrowce

RODZINA: *Asteraceae* – Astrowate (Złożone)

PODRODZINA: *Asteroidae (Tubuliflorae)* – Rurkowe

RODZAJ: *Erigeron* L. – Przymiotno

GATUNEK: *Erigeron canadensis* L. Cronq – Przymiotno kanadyjskie syn. *Conyza canadensis* L. Cronq, *Leptilon canadense* L. Britton [9]

W literaturze spotkać można także potoczne nazwy rośliny. W piśmiennictwie polskojęzycznym są to najczęściej: przymiotek, przymiotnik, stary krzew, stare ziele. W piśmiennictwie anglojęzycznym przykładowe nazwy to: Canadian fleabane, Marestail, Butterweed, Blood stanch, Horsetweed, w piśmiennictwie francuskim: Vergerolle du Canada, Vergerette du Canada lub Fausse camomile, natomiast w piśmiennictwie niemieckim: Kanadisches Berufkraut lub Katzenschweif.

2.3. Opis morfologiczny.

Przymiotno kanadyjskie (Rycina 1) jest rośliną dorastającą do około 100 cm wysokości. Wzniesiona, obła, szorstko owłosiona łodyga, jest silnie rozgałęziona u góry. Liście są naprzemianległe, lancetowate lub równowąskolancetowate. Brzeg liścia jest cały lub ząbkowany. Koszyczki o średnicy 3-5 mm występują bardzo licznie. Zebrane są w przedłużoną, rozgałęzioną wiechę szczytową. Kwiaty są brzeżne, wąskojęzyczkowe, białe lub żółtobiałe, wewnętrzne rurkowate. Owoc stanowi naga niełupka której długość osiąga zwykle około 1 mm. Posiada puch kielichowy dochodzący do 3 mm długości, ułatwiający rozsiewanie. Roślina kwitnie w okresie od maja do września [10]. W zależności od czasu kielkowania żyje rok lub dwa. W przypadku kielkowania na jesień wytwarza rozetę liściową, zimuje i zakwita dopiero wiosną.



Rycina 1. Przymiotno kanadyjskie – *Erigeron canadensis* L. Cronq (fot. własna).

2.4. Występowanie.

Przymiotno kanadyjskie występuje obecnie prawie na całym świecie. Roślina ta ma niewielkie wymagania klimatyczne. Jej zasięg obejmuje tereny pomiędzy 45 stopniem szerokości geograficznej południowej a 55 stopniem szerokości geograficznej północnej. Lubi gleby ubogie i małożyźne, jest typowym kosmopolitą [11]. Przymiotno kanadyjskie spotkać można głównie na

pastwiskach, nieużytkach, przydrożach, zrębach i ugorach oraz suchych łąkach [12]. Roślina jest uporczywym i trudnym do wytępienia chwastem upraw polnych i ogrodowych, przez co powoduje duże straty w rolnictwie w Polsce i na świecie.

2.5. Przymiotno kanadyjskie a rolnictwo.

Przymiotno kanadyjskie jest, jak już wspomniano, chwastem zasiedlającym uprawy zbożowe oraz warzywne, co prowadzi do poważnego obniżenia ilości i jakości plonów, a tym samym znacznych szkód gospodarczych. Niektóre populacje rośliny wykształciły oporność na większość stosowanych herbicydów takich jak parakwat, atrazyna, chlorsulfuron czy glifosat [11]. Mechanizmy tej oporności są przedmiotem badań naukowców na całym świecie i zostały jedynie częściowo poznane. Przykładowo, oporność na parakwat związana jest najprawdopodobniej z występowaniem odpowiednich systemów transportowych, które przenoszą cząsteczki herbicydu do wakuoli lub ściany komórkowej, uniemożliwiając ich skuteczne działanie, bądź wiąże parakwat, co skutkuje jego dezaktywacją [13].

3. Skład chemiczny surowca.

Badania fitochemiczne prowadzą do coraz lepszego poznania chemizmu przymiotna kanadyjskiego. Według najnowszych doniesień literaturowych ziele przymiotna kanadyjskiego zawiera w swoim składzie wymienione poniżej grupy związków.

3.1. Flawonoidy.

Związki flawonoidowe wchodzące w skład surowca to głównie pochodne flawonu (apigenina, luteolina [14,15], skutelareina, bajkalina, 3',4',5,7-tetrahydroksyflawon [16], 3,5,7,3',4'-pentahydroksyflawon [17,18], 7-O- β -D-glukuronid-4'-hydroksywogoniny [18], 7-O- β -D-glukopiranozyd apigeniny [19]) oraz flawonolu (kemferol, kwercetyna, ramnetyna, izoramnetyna [10], rutyna, 3-O- α -L-ramnozyd kwercetyny [17,18], 3-O- β -D-glukopiranozyd kwercetyny, 7-O- β -D-galaktopiranozyd kwercetyny [19]). Według badań przeprowadzonych przez Strzelecką i Glinkowską [14] ilość związków flawonoidowych zależna jest od części rośliny. Najwięcej znajduje się ich w kwiatach (0,44%, oznaczenie przeprowadzone metodą wg Christa-Muellera, lub 0,56% w przypadku oznaczenia przeprowadzonego wg metody Hagedorna-Neu'a), mniej w liściach (w zależności od wyżej wymienionych metod oznaczenia odpowiednio 0,33% i 0,46%), natomiast

najmniej w ziele (0,17% i 0,20%) oraz łodydze (0,13% i 0,18%).

3.2. Garbniki pirogalolowe.

Garbniki obecne w ziele przymiotna kanadyjskiego zaliczane są do garbników hydrolizujących - galotanin. Strzelecka i Glinkowska [14] przeprowadziły oznaczenie zawartości tych garbników metodą manganometryczną oraz metodą zalecaną przez FP IV. Największe stężenie garbników odnotowano w liściach (13,7%), trochę mniejsze w kwiatach (11,6%), natomiast najmniejsze w ziele (8,5%) i łodygach (6,0%).

3.3. Fenolokwasy.

Ziele przymiotna kanadyjskiego jest surowcem bogatym w związki należące do tej grupy. Według badań Strzeleckiej i Glinkowskiej [14] głównymi fenolokwasami obecnymi w surowcu są: kwas protokatechowy, kawowy, p-kumarowy, ferulowy oraz syringowy. Niektórzy autorzy donoszą także o obecności w surowcu kwasu chlorogenowego [17,18]. Badania fitochemiczne przeprowadzone w Katedrze Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie wykazały również obecność kwasów izochlorogenowego oraz neochlorogenowego [20]. Ponadto w roślinie stwierdzono obecność estrów pochodnych kwasu kawowego i ferulowego z kwasem 2,7-anhydro-3-deoksy-2-oktulozonowym [20] oraz pochodnych kwasu benzoowego takich jak kwas p-hydroksybenzoowy, 3,5-dihydroksybenzoowy, 3,5-dimetoksybenzoowy [22].

3.4. Olejek eteryczny.

Przymiotna kanadyjskie jest rośliną olejkodajną. Zawartość olejku eterycznego w suszonym ziele krajowych okazów przymiotna kanadyjskiego wynosi około 0,4% i ulega nieznacznym wahaniom w zależności od stadium wegetacyjnego w jakim roślina się znajduje. Największa ilość olejku występuje w roślinach kwitnących, a w miarę przekwitania oraz owocowania zawartość olejku maleje. Ilość olejku zależna jest również od organu rośliny z którego jest pozyskiwany [23] oraz od strefy klimatycznej w jakiej roślina rośnie [24]. Przykładowo, w roślinach ukraińskich zawartość olejku wahała się od 0,8 do 1,32%, natomiast w okazach rosnących na Półwyspie Skandynawskim wynosiła jedynie 0,17%. Olejek eteryczny pozyskiwany z przymiotna kanadyjskiego ma barwę zielonkawo-żółtą, przyjemny, orzeźwiający zapach oraz ostry, kminkowy smak [24]. Analizy przeprowadzone z zastosowaniem spektrometrii mas (MS) oraz magnetycznego

rezonansu jądrowego (^1H NMR) wykazały, iż olejek eteryczny przymiotna kanadyjskiego rosnącego na terenie Polski zawiera około 56 różnych związków, przy czym w największych ilościach występują w nim limonen (70%) oraz *trans*- α -bergamoten (7%) [25]. Dla porównania głównymi składnikami olejku roślin pochodzących z Grecji są limonen (70%) oraz matricaria ester (7,9%) [26]. Zestawienie najważniejszych składników olejku eterycznego polskich okazów przymiotna kanadyjskiego umieszczono w tabeli 1 [25]. Wykazano, że w zależności od stadium rozwojowego rośliny wahaniom podlega nie tylko ilość olejku, ale także zawartość poszczególnych jego składników [27].

Tabela 1. Najważniejsze składniki olejku eterycznego przymiotna kanadyjskiego rosnącego w Polsce [25].

Składnik	Zawartość [%]
limonen	70
<i>trans</i> - α -bergamoten	7
(Z,Z)-matricaria ester	2,4
α -kurkumen	2,2
mircen	1,2
(E)- β -farnezen	0,9
β -pinen	0,8
<i>trans</i> -karweol	0,8
<i>cis</i> -p-mento-2,8-dien-1-ol	0,7
pozostałe 47 składników	14

3.5. Sterole roślinne.

Z ziela przymiotna kanadyjskiego wyizolowano następujące sterole roślinne: β -sitosterol i jego 3-O- β -D-glukozyd, stigmasterol, 3-O- β -D-glukozyd spinasterolu [16,17,18,28].

3.6. Związki triterpenowe.

Z przeanalizowanych danych literaturowych wynika, że ziele przymiotna kanadyjskiego zawiera następujące triterpenoidy: α -amyrynę, β -amyrynę, 3-O-(hydroksyacetylo)-23,28-dihydroksy- β -amyrynę, ester 3 β ,16 β ,2 β -trihydroksytaraksa-3-O-palmitoksyłu, frydelinę, epifrydelinol, tarakserol, simiarenol oraz kwas oleanolowy [15,16,17,18,22,29].

3.7. Lipidy.

Z ziela przymiotna kanadyjskiego wyizolowano związki zaliczane do grupy lipidów, wśród których wymienić należy m.in. sfingolipidy takie jak 1,3,5-trihydroksy-2-heksadekanolamino-(6E,9E)-heptakozdien wraz z jego 1-O-glukopiranozydem oraz 1,3-dihydroksy-2-heksanolamino-(4E)-heptadecen [22,28] oraz kwasy tłuszczowe (kwas 9,10,12-trihydroksy-10(E)-oktadecenowy, 3-izopropenylo-6-oksoheptanowy) [15,16,29].

3.8. Inne związki.

Oprócz wyżej wymienionych wyizolowano także następujące związki nie dające się zaklasyfikować do żadnej z wyżej opisywanych grup:

- związki polienowe: ester metylowy 8R,9R-dihydroksymatricaria oraz jej 4Z,8Z- γ -lakton, lakton (4Z,8Z)-matricaria, lakton (4E,8Z)-matricaria [15,16,29], ester metylowy (2Z,8Z)-matricaria, lakton (4Z)-lachnophyllum [30], ester (8Z)-2,3-dihydromatricaria [31],
- związki pochodne dihydropiranu (konyzapiran-E i konyzapiran-Z) [15,29],
- pochodne kwasu piromekonowego [32],
- (+)-hydroksydihdroneokarwenol [16],
- harminę [28],
- ftalan diizobutyłu [18],
- karbaminian N,N'-(4-metylo-1,3-fenylo)bis-C,C'-dimetylu [18].

4. Działanie oraz zastosowanie przetworów z przymiotna kanadyjskiego.

4.1. Surowiec.

Surowcem stosowanym w celach leczniczych jest ziele przymiotna kanadyjskiego – *Erigeronis herba*. Pozyskiwać należy je w fazie wczesnego kwitnienia rośliny (w Polsce czas ten przypada na pierwszą połowę lipca), ścinając górne, ulistnione pędy rośliny. Należy unikać zbierania roślin przekwitniętych, o mocno zdrewniałej łodydze oraz suchych liściach. Wysuszony surowiec przechowujemy w woreczkach płóciennych lub papierowych torbach, w miejscach suchych, ciemnych i dobrze wentylowanych [14,33,34]. Surowiec nie jest surowcem farmakopealnym w Polsce.

4.2. Tradycyjne zastosowanie surowca.

Ziele przymiotna kanadyjskiego jest tradycyjnym środkiem o działaniu przeciwkrwotocznym. W tym celu było stosowane m.in. przez szczepy indiańskie zamieszkujące Amerykę Północną. Medycyna tradycyjna poleca też surowiec jako środek przeciwzapalny, przeciwreumatyczny, moczopędny oraz przeciwobrzękowy. W USA wyciąg alkoholowy z ziela stosowany jest w leczeniu trudno gojących się ran, obfitych miesiączek oraz krwotoków z przewodu pokarmowego. W Kanadzie używany jest jako diuretyk oraz środek tonizujący. W Rumunii ekstrakt wodny z ziela wykorzystywany jest jako środek bakterio- i grzybobójczy [34]. Wyciąg z ziela przymiotna stosowany jest także zewnętrznie w postaci przymoczek oraz okładów w przypadku owrzodzeń, odleżyn oraz oparzeń [35]. W Turcji odwar z ziela zalecany jest jako tradycyjny środek zwalczający wszy [36]. We Włoszech (region Kampanii) odwar sporządzony z ziela przymiotna kanadyjskiego, komosy białej oraz szarlatu szorstkiego aplikowany jest miejscowo w formie okładów, jako środek przeciwreumatyczny [37]. W medycynie tradycyjnej tajlandzkiego szczepu Akha, napar z ziela wykorzystywany jest w celu przyspieszenia krzepnięcia krwi oraz obniżenia gorączki [38]. W Portugalii medycyna tradycyjna zaleca stosowanie kwitnącego ziela przymiotna kanadyjskiego w kamicy nerkowej, podagrze oraz biegunkach [39]. W Hiszpanii herbatka z tego ziela jest stosowana jako tonik poprawiający trawienie (*digestif*) [40].

4.3. Oficjalne zastosowanie surowca oraz preparaty.

Oficjalne zastosowanie przymiotna kanadyjskiego jako środka leczniczego jest marginalne. Jedyne dostępne na polskim rynku farmaceutycznym preparaty to HEMORIGEN® (Rycina 2), produkowane przez Wrocławskie Zakłady Zielarskie „Herbapol” Spółka Akcyjna. Ma on postać tabletek (opakowanie 30 sztuk), w skład których wchodzi wyciąg gęsty z ziela przymiotna kanadyjskiego (*Erigeronis canadensis herbae extractum spissum*) w ilości 50 mg w jednej tabletkie. Preparat polecany jest jako „lek stosowany tradycyjnie we wspomagającym leczeniu drobnych stłuczeń i podbiegnięć krwawych (siniaków) powstałych w wyniku łagodnych urazów” (cyt. ulotka). Wcześniej preparat polecany był jako „środek pomocniczy w leczeniu krwawień z dróg rodnych o różnej etiologii, w tym spowodowanych skazami naczyniowymi” (cyt. ulotka). Ze względu jednak na brak odpowiednich badań, rejestracja z tymi wskazaniami nie została przedłużona. Zalecane dawkowanie HEMORIGENU® wynosi 3 razy dziennie po 1-2 tabletki nie dłużej niż 3-4 dni. Mechanizm działania preparatu jest nieznany. Producent ostrzega przed stosowaniem preparatu osoby cierpiące na chorobę zakrzepową żył, zylaki kończyn dolnych oraz odbytu, a także przewlekłą niewydolność żylną. Do roku 2005 istniał także preparat o takiej samej nazwie HEMORIGEN®, ale w postaci nalewki (opakowanie 100 g). Produkowany był przez przedsiębiorstwo Phytopharm Kłęka Spółka Akcyjna, ale został wycofany. Wskazania do stosowania preparatu obejmowały krwotoki z dróg rodnych u kobiet oraz skazy naczyniowe. Zalecane dawkowanie wynosiło 3 razy dziennie pół łyżeczki płynu podawane w szklance wody. Wyciąg z przymiotna kanadyjskiego wchodził także, obok wyciągów z miłorzębu japońskiego, głogu, jemioli, arniki i kasztanowca, w skład preparatu VENOFORTON® – Mikstura Krążeniowa, produkowanego przez Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowe Dary Natury – Ryki. Lek ten wywierał działanie uszczelniające na naczynia krwionośne, zwłaszcza na naczynia włosowate, poprawiał ukrwienie narządów wewnętrznych oraz wspomagał pamięć krótkotrwałą. Preparat wskazany był dla osób cierpiących na zaburzenia krążenia mózgowego, krążenia obwodowego, w niewydolności naczyniowej i innych schorzeniach układu krążenia. Zalecane dawkowanie wynosiło 30-40 kropli w kieliszku wody 3-4 razy dziennie na 30 minut przed jedzeniem w cyklach kilkutygodniowych z zachowaniem 10 dniowych przerw pomiędzy cyklami. Preparaty te są przeciwwskazane do stosowania przez osoby uczulone na rośliny z rodziny astrowatych. Przymiotno kanadyjskie jest wykorzystywane także w homeopatii. Pranalewkę (alkoholaturę) sporządza się z całej rośliny w stosunku 1:10 i odpowiednio rozcieńcza [12,41]. Przykładowym preparatem homeopatycznym dostępnym bez recepty na polskim rynku farmaceutycznym, a zawierającym w swoim składzie nalewkę z ziela przymiotna w rozcieńczeniu D3 jest HorneelS®.

Preparat ten zalecany jest w zaburzeniach miesiączkowania oraz bezpłodności u kobiet. Dostępny jest w postaci kropli bądź iniekcji [42].



Rycina 2. HEMORIGEN® – tabletki (fot. własna).

4.4. Tradycyjne zastosowanie surowca w świetle współczesnych badań naukowych.

4.4.1. Działanie przeciwzapalne.

Medycyna tradycyjna poleca stosowanie ziela przymiotna kanadyjskiego jako środka o działaniu przeciwzapalnym i przeciwbólowym w lumbago i reumatyzmie [12]. Są to jak powszechnie wiadomo choroby przebiegające z silnym miejscowym odczynem zapalnym, dlatego podstawowymi lekami stosowanymi w ich terapii są leki z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Naturalne środki o działaniu przeciwzapalnym i przeciwbólowym również mogą okazać się przydatne w terapii tego rodzaju schorzeń. Mimo wskazań medycyny tradycyjnej, istnieje niewiele danych literaturowych na temat przeciwzapalnego działania przetworów sporządzonych z ziela przymiotna kanadyjskiego. Dotychczas dokonano oceny wpływu wyciągu etanolowego oraz wyciągu uzyskanego przez wytrawianie surowca eterem naftowym na przebieg zaindukowanej reakcji zapalnej w teście karageninowym u szczura. Udało się uzyskać znaczące zmniejszenie obrzęku poduszeczki łapy, przy czym aktywność przeciwzapalna wyżej wymienionych wyciągów była porównywalna do aktywności przeciwzapalnej wyciągu płynnego z rumianku (*Chamomilla recutita* L.), który w badaniu został użyty jako substancja referencyjna. Analiza składu wyciągu sporządzonego poprzez wytrawianie surowca eterem naftowym wykazała, że za działanie przeciwzapalne odpowiadają zawarte w nim związki seskwiterpenowe takie jak β -santalén, β -himachalen, kuparen, α -kurkumen i kadinen, stanowiące składniki olejku eterycznego. Nie przeprowadzono analizy składu wyciągu etanolowego, który wykazywał podobną aktywność. W badaniu uwzględniono tylko wyciągi

sporządzone z surowca suszonego [43].

4.4.2. Działanie przeciwkrwotoczne oraz wpływ na elementy morfotyczne krwi.

Ziele przymiotna kanadyjskiego uważane jest za skuteczny środek o działaniu przeciwkrwotocznym. Według niektórych autorów można stosować je w krwawieniach z hemoroidów, obfitych miesiączkach oraz krwawieniach z dróg rodnych i przewodu pokarmowego [12,33,34,44]. Działanie to przypisuje się zawartym w surowcu związkom flawonoidowym. Zmniejszają one kruchość oraz łamliwość naczyń krwionośnych, a w szczególności naczyń włosowatych, zwiększając przy tym ich szczelność oraz elastyczność. Niektóre flawonoidy mają także zdolność hamowania aktywności enzymów takich jak np. hialuronidaza czy kolagenaza mogących powodować zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych [45,46,47,48]. Taka hipoteza działania przeciwkrwotocznego nie została jednak zweryfikowana w odpowiednich badaniach, a dokładny mechanizm do dziś pozostaje nieznany. Istnieją także doniesienia, jakoby ziele przymiotna kanadyjskiego przyjmowane wewnętrznie w postaci różnego rodzaju przetworów miało zwiększać liczbę płytek krwi oraz skracać czas jej krzepnięcia [33,34,44], jednak nie znajdują one potwierdzenia w badaniach naukowych. Eksperyment przeprowadzony w Zakładzie Farmakologii Instytutu Przemysłu Zielarskiego w Poznaniu wykazał, że przetwory z ziela przymiotna kanadyjskiego stosowane zarówno zewnętrznie jak i wewnętrznie skracają czas krwawienia u myszy po obcięciu koniuszka ogona. W badaniu porównano skuteczność 10% roztworu nalewki, 10% roztworu inkraktu oraz 2% wyciągu płynnego, 1% wyciągu gęstego i 0,5% wyciągu suchego z inkraktu. Inkrakt wykazał znacznie silniejsze działanie niż nalewka, przy czym najsilniej działał wyciąg suchy [49]. Jest to jedyne doniesienie literaturowe dotyczące przeciwkrwotocznego działania surowca opierające się na przeprowadzonym eksperymencie. Znany jest natomiast sposób wytwarzania preparatu hamującego krzepnięcie krwi z ziela przymiotna kanadyjskiego. Preparat ten objęty jest ochroną patentową na terenie Polski. Otrzymywany jest on poprzez wytrawienie surowca rozpuszczalnikami lub mieszaniną rozpuszczalników, którą stanowią niższe alkohole jedno lub wielowodorotlenowe oraz woda. Otrzymany ekstrakt poddaje się zagęszczeniu, a następnie elucji rozpuszczalnikami, aż do otrzymania frakcji zawierającej w swoim składzie głównie związki cukrowe (oligo- i polisacharydy), która to frakcja podawana dożylnie wywiera działanie przeciwwakrzepowe, co potwierdzone zostało w odpowiednich testach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* [44]. Opisany wyżej preparat hamuje również, w sposób zależny od dawki, indukowaną kolagenem oraz ADP agregację płytek krwi [50,51]. Istnieją także doniesienia opisujące ochronne działanie

wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego wobec płytek krwi narażonych na silny stres oksydacyjny. Wykazano, że ekstrakt sporządzony ze świeżego ziela tej rośliny w istotny statystycznie sposób hamował powstawanie reaktywnych form tlenu oraz uszkodzenia w białkach błonowych płytek krwi, indukowane anionem nadtlenoazotynowym (ONOO⁻), który jest jednym z najsilniejszych czynników utleniających, zdolnym wywołać poważne uszkodzenia struktur komórkowych. Miarą działania ochronnego wyciągu było określenie ilości grup karbonylowych w białkach błonowych płytek oraz stężenia nitrotyrozyny, powstającej w wyniku reakcji nitrozylowania reszt tyrozyny tych białek. Zarówno stężenie nitrotyrozyny jak i ilość grup karbonylowych białek określano wykorzystując w tym celu metody immunoenzymatyczne (ELISA). Ekstrakt z ziela przymiotna kanadyjskiego wykazał silniejsze działanie antyoksydacyjne niż stosowane jako substancje referencyjne resweratrol oraz deferoksamina, skutecznie zmniejszając tworzenie nitrotyrozyny oraz grup karbonylowych w białkach błonowych płytek [50]. Zauważono jednak, że wysokie dawki ekstraktu (2500000 µg/ml) zmniejszają ilość wolnych grup sulfhydrylowych białek osocza oraz zwiększają stężenie zredukowanej formy homocysteiny, co sugeruje jego działanie prooksydacyjne w tych dawkach [52].

Podsumowując zebrane dane literaturowe, można stwierdzić, że dotychczasowe badania wykazały przeciwwzakrzepowe, antyagregacyjne, a także ochronne wobec płytek krwi działanie wyciągów z przymiotna kanadyjskiego oraz ich frakcji zawierających związki polisacharydowe i polifenolowe. Brak jest jednak jakichkolwiek danych źródłowych potwierdzających tak często pojawiające się w literaturze wzmianki na temat pozytywnego wpływu przetworów z ziela przymiotna kanadyjskiego na przyspieszenie czasu krzepnięcia krwi, wzrost liczby płytek lub innych elementów morfotycznych krwi. Można zaryzykować stwierdzenie, iż badania takie nie zostały przeprowadzone.

4.5. Inne profile aktywności wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego lub związków z nich wyizolowanych.

4.5.1. Aktywność cytotoksyczna.

Ziele przymiotna kanadyjskiego nie jest surowcem stosowanym w medycynie tradycyjnej w terapii schorzeń nowotworowych. Mimo to badania dowodzą, że zarówno wyciągi, jak i pewne związki wyizolowane z surowca, wykazują aktywność cytotoksyczną wobec niektórych ludzkich linii komórek nowotworowych.

Do tej pory określono aktywność cytotoksyczną różnego rodzaju wyciągów oraz związków

wyzolowanych z przymiotna kanadyjskiego wobec następujących linii ludzkich komórek nowotworowych: Hep-2 (nowotwór krtani), MCF7 (nowotwór piersi), HeLa (nowotwór jajnika), A431 (nowotwór nabłonka) oraz mysich komórek czerniaka B16. Hayet i wsp. [53] donoszą o aktywności cytotoksycznej, wyciągów otrzymanych poprzez wytrawienie suszonego surowca octanem etylu oraz eterem naftowym, względem komórek nowotworowych linii Hep-2. Opisywany w tych badaniach efekt cytotoksyczny był zależny od czasu ekspozycji komórek na wyciągi. Obliczone wartości IC_{50} po 72 h inkubacji wynosiły 45 $\mu\text{g/ml}$ dla wyciągu octanowego oraz 50 $\mu\text{g/ml}$ dla wyciągu otrzymanego poprzez wytrawienie surowca eterem naftowym. Wyciąg metanolowy nie wykazał znaczącej aktywności cytotoksycznej wobec tej linii komórek nowotworowych ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$). Powyższy eksperyment przeprowadzono metodą z użyciem błękitu metylenowego. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Ranę i wsp. [54] obiecującą aktywność cytotoksyczną wobec ludzkiej linii komórek nowotworowych MCF7 wykazał wyciąg etanolowy z suszonego ziela przymiotna kanadyjskiego. Obliczona wartość IC_{50} po 72 h inkubacji komórek z wyciągiem wyniosła 12,76 $\mu\text{g/ml}$. Eksperyment przeprowadzono metodą z wykorzystaniem sulforodaminy B. W badaniach Rethy i wsp. [55] przeprowadzonych za pomocą metody z użyciem błękitu tetrazolowego (test MTT), poddano ocenie aktywność cytotoksyczną wyciągów heksanowego z ziela i korzeni oraz chloroformowego z ziela przymiotna kanadyjskiego wobec ludzkiej linii komórek nowotworowych HeLa, MCF7 oraz A431. Wartości IC_{50} wyciągu heksanowego z korzeni dla wymienionych kolejno linii komórek nowotworowych wynosiły odpowiednio 6,47 $\mu\text{g/ml}$, 3,32 $\mu\text{g/ml}$ i 9,47 $\mu\text{g/ml}$, dla wyciągu heksanowego z ziela 17,4 $\mu\text{g/ml}$, 7,93 $\mu\text{g/ml}$ oraz 11,6 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy dla wyciągu chloroformowego z ziela 18,72 $\mu\text{g/ml}$, 15,8 $\mu\text{g/ml}$ i $>30 \mu\text{g/ml}$. Wobec wyżej wymienionych linii komórek aktywność cytotoksyczną wykazały także niektóre związki wyizolowane z korzeni przymiotna kanadyjskiego. Wymienić należy tu: związki pochodne dihydropiranu, matricaria- γ -laktony, epifridelinol, tarakserol, spinasterol oraz apigeninę. Wartości $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ wobec linii HeLa, MCF7 i A431 odnotowano dla apigeniny oraz spinasterolu (z wyjątkiem jego aktywności wobec linii MCF7 – $IC_{50} 26,5 \mu\text{g/ml}$). Wartości IC_{50} dla tych związków były zbliżone do wartości użytych w doświadczeniu związków referencyjnych (doksorubicyna, cisplatyna). Należy zauważyć, że związki te wykazywały niższą aktywność cytotoksyczną wobec prawidłowych komórek MRC-5 (fibroblasty) w porównaniu z liniami komórek nowotworowych. Badania przeprowadzone zostały z wykorzystaniem testu MTT [15]. Yan i wsp. [18] donoszą o aktywności cytotoksycznej innego związku triterpenowego wyizolowanego z ziela przymiotna kanadyjskiego, a mianowicie 3-O-(hydroksyacetylo)-23,28-dihydroksy- β -amyryny. W teście MTT, związek ten wykazał wysoką aktywność cytotoksyczną wobec ludzkiej linii komórek nowotworowych czerniaka B16 ($IC_{50} 7,77 \mu\text{g/ml}$).

4.5.2. Aktywność przeciwbakteryjna, przeciwwirusowa oraz przeciwgrzybicza.

Niektóre źródła donoszą o bakteriobójczym działaniu przetworów sporządzonych z ziela przymiotna kanadyjskiego [35]. Doniesienia te znajdują pewne potwierdzenie w badaniach naukowych. Wykazały one mianowicie, że różnego rodzaju wyciągi otrzymywane z ziela przymiotna kanadyjskiego oraz pewne związki wyizolowane z tych wyciągów wykazują aktywność hamującą rozwój niektórych bakterii oraz grzybów chorobotwórczych dla człowieka.

Hayet i wsp. [50] donoszą o aktywności przeciwbakteryjnej wyciągów sporządzonych poprzez wytrawienie suszonego ziela przymiotna kanadyjskiego za pomocą eteru naftowego, octanu etylu oraz metanolu. Aktywność była badana metodą dyfuzyjną na podłożu agarowym wobec czterech szczepów bakterii chorobotwórczych: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27950 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Najsilniejszą aktywność hamującą rozwój bakterii wykazał ekstrakt metanolowy, który był najskuteczniejszy wobec *E. faecalis* i *E. coli*. Wartość MIC wyniosła w tym przypadku 625 µg/ml. W przypadku *S. aureus* i *P. aeruginosa* wartości MIC wynosiły 5000 µg/ml. Pozostałe wyciągi wykazały umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną. Ich wartości MIC wynosiły 1,25 i 2500 µg/ml wobec *E. faecalis* i *E. coli* oraz 10000 µg/ml wobec *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Ci sami autorzy badali także hamujący wpływ wyciągów metanolowego, butanolowego, chloroformowego oraz octanu etylu na rozwój wirusa cytomegalii (CMV) oraz wirusa Cocksackie typu B3 (CoxB-3). Największą aktywność hamującą rozwój wirusa wykazał wyciąg metanolowy, którego skuteczność w stężeniu 100 µg/ml wynosiła 99,1%. Związkiem referencyjnym w tym badaniu był gancyklowir, który 50% skuteczność inhibicyjną wykazywał przy stężeniu 800 µg/ml. Eksperyment przeprowadzono metodą shell-vial [56]. Wyniki opisanych wyżej badań pozostają w sprzeczności z wynikami uzyskanymi przez Oskay'a i wsp. [57], którzy dowiedli braku aktywności przeciwbakteryjnej wyciągu etanolowego z suszonego ziela przymiotna kanadyjskiego wobec, między innymi takich szczepów bakterii jak *S. aureus* (w tym szczepy metycylinooporne), *E. coli* oraz *E. faecalis*. Wyciąg ten jednak wykazał słabą aktywność hamującą rozwój drożdżaków z rodzaju *Candida* (*Candida albicans*). Wyciągi z ziela przymiotna kanadyjskiego wykazują aktywność przeciwbakteryjną nie tylko wobec niektórych mikroorganizmów będących patogenami człowieka, ale także wobec pewnych gatunków sinic, których nadmierny rozplam powoduje zjawisko tzw. „zakwitania wód”. Li i wsp. [58] zbadali wpływ wyciągów uzyskanych poprzez wytrawianie surowca octanem etylu, eterem naftowym i etanolem na rozwój cyjanobakterii gatunku *Microcystis aeruginosa*. Rozwój tego mikroorganizmu najsilniej hamował wyciąg sporządzony za pomocą octanu etylu, a jego EC₅₀ zmierzone po 96 h działania wynosiło 31500 µg/ml. Aktywność

przeciwbakteryjną wykazują też niektóre związki wyizolowane z ziela przymiotna kanadyjskiego. Wymienić należy tu konyzolid, którego MIC dla bakterii szczepu *E. coli* wynosił 25 µg/ml oraz konyzoflawon, skutecznie hamujący rozwój patogennych drożdżaków z rodzaju *Candida* (*Candida albicans*) [59]. Testowano także aktywność przeciwbakteryjną pochodnych kwasu piromekonowego, estru metylowego matricariny, estru metylowego 8R,9R-dihydroksymatricariny oraz jej laktonu względem takich szczepów bakteryjnych jak *S. aureus*, *E. coli* oraz *Bacillus subtilis*; nie otrzymano jednak zadowalających wyników [16,32]. Wyizolowane z ziela przymiotna kanadyjskiego laktony (4Z,8Z)-matricaria oraz (4Z)-lachnophyllum okazały się skutecznymi inhibitorami wzrostu takich grzybowych patogenów roślinnych jak *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae* i *Colletotrichum gloeosporioides* [31]. Na zakończenie wspomnieć należy także, iż słabym inhibitorem wzrostu takich fitopatogenów grzybowych jak *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* oraz *Colletotrichum lindemuthianum* okazał się olejek eteryczny z przymiotna kanadyjskiego [60].

4.5.3. Aktywność nicieniobójcza.

Wyciągi sporządzone z ziela przymiotna kanadyjskiego wykazują też inne, interesujące profile aktywności, nie dające się zaklasyfikować w wyżej wymienionych punktach. Wymienić tu należy między innymi aktywność nicieniobójczą wodnych ekstraktów z ziela tej rośliny.

Begum i wsp. [61] dowiedli, że wykazują one nie tylko działanie bójcze wobec nicienia gatunku *Meloidogyne javanica*, będącego pasożytem roślin warzywnych, ale także inaktywują jego jaja, uniemożliwiając wykluwanie się nowych osobników. Badanie zostało przeprowadzone w warunkach *in vitro*. Śmiertelność dorosłych osobników pasożyta po 24 h ekspozycji na wyciąg wodny wynosiła 39%, natomiast po 48 h ekspozycji 57%, podczas gdy w grupie kontrolnej zaobserwowano śmiertelność na poziomie odpowiednio 6 i 11%. Inaktywacja jaj powodowana przez wyciąg wodny z przymiotna była o 24,62% wyższa w porównaniu z grupą kontrolną dla której wynosiła 0%. Z badania tego jednoznacznie wynika, że wyciągi wodne z przymiotna kanadyjskiego mogą okazać się skutecznymi dodatkami do gleby, mającymi na celu zmniejszenie rozwoju organizmów pasożytniczych.

4.5.4. Aktywność antyoksydacyjna.

Liczne badania wskazują, że antyoksydanty pochodzenia naturalnego odgrywają istotną rolę w prewencji różnego rodzaju chorób, m.in. nowotworów czy chorób zapalnych. Dzieje się tak ponieważ związki te zdolne są do likwidacji („zmiatania”) powstających w wyniku reakcji metabolicznych wolnych rodników (reaktywnych form tlenu), które odgrywają istotną rolę w procesie nowotworzenia, chorobach autoimmunologicznych, reakcji zapalnej oraz innych patologicznych procesach jakie mogą zachodzić w organizmie człowieka [46,47]. Wyciągi z ziela przymiotna kanadyjskiego cechują się istotną aktywnością antyoksydacyjną, i są zdolne zapobiegać uszkodzeniom płytek krwi wywoływanym przez stres oksydacyjny jak opisano wyżej. Działanie przeciwutleniające wyciągów potwierdzone zostało także w badaniach *in vitro* przeprowadzonych m.in. metodą z wykorzystaniem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (test DPPH).

Hayet i wsp. [53] przeprowadzili badania dla wyciągów metanolowego, z octanu etylu oraz z eteru naftowego za pomocą szeroko stosowanego w tego typu oznaczeniach testu DPPH. Wartość IC_{50} dla wyciągu metanolowego wynosiła 120 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy dla wyciągów otrzymanych przez wytrawienie surowca octanem etylu i eterem naftowym odpowiednio 150 i 190 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki te, sugerujące korzystne właściwości przeciwutleniające wyciągów z ziela przymiotna, potwierdzają także badania Woo i wsp. [62]. Przebadali oni wyciągi z suchego, świeżego oraz zblanszowanego ziela przymiotna, określając aktywność antyoksydacyjną za pomocą takich parametrów jak wartość IC_{50} EDA (electron donating ability – zdolność do oddania elektronu wyrażona w procentach) oraz AEAC (L-ascorbic acid equivalent antioxidant capacity – równoważnik antyoksydacyjnego działania kwasu askorbinowego). Badania wykazały, że wartości tych parametrów dla wyciągu świeżego wynosiły odpowiednio 5552,7 $\mu\text{g/ml}$ i 192,78 mg eq/g próbki, dla wyciągu z surowca suchego 471 $\mu\text{g/ml}$ i 194,05 mg eq/g próbki, natomiast dla wyciągu z surowca zblanszowanego 413,5 $\mu\text{g/ml}$ i 242,40 mg eq/g próbki. Wartości te wskazują na bardzo dobre właściwości antyoksydacyjne wyciągów z przymiotna, które mogłyby być stosowane jako potencjalne, przeciwutleniające dodatki do żywności.

4.5.5. Aktywność hipotensyjna.

Maurya i wsp. [63] wykazali działanie hipotensyjne wyciągu wodnego z ziela przymiotna kanadyjskiego. Wyciąg ten, podany uśpionym psom w dawce 50 mg/kg masy ciała zmniejszył średnie ciśnienie tętnicze z 86,4 do 36,08 mm Hg. Efekt ten był zauważalny niezwłocznie po podaniu, jednak jego działanie było krótkotrwałe. Podobne wyniki w badaniach nad wyciągiem

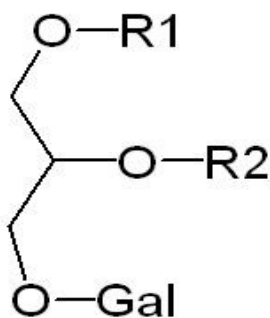
wodnym z kwiatów przymiotna uzyskali Lassere i wsp. [64]. Wyciąg ten podany szczurom w postaci iniekcji w dawce 360 mg/kg masy ciała spowodował znaczne, utrzymujące się przez 2 minuty od podania, obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Co ciekawe, wyciąg z ziela przymiotna w tych samych warunkach okazał się znacznie mniej aktywny. Ponadto Ding i wsp. [21] wykazali, że estry pochodnych kwasu kawowego oraz ferulowego z kwasem 2,7-anhydro-3-deoksy-2-oktulozonowym wyizolowane z ziela przymiotna kanadyjskiego hamują wydzielanie katecholamin w warunkach *in vitro*. Badania przeprowadzono na izolowanych, bydlących komórkach rdzenia nadnerczy; wydzielanie katecholamin stymulowano acetylocholiną, weratrydyną i jonami potasowymi. Wartości IC_{50} dla pochodnych kwasu kawowego wynosiły 94,65 μM , natomiast dla pochodnych kwasu ferulowego 42,35 μM . Zbadano także wpływ tych związków na stężenie wewnątrzkomórkowe jonów wapnia, jako że wzrost tego stężenia jest bezpośrednio związany z sekrecją katecholamin. Wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 59,81 μM oraz 67,29 μM dla pochodnych kwasu kawowego oraz ferulowego.

5. Galaktozylodiacylloglicerole.

5.1. Budowa oraz występowanie.

Galaktozylodiacylloglicerole należą do glikolipidów, zbudowanych z glicerolu, jednej lub większej ilości cząsteczek galaktozy oraz kwasów tłuszczowych. Glicerol połączony jest z galaktozą za pomocą wiązań O-glikozydowych, natomiast kwasy tłuszczowe z resztami hydroksylowymi glicerolu łączą się za pośrednictwem wiązań estrowych (Rycina 3). Duża liczba kwasów tłuszczowych jakie mogą wiązać się z cząsteczką glicerolu sprawia, iż w grupie tej występuje duża różnorodność związków. Do najczęściej spotykanych kwasów tłuszczowych w cząsteczkach galaktozylodiacyllogliceroli należą kwas α -linolenowy, palmitynowy, oleinowy oraz stearynowy. Galaktozylowane diacyloglicerole stanowią najbardziej rozpowszechnioną grupę galaktolipidów w przyrodzie. W roślinach wyższych występują ich dwa główne typy: monogalaktozylodiacylloglicerol (MGDG) oraz digalaktozylodiacylloglicerol (DGDG). Razem z wymienionymi wyżej związkami występuje również sulfochinowozylodiacylloglicerol (SQDG), związek w którego cząsteczce występuje reszta siarczanowa. Ma on w fizjologicznym pH, w przeciwieństwie do obojętnych DGDG oraz MGDG, ładunek ujemny. Związki te wchodziły w skład tylakoidów chloroplastów i dowiedziono ich istotnego wpływu na prawidłowy przebieg procesu fotosyntezy. Należy zaznaczyć, iż w roślinach wyższych występować mogą także inne galaktozylowane diacyloglicerole takie jak trigalaktozylodiacylloglicerol (TriDGDG),

tetragalaktozylodiacylloglicerol (TetraDGDG) oraz ich estolidy – związki, w których grupy hydroksylowe hydroksykwasów tłuszczowych są dodatkowo zestryfikowane [65].



Rycina 3. Wzór ogólny galaktozylodiacyllogliceroli.

5.2. Aktywność galaktozylodiacyllogliceroli.

5.2.1. Aktywność cytotoksyczna oraz działanie przeciwnowotworowe.

Galaktozylodiacylloglicerole są związkami aktywnymi biologicznie. Liczne badania przeprowadzone zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* dowiodły ich działania przeciwnowotworowego. Za aktywność taką odpowiada nie tylko efekt cytotoksyczny, ale także zdolność tych związków do hamowania polimerazy DNA oraz procesu angiogenezy.

Frakcja glikolipidowa wyizolowana z liści szpinaku (*Spinacia oleracea*), zawierająca w swoim składzie m.in. DGDG oraz MGDG, wykazała aktywność cytotoksyczną wobec takich ludzkich linii komórek nowotworowych jak A549 (nowotwór płuc), BALL-1 (ostra białaczka limfoblastyczna B), HeLa (nowotwór jajnika), Molt-4 (ostra białaczka limfoblastyczna T), NUGC-3 (nowotwór żołądka). Zakres obliczonych wartości IC_{50} zamykał się w przedziale 58,5-81,7 $\mu\text{g/ml}$. Frakcja ta wykazała także aktywność cytotoksyczną wobec linii mysich komórek nowotworu jelita colon26, przy czym wartość IC_{50} wynosiła 74,5 $\mu\text{g/ml}$. Należy zauważyć także, iż podawanie frakcji bogatej w galaktozylowane acylloglicerole dożołądkowo myszom z wszczepionymi komórkami nowotworu jelita colon26 spowodowało zahamowanie wzrostu guza o 56,1% w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej roztwór PBS [66]. Dowiedziono również hamującego wpływu frakcji glikolipidów szpinaku zawierającej m.in. DGDG oraz MGDG na aktywność polimerazy DNA u ssaków. Najsilniej hamowane były polimerazy typu α , β i ϵ . Wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 44,1, 46,2 oraz 44,0 $\mu\text{g/ml}$. Dokładniejsze analizy wykazały, że za działanie to odpowiada w głównej mierze SQDG [67,68]. Matsubara i wsp. [69] wykazali, iż galaktozylodiacylloglicerole wyizolowane ze szpinaku mogą hamować również proces angiogenezy, co w zestawieniu z

wcześniejszymi doniesieniami na temat tych związków sugeruje, że związki te mogą w przyszłości okazać się użyteczne w terapii nowotworów.

5.2.2. Aktywność przeciwzapalna.

Dane literaturowe dowodzą, iż galaktozyliacyloglicerole posiadają aktywność przeciwzapalną. Aktywność ta wykazana została zarówno w eksperymentach przeprowadzonych *in vitro*, jak i *in vivo*. Mechanizm działania przeciwzapalnego tych związków obejmuje m.in. inhibicję cyklooksygenazy typu I i II, hamowanie chemotaksji neutrofilów oraz zapobieganie wyrzutowi reaktywnych form tlenu przez komórki układu odpornościowego (ang. oxidative burst). Na rynku farmaceutycznym dostępne są już preparaty przeciwzapalne, w skład których wchodzi surowce roślinne, bądź sporządzone z nich wyciągi bogate w galaktozyloglicerole.

Wspomnieć należy, iż stosowanym od lat, tradycyjnym lekiem o działaniu przeciwzapalnym w schorzeniach takich jak reumatyzm czy artretyzm jest sproszkowany owoc dzikiej róży (*Rosa canina*). Badania kliniczne dowiodły, iż środek ten skutecznie zmniejszał ból [70,71] oraz poprawiał sprawność ruchową pacjentów cierpiących na wymienione wyżej schorzenia [70]. W badaniach *in vitro* wykazano zdolność ekstraktu sporządzonego z owoców róży do hamowania chemotaksji leukocytów. Ekstrakt ten obniżał także poziom białka ostrej fazy CRP u zdrowych ochotników w badaniach *ex vivo* [72]. Określono również wpływ ekstraktów heksanowych oraz wodno-metanolowych sporządzonych m.in. z komercyjnych preparatów leczniczych, na aktywność cyklooksygenazy 1 i 2 w warunkach *in vitro*. Największą aktywność inhibicyjną wykazały ekstrakty heksanowe, dla których wartości IC_{50} wynosiły 22,9 $\mu\text{g/ml}$ (COX-1) i 10,4 $\mu\text{g/ml}$ (COX-2). Wyciągi wodno-metanolowe nie wykazały aktywności w tym teście. Ciekawym faktem jest, iż znacznie silniejszym działaniem cechowały się ekstrakty sporządzone z pseudoowocni róży pozbawionej nasion, co sugeruje, że właśnie tam związki aktywne występują w najwyższym stężeniu [73]. Badania strukturalne pozwoliły określić, iż związkiem aktywnym jest (2S)-1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-oktadeka-9,12,15-trieno]-3-O- β -D-galaktopiranozyloglicerol. Związek ten nazwany został galaktolipidem GOPO® [70,74]. Wykazano w badaniach *in vitro*, iż posiada on zdolność hamowania migracji neutrofilów, przy czym aktywność ta zależna jest od jego dawki. Wśród testowanych dawek 100, 50, 10, 1 i 0,1 $\mu\text{g/ml}$, najskuteczniejszą okazała się dawka 100 $\mu\text{g/ml}$, która hamowała migrację w 82% w stosunku do związku kontrolnego jakim był roztwór dimetylosulfotlenku (DMSO) o stężeniu 20000 $\mu\text{g/ml}$ [74]. Jak już wspomniano odkrycie, a następnie potwierdzenie aktywności przeciwzapalnej galaktolipidu GOPO zaowocowało wprowadzeniem na rynek preparatu handlowego ze sproszkowanego owocu dzikiej róży. Należy

jednak zaznaczyć, iż inne galaktolipidy, różniące się strukturalnie od GOPO również wykazują znaczną aktywność przeciwzapalną. Jako przykład podać można di-, mono- oraz sulfochinowozyliodiacylloglicerole wyizolowane z ciepłolubnego gatunku alg ETS-05, zasiedlającego lecznicze błota termalne we Włoszech. Związki te, w przeciwieństwie do galaktolipidu GOPO, w strukturze swojej cząsteczki posiadają zróżnicowane podstawniki acylowe, a do najczęściej występujących należą acyle kwasów stearynowego, palmitynowego, linolenowego oraz linolowego. Aktywność przeciwzapalna badana była z wykorzystaniem dwóch modeli zwierzęcych: obrzęku karageninowego łapy oraz obrzęku krotonowego ucha. Największą skuteczność działania w stosunku do związków kontrolnych (betametazon oraz indometacyna) wykazał MGDG, przy czym uzyskany efekt był zależny od dawki. Badane galaktozyliodiacylloglicerole były podawane podskórnie, w zakresie dawek 10-40 mg/kg masy ciała [75]. O aktywności przeciwzapalnej tego rodzaju związków donoszą też inni autorzy. Berge i wsp. [76] wykazali przeciwzapalne działanie SQDG wyizolowanego z czerwonych alg gatunku *Porphyridium cruentum*, Manez i wsp. [77] z kolei w badaniach *in vivo* dowiedli aktywności przeciwzapalnej inugalaktolipidu (rodzaj DGDG) wyizolowanego z gatunku *Inula viscosa*. W USA ochronie patentowej podlegają formułacje opracowane z pewnych gatunków zielonych alg, jak np. *Chlorella minutissima*, *Chaetoceros gratillii*, *Cyclotella cryptica* czy *Isochrysis galbana*, zawierające w swoim składzie od 35 do 100% monogalaktozyliodiekozapentaenoiloglicerolu, o działaniu przeciwzapalnym oraz fotoprotekcyjnym. Skuteczność ich działania potwierdzona została w badaniach na zwierzętach [78]. Najnowsze badania przeprowadzone przez Ulivi i wsp. [79] wykazały, że przeciwzapalne działanie MGDG może być również mediowane poprzez indukcję ekspresji COX-2, której produkt, 15-deoksy- Δ 12,14 prostaglandyna I₂, silnie hamuje działanie takich czynników prozapalnych jak IL-6 i IL-8.

5.2.3. Inne profile aktywności galaktozyliodiacyllogliceroli.

Badania wykazały, że galaktozyliodiacylloglicerole posiadają również inne profile działania, wśród których wymienić należy głównie aktywność przeciwbakteryjną i hemolityczną, a także zdolność do hamowania takich enzymów jak telomeraza czy syntaza lanosterolowa.

Monogalaktozyliodiacylloglicerol wyizolowany z gatunku *Carpobrotus edulis* wykazał aktywność przeciwbakteryjną względem takich bakteryjnych patogenów człowieka jak szczepy *S. aureus* HPV 107 oraz MRSA COL_{oxa} (oporny na oksacylinę). Wartości MIC w obu przypadkach wynosiły 50 mg/l [79]. Parrish i wsp. [81] donoszą o hemolitycznej aktywności MGDG i DGDG zawartych w wyciągach z trującego gatunku alg *Gymnodinium mikimotoi*. Aktywność ta związana

może być z obecnością w cząsteczkach tych związków kwasu tłuszczowego 18:5 ω 3. Badania przeprowadzone przez Sakano i wsp. [82] wykazały, że mono- oraz digalaktozyldiacyloglicerole wyizolowane z etanolowych wyciągów z gatunków *Colocasia esculenta* (taro) mają zdolność do hamowania aktywności ludzkiej syntazy lanosterolowej. Badania przeprowadzone zostały *in vitro*, dla dawki 300 μ g/ml. Najwyższą aktywność (67%) wykazał DGDG zawierający w swojej cząsteczce dwa acyle kwasu linolowego oraz MGDG, zawierający w swej cząsteczce dwa acyle kwasu linolenowego. Inhibicja syntazy lanosterolowej, która bierze udział w syntezie cholesterolu w organizmie człowieka, może być jednym ze sposobów prowadzących do zmniejszenia ilości cholesterolu we krwi. Na uwagę zasługują również badania przeprowadzone przez Eitsuke i wsp. [83], którzy wykazali, iż SQDG wyizolowany z gatunku *Porphyra yezoensis*, ma zdolność hamowania aktywności ludzkiej telomerazy – enzymu rybonukleoproteinowego odpowiedzialnego za dobudowanie brakującego końca 3'-5' nici DNA (tzw. problem replikacji końca). W celu określenia wpływu SQDG na aktywność telomerazy wykorzystano technikę PCR, a obliczona wartość IC₅₀ wynosiła 22 μ M. MGDG oraz DGDG nie wykazały aktywności względem tego enzymu. Związki, zdolne do hamowania działania telomerazy, mogą okazać się skutecznymi środkami przeciwnowotworowymi.

5.3. Badania ilościowe galaktozyldiacylogliceroli.

Ilościowe oznaczenia mono- oraz digalaktozyldiacylogliceroli, jak również niektórych innych lipidów w materiale roślinnym zwykle wykonywane są z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Oznaczenia można wykonać stosując gradient stężeń lub elucję izokratyczną. Wang i wsp. [84] dokonali ilościowego oznaczenia zawartości MGDG izokratycznie wykorzystując metodę HPLC z fazą ruchomą metanol:woda:aceton, 98:2:1 (kolumna YMC Pack Pro C18, 75x4,6 mm). Sugawara i wsp. [85] dokonali pełnego rozdziału oraz ilościowego oznaczenia galaktozyldiacylogliceroli w materiale roślinnym uzyskanym z 48 roślin jadalnych za pomocą chromatografu HPLC wyposażonego w detektor ELSD. W badaniu wykorzystano kolumnę LiChrospher Si 60 (5 μ m, 125x4 mm, i.d. Merck). Fazę ruchomą stanowił chloroform (rozpuszczalnik A) oraz układ metanol:woda w stosunku 95:5 v/v (rozpuszczalnik B). Przepływ wynosił 1 ml/min. Elucja przeprowadzana była gradientowo. Ilość rozpuszczalnika A malała od 99 do 10% w ciągu 25 minut, a następnie osiągała 99% w 30. minucie, podczas gdy ilość rozpuszczalnika B rosła od 1 do 99% w ciągu 25 minut, a następnie osiągała 1% w 30. minucie. Niewątpliwą zaletą opisywanej metody jest fakt, iż analizie HPLC poddać można gotowy wyciąg sporządzony metodą Folscha, bez konieczności dodatkowego frakcjonowania. Yunoki i wsp. [86]

rozszerzyli możliwość wykorzystania metody także do oznaczenia SQDG – związku, którego cząsteczka w przeciwieństwie do neutralnych MGDG i DGDG, posiada ładunek ujemny. W metodzie wykorzystano chromatograf HPLC wyposażony w detektor ELSD, kolumnę LiChrospher 100 Diol (5 μ m, 250x4 mm i.d. Merck) wraz z prekolumną LiChroCART 4-4. Fazę ruchomą stanowił chloroform (rozpuszczalnik A) oraz układ metanol:aceton:woda:kw. octowy 30:60:9:1 v/v/v (rozpuszczalnik B). Elucja przeprowadzana była gradientowo. Ilość rozpuszczalnika A malała od 100 do 0% w ciągu 17 minut, a następnie osiągała 100% w 20. minucie, podczas gdy ilość rozpuszczalnika B wzrastała od 0 do 100% w ciągu 17 minut, a następnie osiągała 0% w 20. minucie. Przepływ wynosił 0,9 ml/min. Zaletą metody zaproponowanej przez Yunoki i wsp. jest możliwość oznaczenia zawartości SQDG techniką HPLC z wykorzystaniem podwójnego gradientu. Zawartość MGDG, DGDG oraz SQDG w surowcu roślinnym można oznaczyć także wykorzystując metodę densytometryczną opisywaną przez Kuriyamę i wsp. [68]. Związki te ulegają dobremu rozdzielaniu na płycie TLC i można je łatwo uwidocznić za pomocą roztworu kwasu siarkowego. Powstałe plamy barwne poddaje się analizie densytometrycznej.

6. Cel i założenia pracy.

Przymiotno kanadyjskie (*Erigeron canadensis* L. Cronq) jest popularną rośliną leczniczą wykorzystywaną w medycynie tradycyjnej m.in. jako środek przeciwkrwotoczny i przeciwzapalny. Niektóre źródła donoszą także o jego pozytywnym wpływie na poziom płytek krwi. Nie istnieją jednak praktycznie żadne badania, które potwierdzałyby przeciwkrwotoczne działanie surowca, a skuteczność jego stosowania opiera się wyłącznie na wskazaniach tradycyjnych. Nie rozwiązany pozostaje także problem jaki surowiec działać może korzystniej: świeży czy suszony. Tylko jedno doniesienie literaturowe opisuje przeciwzapalne działanie wyciągów z suszonego zieleń przymiotna, nie ma jednak żadnych wzmianek na temat działania surowca świeżego. Badania nad zieleń przymiotna kanadyjskiego prowadzone były w Katedrze Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie z przerwami od 1997 r. Wykazały one różnice w składzie chemicznym pomiędzy wyciągiem z surowca świeżego stabilizowanego oraz suszonego. Wyniki tych badań zaowocowały nie tylko dużym zainteresowaniem rośliną, ale także pomysłem na ich kontynuowanie oraz rozszerzenie.

Podstawowymi zamierzeniami niniejszej pracy było fitochemiczne porównanie wyciągów z surowca świeżego stabilizowanego i suszonego oraz weryfikacja tradycyjnych wskazań do stosowania surowca. Badania jakie przeprowadzono w celu realizacji tych zamierzeń obejmowały:

1. Porównawczą analizę chromatograficzną wyciągów z surowca świeżego stabilizowanego oraz suszonego, izolację i identyfikację dominujących związków różnicujących oba surowce, określenie zmian dynamiki kumulacji tych związków w różnych stadiach wegetacyjnych rośliny.
2. Określenie wpływu wyciągów na wskaźniki hematologiczne krwi oraz zjawisko emperipolezy w szpiku kostnym w badaniu przeprowadzonym *in vivo*.
3. Określenie aktywności przeciwzapalnej wyciągów oraz związków wyizolowanych w oparciu o test denaturacji albumin.
4. Określenie aktywności cytotoksycznej wyciągów oraz związków wyizolowanych względem szczurzych komórek nowotworowych prostaty linii AT-2, ludzkich komórek nowotworowych prostaty linii DU145 i PC3 oraz prawidłowych komórek nabłonka prostaty linii PNT-2.

II. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

7. Materiał i metody.

7.1. Chromatografia cienkowarstwowa, preparatywna, kolumnowa oraz średniociśnieniowa chromatografia kolumnowa (MPLC).

fazy stacjonarne:

płytki chromatograficzne, pokryte żel krzemionkowym Kieselgel 60, 20x20 cm, Merck

płytki do chromatografii preparatywnej, pokryte żel krzemionkowym G, grubość warstwy 500 µm, 20x20 cm, Analtech, Sigma

żel do chromatografii kolumnowej, rozmiar cząstek 0,040-0,063, Merck

żel do chromatografii kolumnowej, rozmiar cząstek 0,015-0,025, Merck

fazy ruchome:

chloroform:metanol:kw. octowy 1% 40:10:1

odczynnik wywołujący:

25% metanolowy roztwór kwasu siarkowego (VI)

rozpuszczalniki i odczynniki:

chloroform cz.d.a., Chempur

metanol cz.d.a., Chempur

lodowaty kw. octowy cz., 99,5%, Chempur

kw. siarkowy cz., 95%, Chempur

7.2. Wzorce.

digalaktozylodiacylglicerol (DGDG), Grade 2, Lipid Products, UK

monogalaktozylodiacylglicerol (MGDG), Grade 2, Lipid Products, UK

7.3. Analiza spektralna.

chloroform-D¹ deuteration degree min. 99,8% for NMR spectroscopy, Merck

7.4. Test denaturacji albumin (albumin denaturation assay).

albumina bydlęca (BSA), 98%, A7906, Sigma-Aldrich

probówki okrągłodenne z polipropylenu, Equimed

korki do probówek z polipropylenu, Equimed

7.5. Zwierzęta.

Szczury Wistar, samce, 60 sztuk, Zwierzętnia Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie.

7.6. Linie komórkowe.

szczurza linia komórkowa nowotworu prostaty AT-2

ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty o umiarkowanym stopniu złośliwości DU145

ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty o wysokim stopniu złośliwości PC3

ludzka prawidłowa linia komórkowa nabłonka prostaty PNT-2

7.7. Pożywki do hodowli komórkowych.

dla linii komórkowych DU145 i PC3:

DMEM F12 (Dulbeco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12), Sigma-Aldrich

dla linii komórkowych PNT-2 i AT-2:

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium), Sigma-Aldrich

7.8. Odczynniki oraz materiały do hodowli komórkowych.

7.8.1. Odczynniki do hodowli komórkowych.

sól fizjologiczna PBS z jonami wapnia i magnezu (Phosphate Buffered Saline with calcium chloride and magnesium chloride), Sigma-Aldrich

sól fizjologiczna PBS bez jonów wapnia i magnezu (Phosphate Buffered Saline without calcium chloride and magnesium chloride), Sigma-Aldrich

bydłęca surowica płodowa (foetal bovine serum), Sigma-Aldrich

antybiotyki: penicilin-streptomycin-neomycin solution stabilised, Sigma-Aldrich

0,25 % roztwór trypsyny z EDTA, Sigma-Aldrich

zestaw do oznaczania cytotoksyczności LDH, Clontech, Immunogen

7.8.2. Materiały do hodowli komórkowych.

naczynia hodowlane 25 i 75 cm², Polgen

probówki jednorazowe 15 oraz 50 ml, Polgen

płytki wielodołkowe (24-dołkowe), Polgen

7.9. Aparatura badawcza.

- a) średniociśnieniowy chromatograf cieczowy (MPLC) Büchi SEPACORE, z kontrolerem pomp C-615, systemem pomp C-605 oraz kolektorem frakcji C-660
- b) densytometr CAMAG TLC Scanner 3 z oprogramowaniem winCats 1.3.4 oraz aplikatorem próbek LINOMAT V
- c) aparat NMR OXFORD NMR 300
- d) inkubator do hodowli komórkowych LAB-LINE, z atmosferą 5% CO₂
- e) mikroskop odwrócony HUND WETZLAR
- f) wielodetekcyjny czytnik płytek SYNERGY HT BIOTEK z oprogramowaniem Gen5
- g) analizator hematologiczny HORIBA ABX Micros 60 OT
- h) chromatograf gazowy TRACE GC ULTRA Thermo Electron Corporation z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID)
- i) spektrometr masowy FINNIGAN MAT 95

8. Surowiec do badań.

Materiał do badań stanowiło świeże oraz suszone ziele przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L. Cronq) zebrane z ekologicznego stanowiska w okolicach Ustronia k. Cieszyna. Próbki surowca przechowywane są w herbarium Katedry Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie. Surowiec suszony przechowywany był w miejscu zacienionym i przewiewnym, w papierowych torbach. Surowiec świeży poddany został stabilizacji wrzącym metanolem bezpośrednio po zbiorze.

9. Analiza jakościowa.

9.1. Ekstrakcja surowca.

- a) Na wadze technicznej odważono około 300 g rozdrobnionego surowca suszonego, który umieszczono w kolbie okrągłodennej i ekstrahowano 800 ml metanolu pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Procedurę powtórzono 3 razy. Uzyskane wyciągi połączono oraz zagęszczono do sucha i wykorzystano do przeprowadzenia wstępnej analizy jakościowej.
- b) Na wadze technicznej odważono około 300 g rozdrobnionego surowca świeżego, który umieszczono w kolbie okrągłodennej i zalano wrzącym metanolem w celu unieczynnienia naturalnie występujących enzymów (stabilizacji). Uzyskany wyciąg zagęszczono do sucha i

wykorzystano do przeprowadzenia analizy jakościowej.

9.2. Porównawcza analiza jakościowa wyciągów metodą TLC.

Warunki:

faza stacjonarna: płytki chromatograficzne Kieselgel 60

faza ruchoma: układ chloroform:metanol:kwasy octowy 1%, 40:10:1

odczynnik wywołujący: 25% metanolowy roztwór kwasu siarkowego (VI)

Wykonanie:

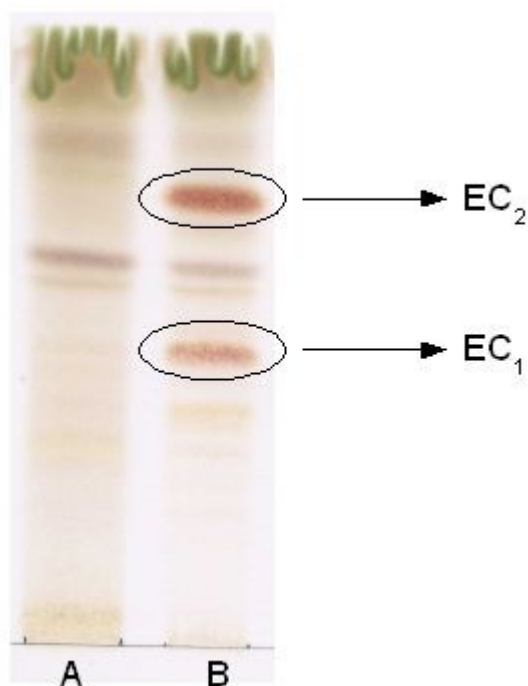
Na płytkę chromatograficzną naniesiono za pomocą kapilary pasmowo odpowiednio przygotowane wyciągi z przymiotna kanadyjskiego. Chromatogram rozwijano w fazie ruchomej.

Po rozwinięciu chromatogram wysuszono i obserwowano w świetle widzialnym, a następnie wywoływano odczynnikiem wywołującym. Po wywołaniu chromatogram obserwowano w świetle widzialnym oraz świetle UV 254 i 365 nm.

Wyniki:

Na chromatogramie (Rycina 4) w wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego (B), zaobserwowano dwie plamy nieobecne w wyciągu z surowca suszonego (A). Związkom odpowiadającym tym plamom nadano wstępne nazwy EC₁ i EC₂.

- a) związek EC₁ (R_f 0,48), niewidoczny w świetle widzialnym, w świetle UV wygaszający fluorescencję, po wywołaniu plama barwy czerwonej w świetle widzialnym, w świetle UV dająca pomarańczową fluorescencję,
- b) związek EC₂ (R_f 0,8), niewidoczny w świetle widzialnym, w świetle UV wygaszający fluorescencję, po wywołaniu plama barwy czerwonej w świetle widzialnym, w świetle UV dająca pomarańczową fluorescencję.



Rycina 4. Chromatogram wyciągu metanolowego z surowca suszonego (A) oraz surowca świeżego stabilizowanego (B). Widoczne związki EC₁ i EC₂.

9.3. Izolacja związku EC₁ i EC₂ z zastosowaniem MPLC.

Warunki:

faza stacjonarna: żel krzemionkowy LiChroprep Si 60, 15-25 μm (1.09336.1000, Merck)

standardowa kolumna MPLC 12/150 (45.850.001, Büchi)

faza ruchoma: chloroform:metanol:kwas octowy 1%, 40:10:1

przepływ: 3,0 ml/min

objętość frakcji: 4,0 ml

czas rozdziału: 120 min

Wykonanie:

Zagęszczony wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego rozpuszczono w niewielkiej ilości fazy ruchomej i poddano rozdzielowi metodą MPLC.

Wyniki:

Uzyskano wstępnie oczyszczone związki EC₁ i EC₂. Konieczne było dalsze oczyszczenie wyizolowanych związków.

9.4. Oczyszczanie związków EC₁ i EC₂ z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej pTLC.

Warunki:

faza stacjonarna: płytki chromatograficzne Silica Gel G, 20x20 cm, grubość warstwy 500 µm (Z512990, Analtech)

faza ruchoma: chloroform:metanol:kwasy octowe 1%, 40:10:1

Wykonanie:

Na płytki nałożono pasmowo wstępnie oczyszczone związki EC₁ i EC₂, a następnie rozwijano w fazie ruchomej. Po rozwinięciu chromatogramy wysuszono i częściowo wywołano w celu identyfikacji lokalizacji badanych związków. Pasma żelu zawierające związki EC₁ i EC₂ zeszkrobano do szklanych zlewek o pojemności 25 ml i trzykrotnie eluowano metanolem. Po odsączeniu połączono zebrane eluaty i odparowano do sucha.

Wyniki:

Uzyskano po 20 mg oczyszczonych związków EC₁ i EC₂.

9.5. Identyfikacja wyizolowanych związków metodami spektralnymi.

W celu identyfikacji związków EC₁ i EC₂ poddano je analizie spektralnej metodami ¹H NMR, ¹³C NMR oraz FAB MS.

9.5.1. ¹H i ¹³C NMR.

Analizę spektralną ¹H i ¹³C NMR wykonano w Pracowni Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie. Próbkę do badań rozpuszczono w deuterowanym chloroformie.

Wyniki:

Analiza wykonanych widm ¹H i ¹³C NMR wykazała obecność sygnałów

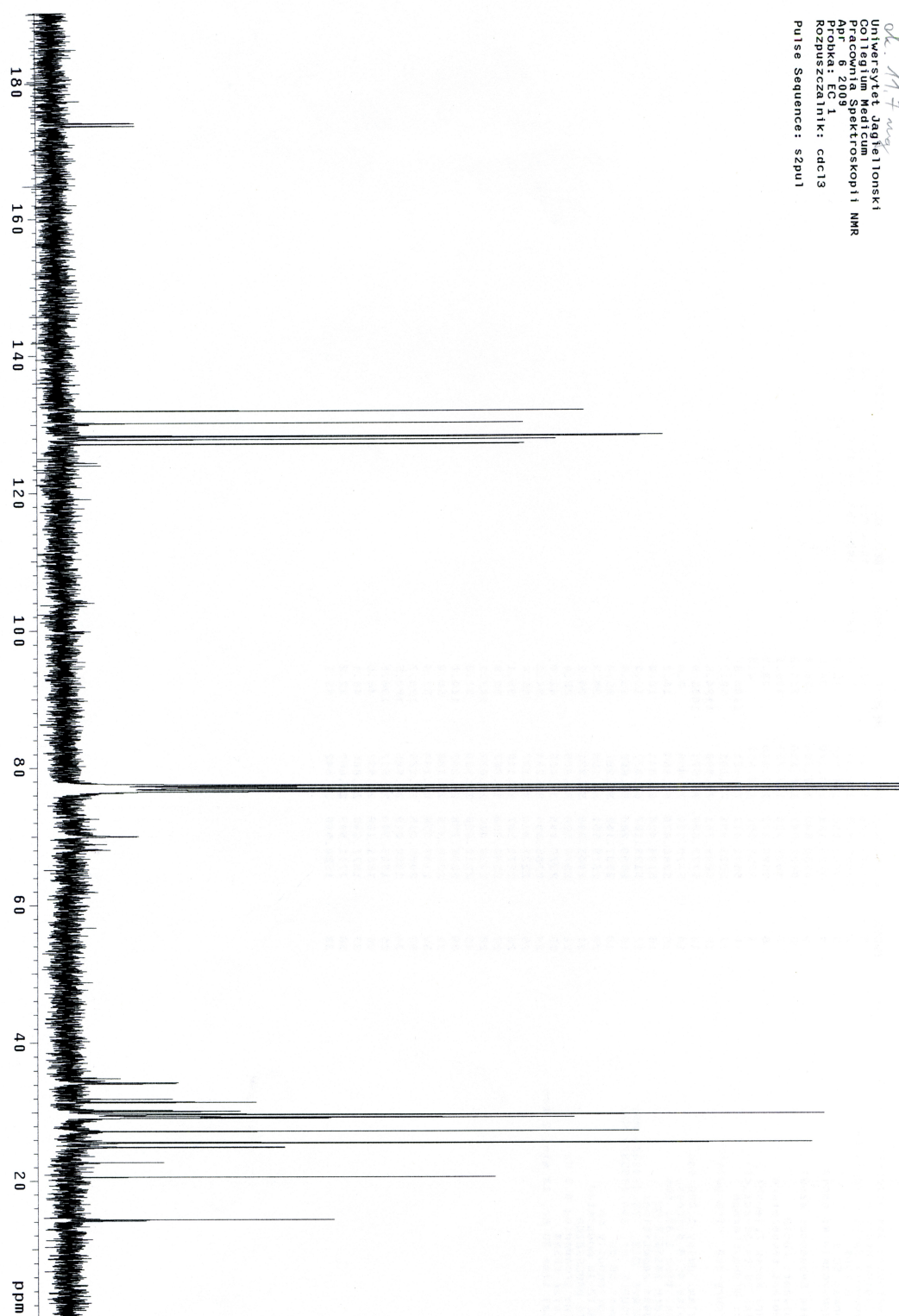
charakterystycznych dla związków z grupy galaktozylodiacylgliceroli. Zostało to potwierdzone w zestawieniu tych sygnałów z danymi literaturowymi dotyczącymi typowych przedstawicieli tej grupy związków: mono- oraz digalaktozylodiacylglicerolu [82]. Zestawienie sygnałów ^{13}C i ^1H NMR wyizolowanego związku EC_1 z danymi literaturowymi przedstawia tabela 2 i 3. Widmo ^{13}C NMR wyizolowanego związku EC_1 przedstawia rycina 5, natomiast widmo ^1H NMR rycina 6. Zestawienie sygnałów wyizolowanego związku EC_2 z danymi literaturowymi przedstawia tabela 4 i 5. Widmo ^{13}C NMR wyizolowanego związku EC_2 przedstawia rycina 7, natomiast widmo ^1H NMR rycina 8.

Tabela 2. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR dla wyizolowanego związku EC_1 z danymi literaturowymi dla digalaktozylodiacylglicerolu (DGDG).

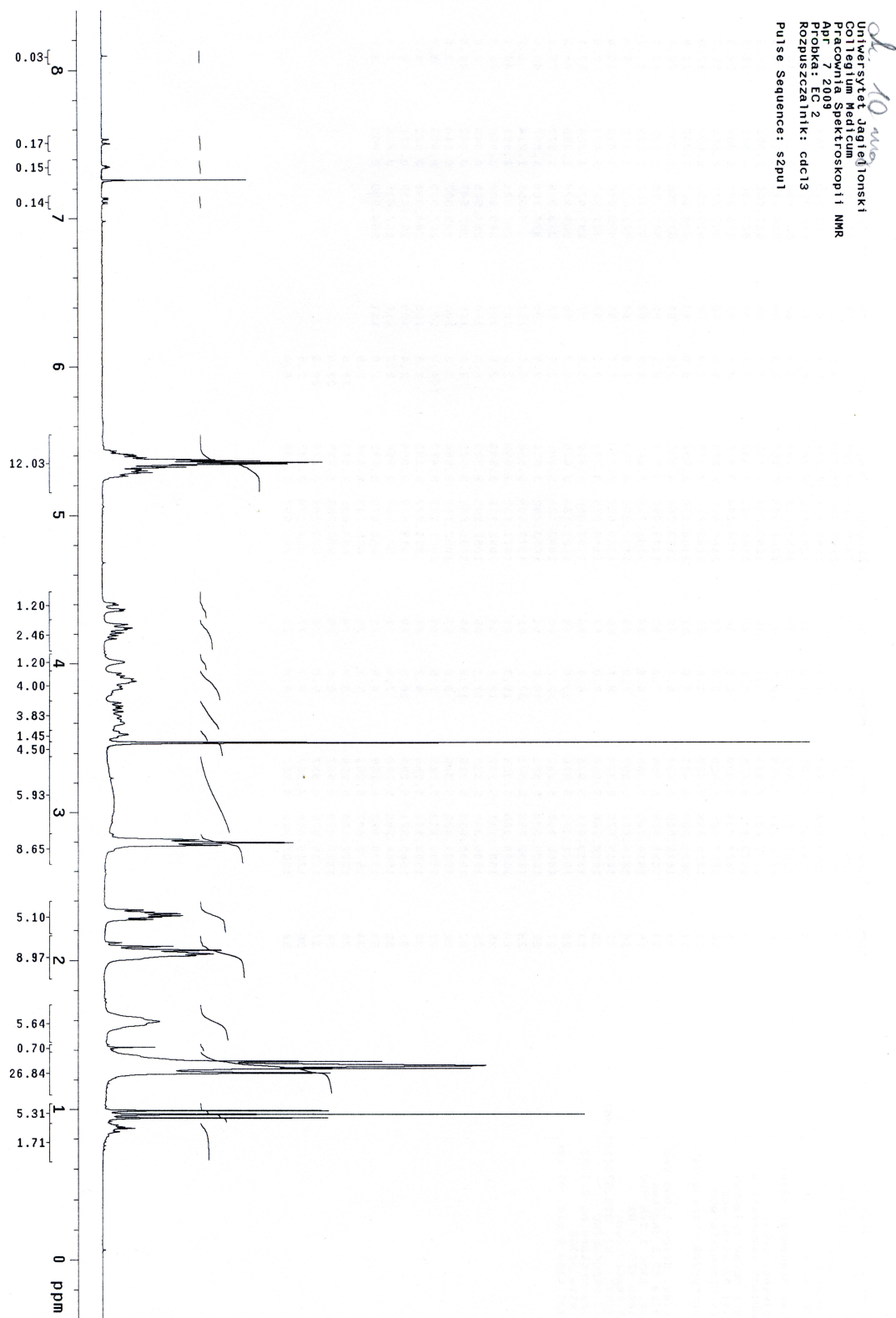
Atom węgla	DGDG dane literaturowe [82] δ [ppm]	DGDG wyizolowany δ [ppm]
-CH ₃	14,6	14,10 14,26
-CH ₂ -	21,1 23,2 25,5 26,0 27,7 29,7 29,8 29,9 30,2 32,4 34,6 34,8	20,52 22,67 24,85 25,59 27,1 29,20 29,59 29,67 30,17 31,5 34,25 34,85
-HCO-	71,0	69,9
-CH=CH-	127,7 128,3 128,5 128,6 128,7 128,8 130,4 130,6 130,7 132,4	127,09 127,75 127,86 128,06 128,20 128,29 128,96 130,19 131,94
-CO-	174,3 174,6	173,49 173,83

Tabela 3. Zestawienie sygnałów ^1H NMR dla wyizolowanego związku EC_1 z danymi literaturowymi dla digalaktozylodiacylglicerolu (DGDG).

Atom wodoru	DGDG dane literaturowe [82] δ [ppm]	DGDG wyizolowany δ [ppm]
2x -CH ₃ (6H)	0,98	0,96
2x -CO-CH ₂ -CH ₂ (4H)	1,62	1,60
2x -CO-CH ₂ -CH ₂ (4H)	2,33	2,25
6x -CH=CH- (12H)	5,29 – 5,39	5,29 – 5,41



Rycina 5. Widmo ^{13}C NMR wyizolowanego związku EC_1 .



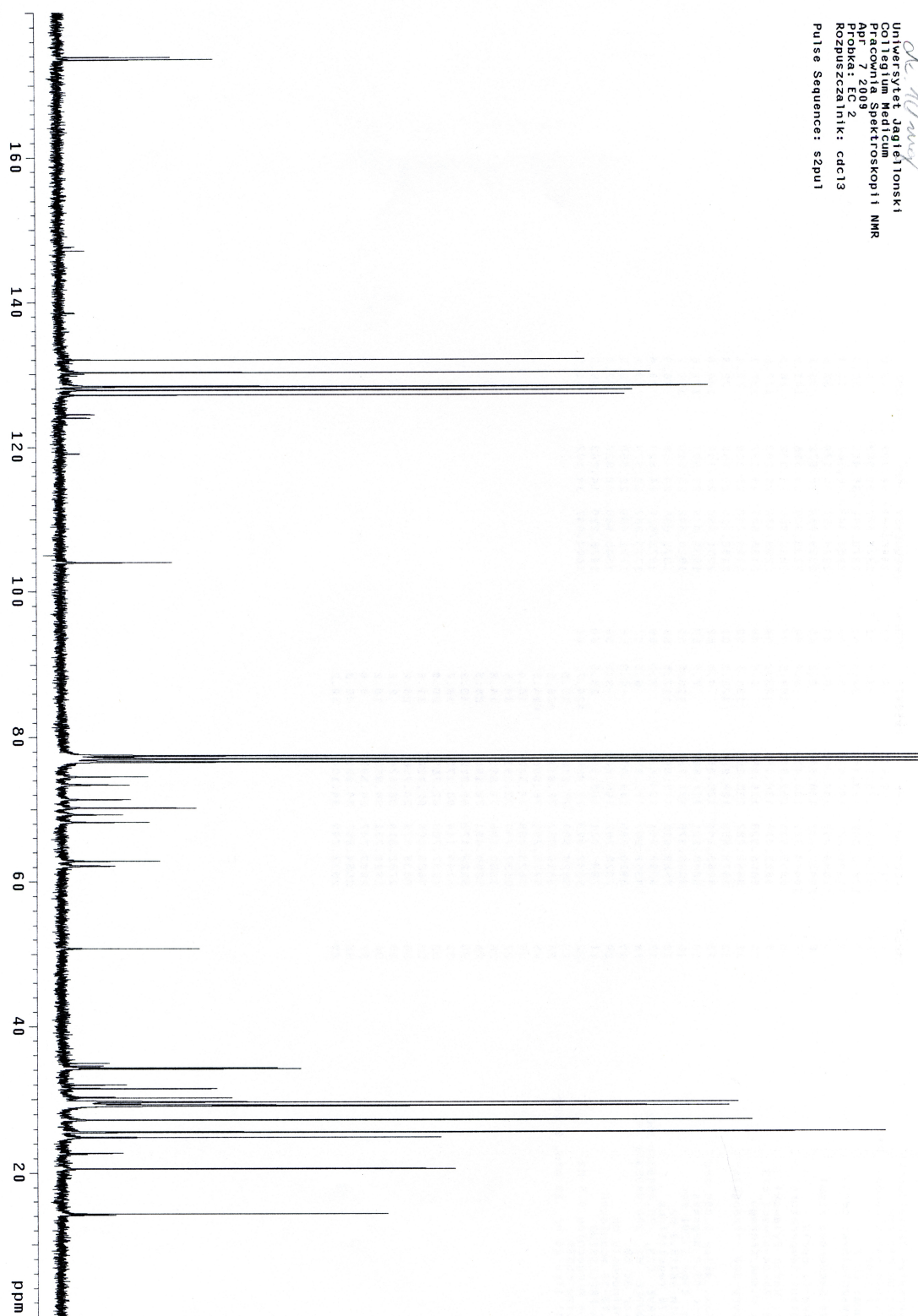
Rycina 6. Widmo ^1H NMR wyizolowanego związku EC₁.

Tabela 4. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR wyizolowanego związku EC_2 z danymi literaturowymi dla monogalaktozylodiacylglicerolu (MGDG).

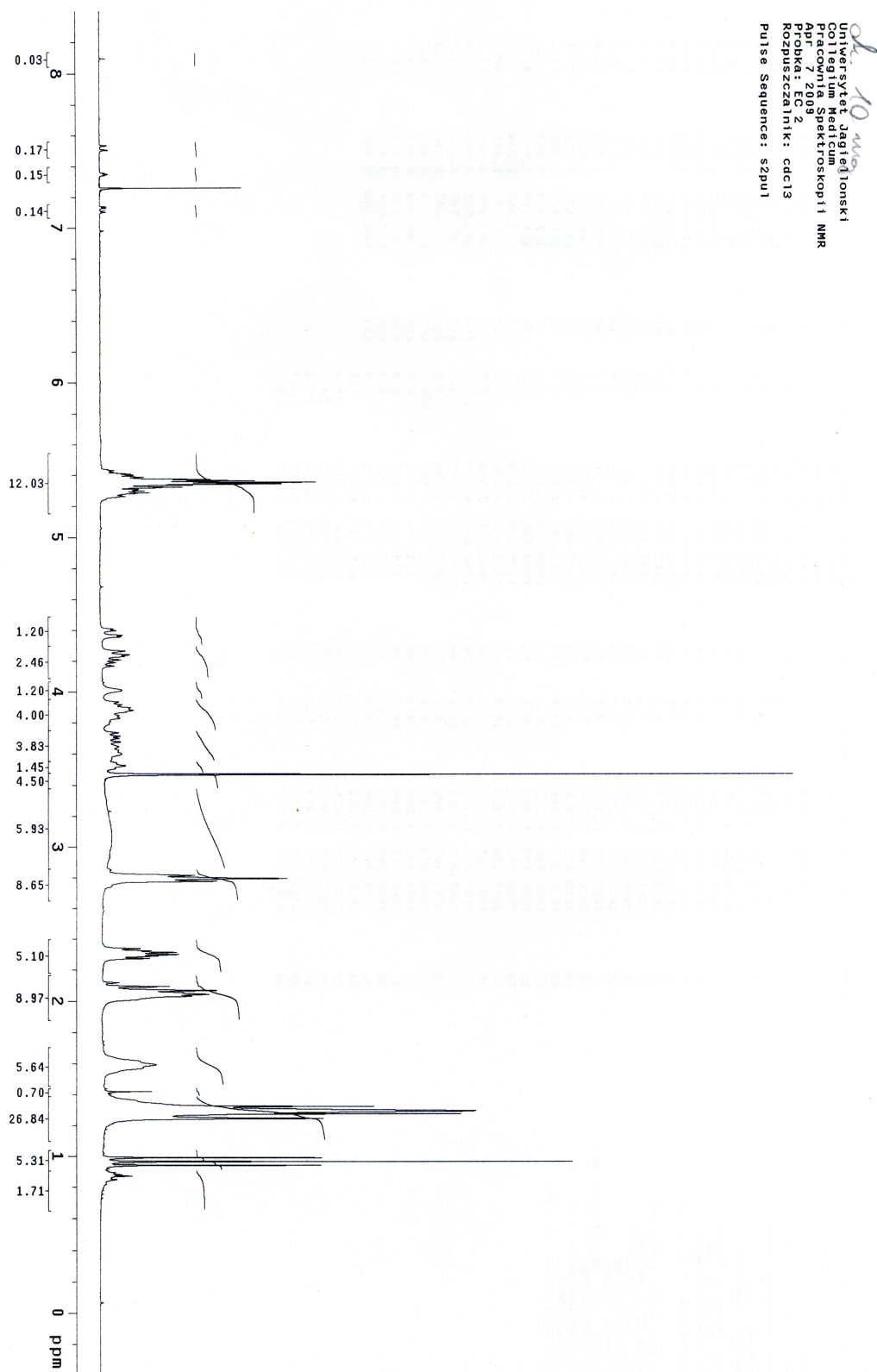
Atom węgla	MGDG dane literaturowe [82] δ [ppm]	MGDG wyizolowany δ [ppm]
$-\text{CH}_3$	14,3	14,26
$-\text{CH}_2-$	20,6 24,9 25,5 25,6 27,2 29,1 29,2 29,6 34,1 34,3	20,52 24,82 25,51 25,59 27,19 29,1 29,13 29,59 34,1 34,25
$-\text{CH}_2\text{O}-$	62,9	62,7
$-\text{HCO}-$	70,1	70,1
$-\text{CH}=\text{CH}-$	127,1 127,8 128,2 128,3 129,92 130,2 131,9	127,09 127,75 128,2 128,29 129,96 130,19 131,94
$-\text{CO}-$	173,4 173,8	173,49 173,83

Tabela 5. Zestawienie sygnałów ^1H NMR wyizolowanego związku EC_2 z danymi literaturowymi dla monogalaktozylodiacylglicerolu (MGDG).

Atom wodoru	MGDG dane literaturowe [82] δ [ppm]	MGDG wyizolowany δ [ppm]
2x $-\text{CH}_3$ (6H)	0,98	0,96
2x $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ (4H)	1,60	1,61
2x $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ (4H)	2,31	2,33
6x $-\text{CH}=\text{CH}-$ (12H)	5,30 – 5,40	5,29 – 5,41



Rycina 7. Widmo ^{13}C NMR wyizolowanego związku EC_2 .



Rycina 8. Widmo ^1H NMR wyizolowanego związku EC_2 .

9.5.2. FAB MS

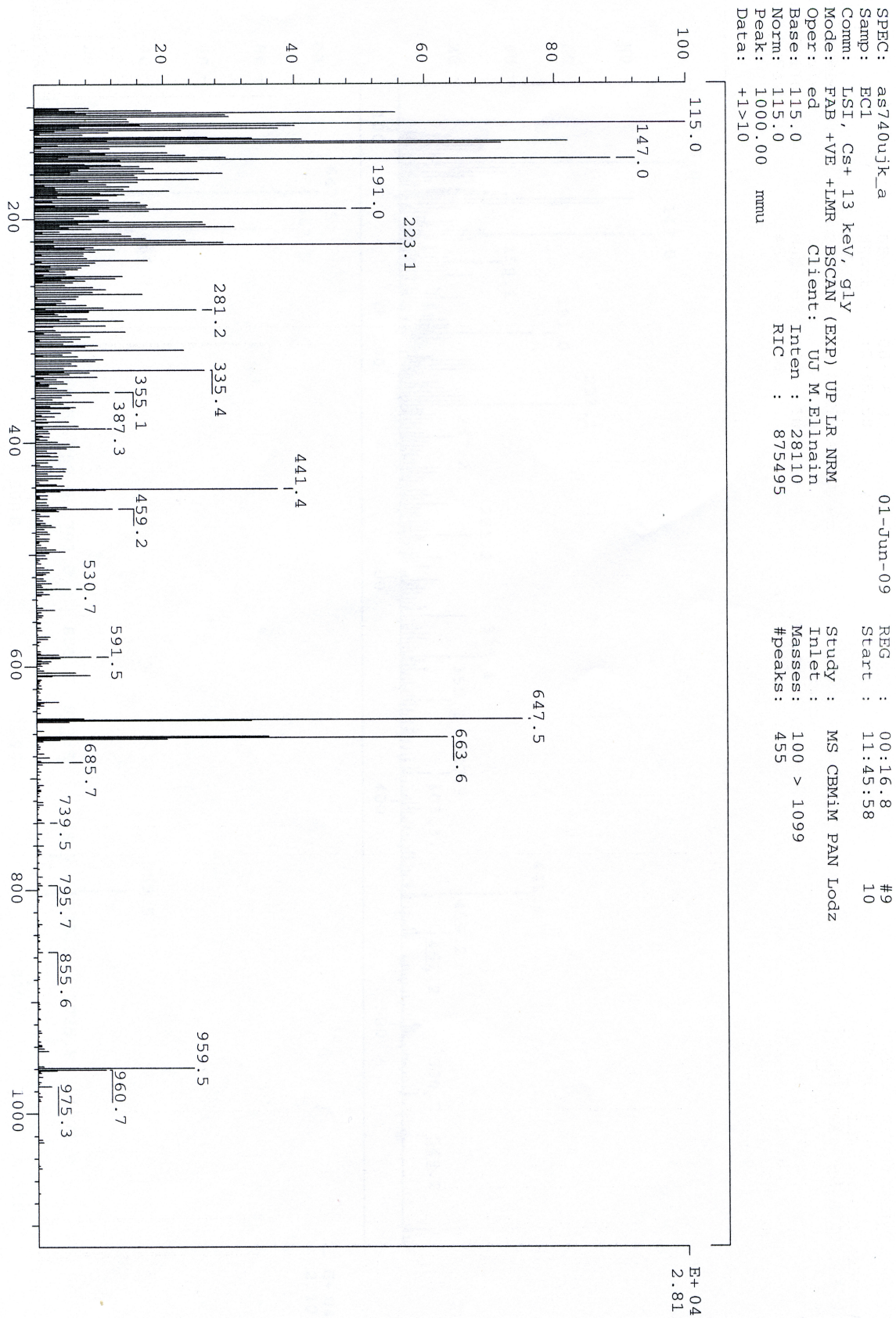
Analizę spektralną FAB MS wykonano w Pracowni Spektroskopii Masowej Środowiskowego Laboratorium Analizy Związków Organicznych i Polimerów w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Analizie poddano wyizolowane związki EC₁ i EC₂.

Wyniki:

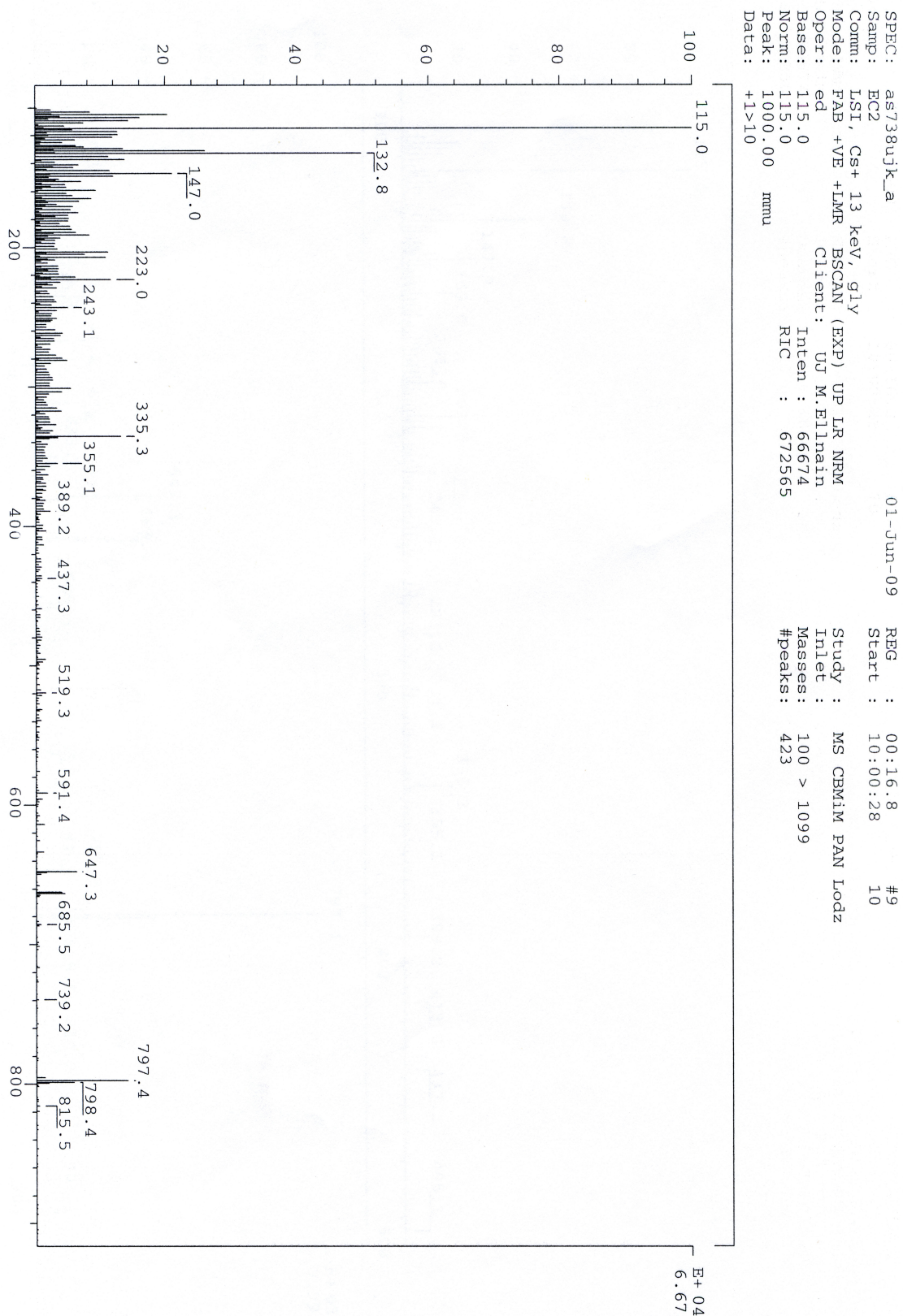
Ustalono masy wyizolowanych związków EC₁ i EC₂. Masy związków badanych były zgodne z danymi literaturowymi dla mono- oraz digalaktozyloglicerolu [82], a także z przeprowadzonymi wcześniej obliczeniami teoretycznymi. Zestawienie mas obliczonych oraz uzyskanych doświadczalnie związków badanych wraz z wzorami sumarycznymi przedstawiono w tabeli 6. Widma FAB MS związków EC₁ oraz EC₂ przedstawia rycina 9 i rycina 10.

Tabela 6. Zestawienie mas uzyskanych doświadczalnie oraz obliczonych teoretycznie i wzorów sumarycznych badanych związków EC₁ oraz EC₂.

Związek	Masa obliczona	Masa FAB MS m/z [M ⁺ +Na]	Wzór sumaryczny
EC ₁	936	959,5	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₅
EC ₂	774	797,4	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀



Rycina 9. Widmo FAB MS wyizolowanego związku EC₁.



Rycina 10. Widmo FAB MS wyizolowanego związku EC₂.

9.6. Określenie profilu kwasów tłuszczowych wyizolowanych związków EC₁ i EC₂ metodą chromatografii gazowo-cieczowej.

Warunki:

faza stacjonarna: kolumna Supelcowax 10, 0,25 µm (30 m x 0,25 mm)

faza ruchoma: gaz nośny Hel (18 psi)

objętość nastrzyku: 1 µl

wzorzec: standardowa mieszanina estrów polinienasyconych kwasów tłuszczowych

Wykonanie:

Wyizolowane związki EC₁ i EC₂ poddano transestryfikacji, którą przeprowadzono zgodnie z metodą AOAC Official Method 991,39 [87]. Do komory iniekcyjnej chromatografu wstrzyknięto 1 µl badanej próbki.

Wyniki:

Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w związkach wyizolowanych przedstawiono w tabeli 7 i 8.

Tabela 7. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w wyizolowanym związku EC₁.

Kwas tłuszczowy	% zawartości w związku EC ₁
α -linolenowy C-18:3 n-3	56,499
linolowy C-18:2 n-6	15,606
palmitynowy C-16:0	12,645
heptadekanowy C-17:0	3,702
oleinowy C-18:1 n-9	3,417
oktadekanowy C-18:0	2,133
inne kwasy tłuszczowe w ilości poniżej 1%	

Tabela 8. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w wyizolowanym związku EC₂.

Kwas tłuszczowy	% zawartości w związku EC ₂
α -linolenowy C-18:3 n-3	89,42
linolowy C-18:2 n-6	3,711
palmitynowy C-16:0	2,399
inne kwasy tłuszczowe w ilości poniżej 1%	

9.7. Potwierdzenie tożsamości wyizolowanych związków metodami chromatograficznymi (TLC, HPLC) poprzez porównanie z wzorcami.

9.7.1. Porównawcza analiza TLC wyciągów metanolowych oraz wyizolowanych z nich związków z komercyjnie dostępnymi wzorcami galaktozylodiacyllogliceroli.

W celu potwierdzenia tożsamości wyizolowanych związków przeprowadzono ich porównawczą analizę TLC wraz z wzorcami mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerolu.

Warunki:

faza stacjonarna: płytki chromatograficzne Kieselgel 60

faza ruchoma: układ chloroform:metanol:kwasy octowe 1%, 40:10:1

wzorce: digalaktozylodiacylloglicerol (DGDG), monogalaktozylodiacylloglicerol (MGDG)

odczynnik wywołujący: 25% metanolowy roztwór kwasu siarkowego (VI)

Wykonanie:

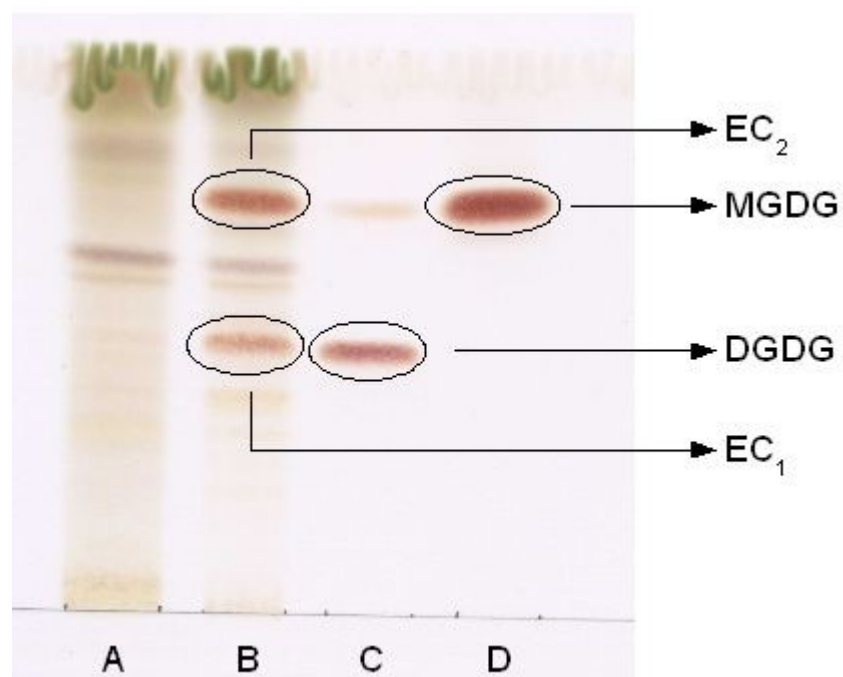
Na płytkę chromatograficzną naniesiono za pomocą kapilary pasmowo odpowiednio przygotowane wyciągi z przysuszonego kanadyjskiego oraz chloroformowo-metanolowe (2:1) roztwory substancji wzorcowych. Chromatogram rozwijano w fazie ruchomej.

Po rozwinięciu chromatogram wysuszono i obserwowano w świetle widzialnym, a następnie wywoływano odczynnikiem wywołującym. Po wywołaniu chromatogram obserwowano w świetle widzialnym oraz świetle UV 254 i 365 nm.

Wyniki:

Na chromatogramie (Rycina 11) w wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego (B), zaobserwowano dwie plamy odpowiadające kolorem i wartością R_f plamom substancji wzorcowych.

- a) związek EC_1 oraz digalaktozylodiacylloglicerol (R_f 0,48), niewidoczne w świetle widzialnym, w świetle UV wygaszające fluorescencję, po wywołaniu plamy barwy czerwonej w świetle widzialnym, w świetle UV dające pomarańczową fluorescencję,
- b) związek EC_2 oraz monogalaktozylodiacylloglicerol (R_f 0,8), niewidoczne w świetle widzialnym, w świetle UV wygaszające fluorescencję, po wywołaniu plamy barwy czerwonej w świetle widzialnym, w świetle UV dające pomarańczową fluorescencję,



Rycina 11. Chromatogram TLC wyciągu metanolowego z surowca suszonego (A) oraz surowca świeżego stabilizowanego (B) wraz ze wzorcami digalaktozyldiacyloglicerolu (C) oraz monogalaktozyldiacyloglicerolu (D).

9.7.2. Porównawcza analiza HPLC wyizolowanych związków z komercyjnie dostępnymi wzorcami galaktozylodiacyllogliceroli.

Warunki:

faza stacjonarna: kolumna Hypersil GOLD C-18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm; Thermo EC), prekolumna Hypersil GOLD C-18 (5 μ m, 10 x 4,6 mm, Thermo EC)

temperatura kolumny: 20°C

objętość nastrzyku: 20 μ l

długość fali: 225 nm

faza ruchoma: solvent A: woda, solvent B: acetonitryl, 40:60

prędkość przepływu: 1 ml/min

czas analizy: 20 min

wzorzec: monogalaktozylodiacylloglicerol (MGDG), digalaktozylodiacylloglicerol (DGDG)

Wykonanie:

Wyizolowane związki oraz wzorce rozpuszczone w mieszaninie chloroformu i metanolu (2:1) pobrano strzykawką w ilości 0,5 ml i przesączono przez sączi membranowe Titan 2 HPLC filter – Nylon Membrane o średnicy porów 0,45 μ m bezpośrednio do wialśów. Uzyskane próbki analizowano w warunkach opisanych powyżej.

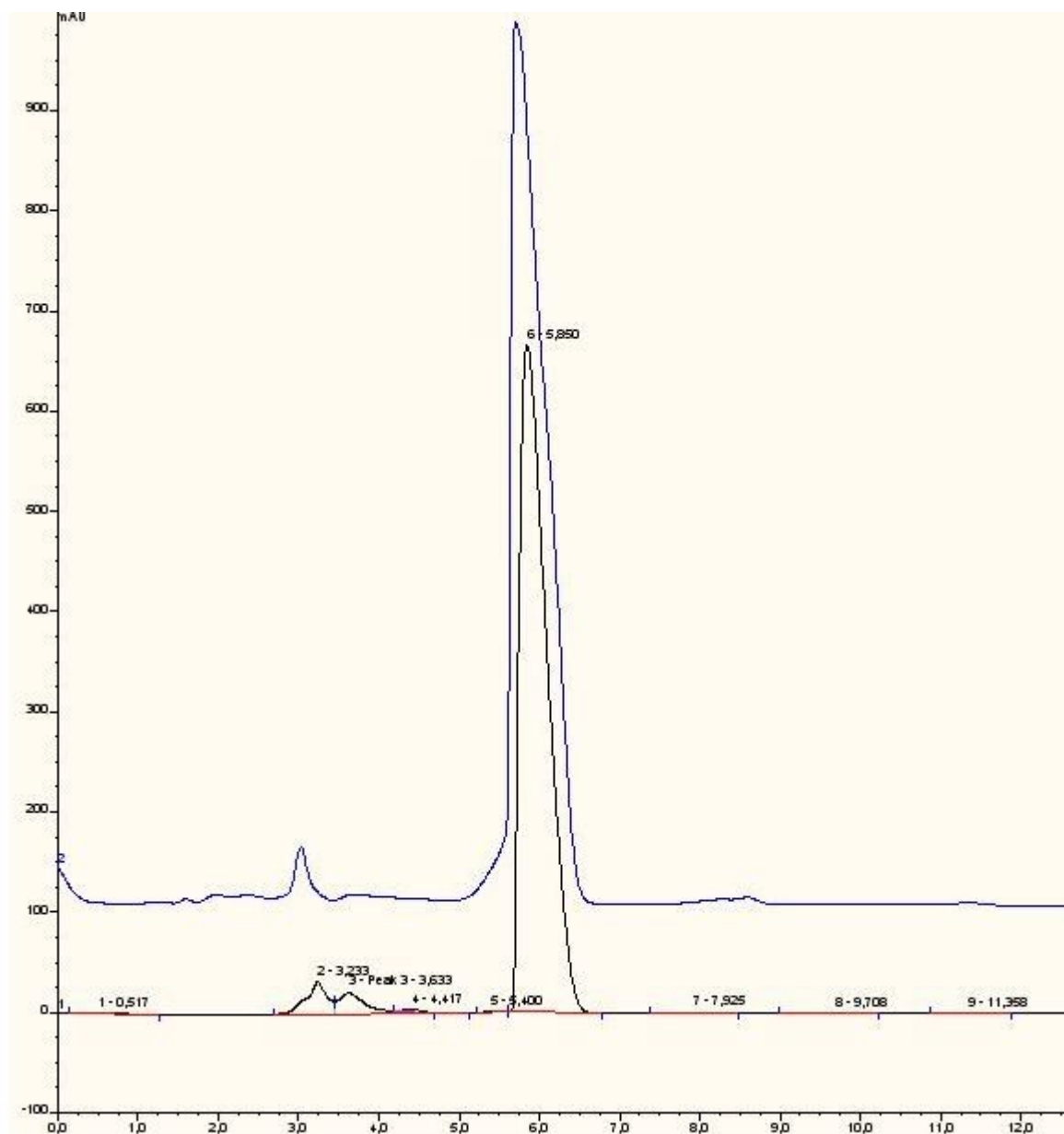
Wyniki:

Na chromatogramach zaobserwowano pik o czasie retencji odpowiadającym czasom retencji substancji wzorcowych.

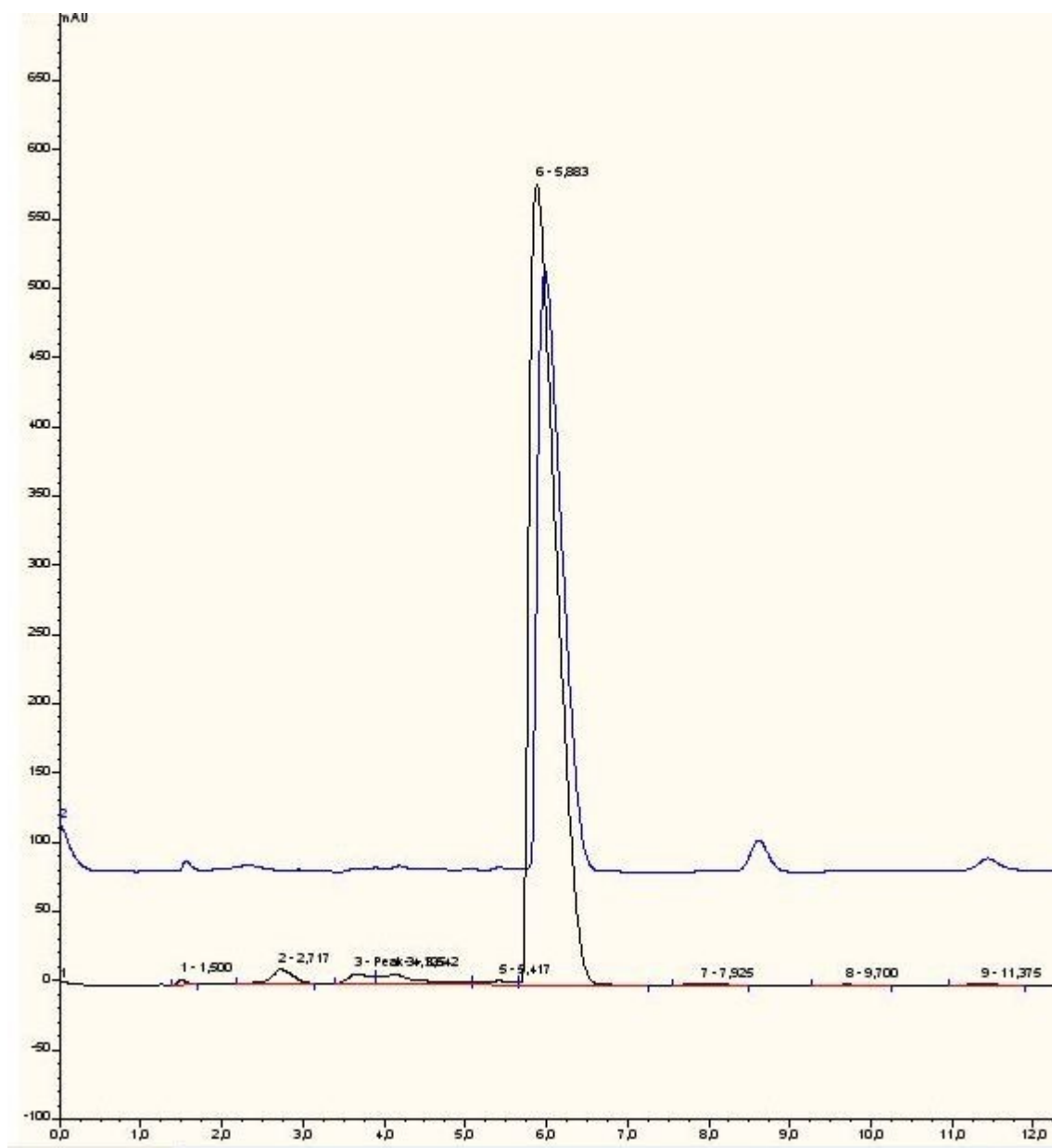
b) digalaktozylodiacylloglicerolu (R_t 5,850)

a) monogalaktozylodiacylloglicerolu (R_t 5,883)

Chromatogram wyizolowanego związku EC₁ wraz z wzorcem przedstawia rycina 12, a wyizolowanego związku EC₂ wraz z wzorcem rycina 13.



Rycina 12. Chromatogram HPLC wyizolowanego związku EC₁ (kolor czarny) wraz z wzorcem digalaktozyldiacyloglicerolu (kolor niebieski).



Rycina 13. Chromatogram HPLC wyizolowanego związku EC_2 (kolor czarny) wraz z wzorcem monogalaktozylodiacyloglicerolu (kolor niebieski).

9.7.3. Porównanie widm ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz FAB MS wyizolowanych związków EC_1 i EC_2 ze wzorcami mono- oraz digalaktozylodiacyloglicerolu.

Wykonanie:

Wykonano widma ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz FAB MS zakupionych wzorców mono- oraz digalaktozylodiacyloglicerolu, a następnie porównano je z uprzednio wykonanymi widmami wyizolowanych związków EC_1 i EC_2 .

Wyniki:

Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR związku EC_1 z digalaktozylodiacyloglicerolem przedstawia tabela 9. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR związku EC_2 z monogalaktozylodiacyloglicerolem przedstawia tabela 10. Zestawienie sygnałów ^1H NMR związku EC_1 z digalaktozylodiacyloglicerolem przedstawia tabela 11. Zestawienie sygnałów ^1H NMR związku EC_2 z monogalaktozylodiacyloglicerolem przedstawia tabela 12. Zestawienie sygnałów FAB MS substancji wzorcowych z wyizolowanymi związkami przedstawia tabela 13.

Tabela 9. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR związku EC_1 z digalaktozylodiacyloglicerolem.

Atom węgla	EC_1 δ [ppm]	DGDG wzorcowy (Lipid Products, UK) δ [ppm]
-CH ₃	14,10 14,26	14,14 14,30
-CH ₂ -	20,52 22,67 24,85 25,59 27,1 29,20 29,59 29,67 30,17 31,5 34,25 34,85	20,54 22,7 25,51 25,6 27,23 29,67 29,76 31,5 31,9 34,12 34,28
-HCO-	69,9	69,9
-CH=CH-	127,09 127,75 127,86 128,06 128,20 128,29 128,96 130,19 131,94	127,09 127,75 127,99 128,09 128,19 128,3 129,85 130,16 131,92
-CO-	173,49 173,83	173,44 173,85

Tabela 10. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR związku EC_2 z monogalaktozylodiacylglicerolem.

Atom węgla	EC_2 δ [ppm]	MGDG wzorcowy (Lipid Products, UK) δ [ppm]
-CH ₃	14,26	14,26
-CH ₂ -	20,52 24,82 25,51 25,59 27,19 29,1 29,13 29,59 34,1 34,25	20,53 24,82 25,51 25,6 27,19 29,12 29,18 29,59 34,1 34,26
-CH ₂ O-	62,7	62,7
-HCO-	70,1	70,1
-CH=CH-	127,09 127,75 128,2 128,29 129,96 130,19 131,94	127,09 127,75 128,2 128,29 129,86 130,19 131,94
-CO-	173,49 173,83	173,46 173,76

Tabela 11. Zestawienie sygnałów ^1H NMR związku EC_1 z digalaktozylodiacylglicerolem.

Atom wodoru	EC_1 δ [ppm]	DGDG wzorcowy (Lipid Products, UK) δ [ppm]
2x -CH ₃ (6H)	0,96	0,97
2x -CO-CH ₂ -CH ₂ (4H)	1,60	1,60
2x -CO-CH ₂ -CH ₂ (4H)	2,25	2,25
6x -CH=CH- (12H)	5,29 – 5,41	5,29 – 5,41

Tabela 12. Zestawienie sygnałów ^1H NMR związku EC_2 z monogalaktozylodiacylglicerolem.

Atom wodoru	EC_2 δ [ppm]	MGDG wzorcowy (Lipid Products, UK) δ [ppm]
2x -CH ₃ (6H)	0,96	0,97
2x -CO-CH ₂ -CH ₂ (4H)	1,61	1,60
2x -CO-CH ₂ -CH ₂ (4H)	2,33	2,31
6x -CH=CH- (12H)	5,29 – 5,41	5,29 – 5,42

Tabela 13. Zestawienie sygnałów FAB MS związku EC₁ i EC₂ z mono- oraz digalaktozylodiacylglicerolem.

Związek	Masa FAB MS m/z [M ⁺ +Na]
EC ₁	959,5
DGDG	959,3
EC ₂	797,4
MGDG	797,5

10. Analiza ilościowa z wykorzystaniem metody densytometrycznej.

Analizę ilościową wykonano w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie, w Zakładzie Chemii Analitycznej. Celem wykonanej analizy było prześledzenie zmian dynamiki kumulacji badanych związków EC₁ i EC₂ w zależności od stadium wegetacji w jakim znajduje się roślina. W tym celu została opracowana, a następnie zwalidowana metoda densytometryczna, za pomocą której dokonano oznaczenia.

10.1. Materiał roślinny.

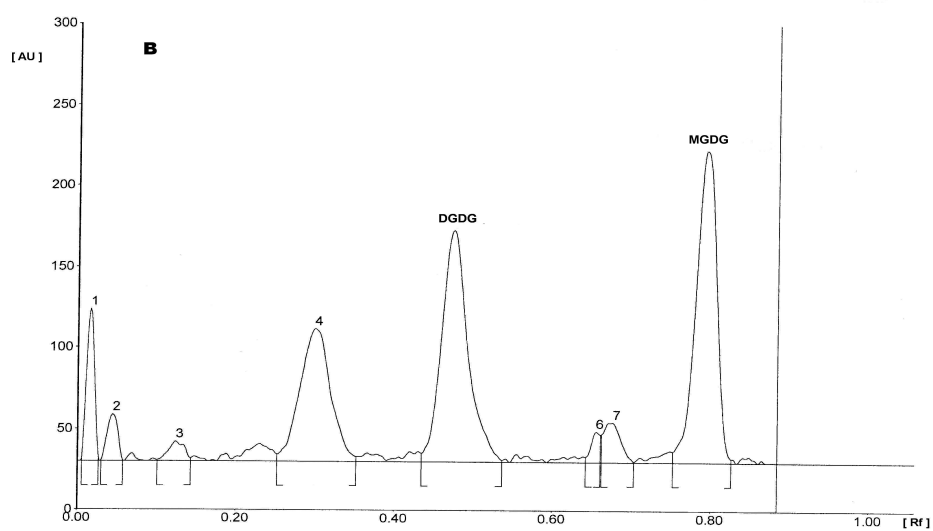
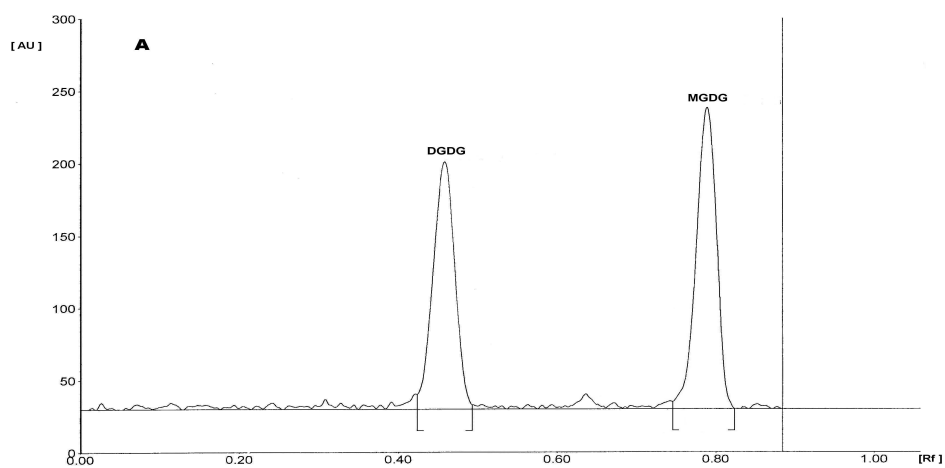
Ziele przymiotna kanadyjskiego pozyskiwano co dwa tygodnie, zawsze z tego samego stanowiska w Ogrodzie Roślin Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie. Wyciągi uzyskiwano poprzez stabilizację 10 g świeżego surowca 200 ml wrzącego metanolu.

10.2. Roztwory wzorcowe.

Przygotowano metanolowe roztwory substancji wzorcowych (MGDG oraz DGDG) o stężeniach 25-275 µg/ml.

10.3. Chromatografia cienkowarstwowa TLC.

Chromatografię TLC przeprowadzono tak jak opisano w punkcie 9.2. Roztwory substancji wzorcowych oraz próbki wyciągów (100 µg/ml, 20 µl) nakładano na płytki w formie pasm długości 8 mm za pomocą aplikatora Linomat V. Chromatogramy rozwijano na długość 95 mm w fazie ruchomej, a po wysuszeniu w temperaturze pokojowej wywoływano spryskując odczynnikiem wywołującym i podgrzewając do 105°C. Plamy skanowano densytometrem Camag przy empirycznie dobranej długości fali 477 nm otrzymując densytogramy substancji wzorcowych oraz wyciągów (Rycina 14). Zmierzono pola powierzchni otrzymanych pików w celu wykonania analizy ilościowej.



Rycina 14. Densytogram substancji wzorcowych MGDG i DGDG (A, 100 $\mu\text{g/ml}$) oraz wyciągów (B, 100 $\mu\text{g/ml}$).

10.4. Walidacja metody.

Opracowana metoda została zwalidowana poprzez określenie takich parametrów jak: liniowość, specyficzność, precyzja, odzysk, granica wykrywalności oraz granica oznaczalności. Wartości poszczególnych parametrów walidacyjnych przedstawiono w tabeli 14 i 15.

Tabela 14. Wyniki walidacji metody densytometrycznej dla MGDG i DGDG.

	MGDG	DGDG
R_f	0,80±0,03	0,48±0,03
LOD (µg na plamę)	0,5	0,2
LOQ (µg na plamę)	1,5	0,5
Zakres liniowości (µg na plamę)	1,5-5,5	0,5-5,5
Równania regresji $P=am+b$	$P=1685m+508$	$P=1694m+180,7$
Odchylenie standardowe współczynników regresji	$S_a=60,8$ $S_b=209,8$	$S_a=20,2$ $S_b=69,6$
Odchylenie standardowe odpowiedzi	$S_y=254,2$	$S_y=84,3$
Współczynnik korelacji r	0,9974	0,9997
Test reszt	brak tendencji	brak tendencji
Odzysk [%] (n=9)	$X_m=93,5$ RSD=3,74%	$X_m=95,7$ RSD=4,48%

P-pole powierzchni pików, m-masa (µg na plamę), a i b-współczynniki regresji, S_a , S_b -odchylenie standardowe współczynnika a lub b, S_y -odchylenie standardowe odpowiedzi, RSD-relatywne odchylenie standardowe, X_m -średnia arytmetyczna

Tabela 15. Powtarzalność oraz precyzja średnioterminowa.

Stężenie (µg na plamę)	Powtarzalność		Precyzja średnioterminowa	
	MGDG	DGDG	MGDG	DGDG
1,5	$X_m=4662,0$ RSD=1,97%	$X_m=3369,2$ RSD=1,73%	$X_m=4967,3$ RSD=2,11%	$X_m=4491,6$ RSD=1,81%
3,0	$X_m=7440,2$ RSD=1,67%	$X_m=6868,7$ RSD=1,96%	$X_m=7263,4$ RSD=2,07%	$X_m=6540,3$ RSD=2,20%
4,5	$X_m=8453$ RSD=2,58%	$X_m=7876,5$ RSD=2,36%	$X_m=8582,8$ RSD=2,65%	$X_m=8098,8$ RSD=2,70%

X_m -średnia arytmetyczna, RSD-relatywne odchylenie standardowe

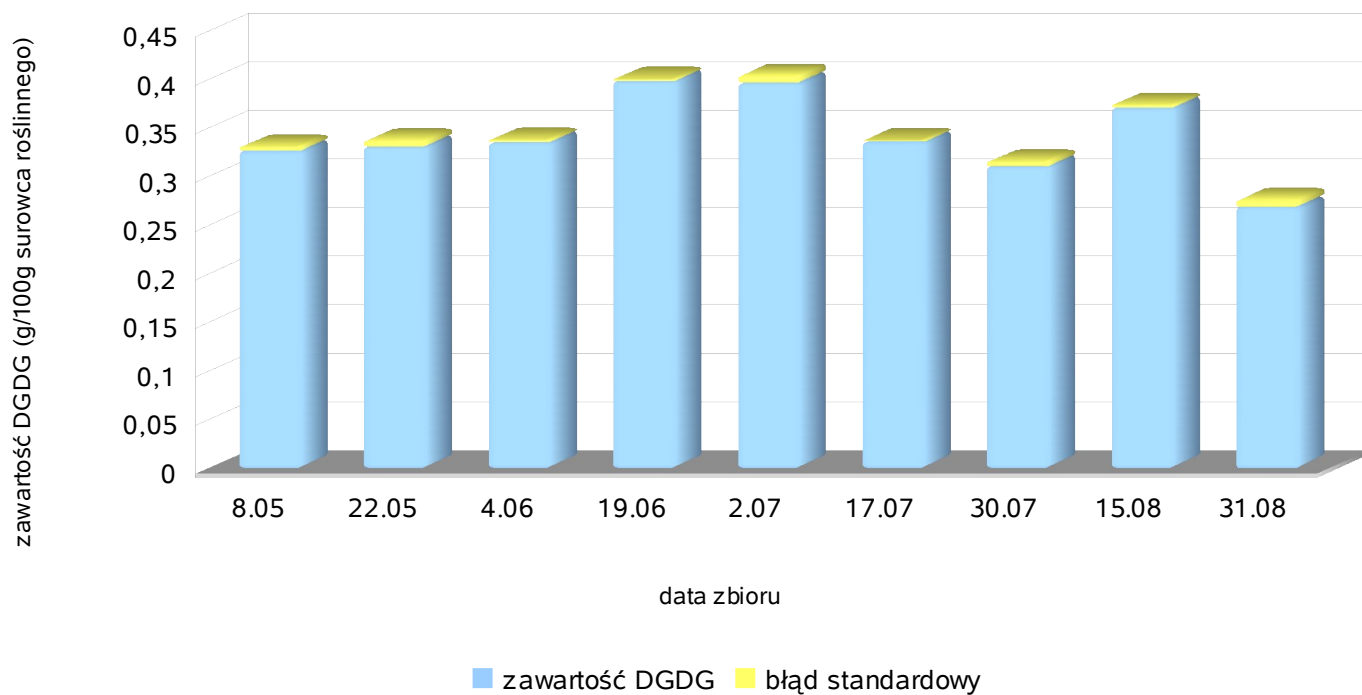
10.5. Wyniki.

Uzyskane wyniki przedstawione są w tabeli 16 oraz na rycinach 15 i 16.

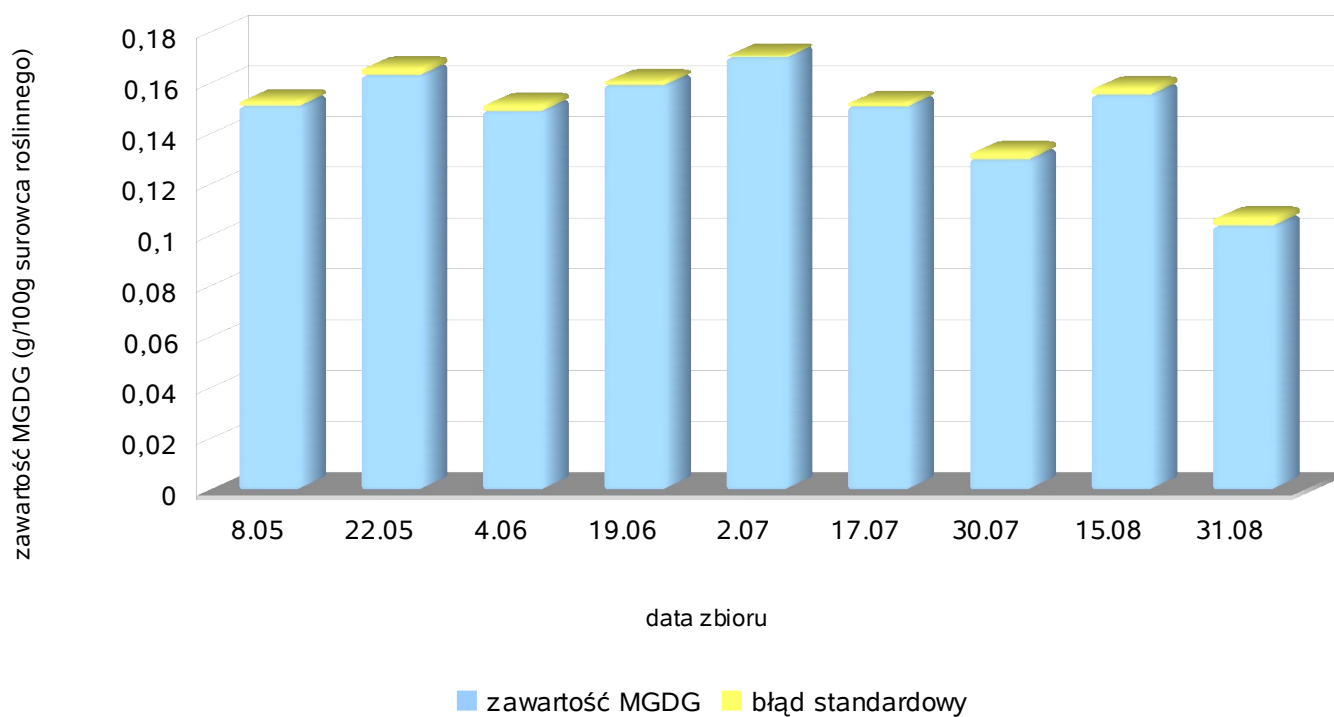
Tabela 16. Zawartość DGDG oraz MGDG w poszczególnych stadiach wegetacyjnych rośliny.

Data zbioru	Zawartość DGDG (g/100 g surowca roślinnego)	Zawartość MGDG (g/100 g surowca roślinnego)
08.05.2009	$X_m=0,3267\pm0,0052$ RSD=1,60% $\mu=X_m\pm0,0055$	$X_m=0,1509\pm0,0022$ RSD=1,49% $\mu=X_m\pm0,0024$
22.05.2009	$X_m=0,3306\pm0,0067$ RSD=2,03% $\mu=X_m\pm0,0070$	$X_m=0,1630\pm0,003$ RSD=1,85% $\mu=X_m\pm0,0032$
04.06.2009	$X_m=0,3350\pm0,0031$ RSD=0,94% $\mu=X_m\pm0,0033$	$X_m=0,1489\pm0,0027$ RSD=1,81% $\mu=X_m\pm0,0028$
19.06.2009	$X_m=0,3978\pm0,0028$ RSD=0,72% $\mu=X_m\pm0,0030$	$X_m=0,1591\pm0,0019$ RSD=1,19% $\mu=X_m\pm0,0020$
02.07.2009	$X_m=0,3960\pm0,0078$ RSD=1,96% $\mu=X_m\pm0,0082$	$X_m=0,1701\pm0,0009$ RSD=0,53% $\mu=X_m\pm0,0009$
17.07.2009	$X_m=0,3355\pm0,0019$ RSD=0,56% $\mu=X_m\pm0,0019$	$X_m=0,1507\pm0,0018$ RSD=1,19% $\mu=X_m\pm0,0020$
30.07.2009	$X_m=0,3103\pm0,0054$ RSD=1,74% $\mu=X_m\pm0,0057$	$X_m=0,1298\pm0,0030$ RSD=2,34% $\mu=X_m\pm0,0032$
15.08.2009	$X_m=0,3703\pm0,0039$ RSD=1,04% $\mu=X_m\pm0,0041$	$X_m=0,1552\pm0,0030$ RSD=1,92% $\mu=X_m\pm0,0031$
31.08.2009	$X_m=0,2683\pm0,0079$ RSD=2,94% $\mu=X_m\pm0,0082$	$X_m=0,1037\pm0,0033$ RSD=3,22% $\mu=X_m\pm0,0035$

X_m -średnia arytmetyczna, RSD-relatywne odchylenie standardowe, μ -95% przedział ufności



Rycina 15. Zawartość DGDG w ziele przymiotna kanadyjskiego w zależności od okresu wegetacji.



Rycina 16. Zawartość MGDG w ziele przymiotna kanadyjskiego w zależności od okresu wegetacji.

11. Ocena wpływu wyciągów z suszonego i świeżego stabilizowanego ziela przymiotna kanadyjskiego na wybrane wskaźniki hematologiczne krwi, skład odsetkowy białych krwinek oraz na zjawisko emperipolezy w szpiku kostnym u szczurów.

Badanie zmian wskaźników hematologicznych krwi oraz ocenę mikroskopową zjawiska emperipolezy w szpiku kostnym przeprowadzono w Pracowni Patologii Narządu Ruchu Katedry Rehabilitacji Klinicznej Akademii Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie. Badanie składu odsetkowego krwinek białych przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Toksykologicznej Katedry Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie.

11.1. Ocena zmian wskaźników hematologicznych krwi.

Wykonanie:

W doświadczeniu użyte zostały 3-4 miesięczne szczury Wistar, samce, które podzielono na 5 grup liczących po 6 zwierząt każda. Grupa kontrolna otrzymywała olej kukurydziany w ilości 2 ml/kg masy ciała, podczas gdy grupy badane wyciąg świeży oraz suchy z ziela przymiotna kanadyjskiego, zawieszony w oleju kukurydzianym w dawkach 100 i 200 mg/kg masy ciała. Szczegółowe zestawienie grup oraz substancji podawanych przedstawia tabela 17. Wszystkie wyżej wymienione substancje podawano zwierzętom *per os* do żołądka, raz dziennie przez 28 dni. Przed pierwszym podaniem badanych substancji oraz w dniu 7, 14, 21 i 28 od zwierząt pobierano krew z ogona do badań morfologicznych. Pobraną krew analizowano za pomocą weterynaryjnego analizatora hematologicznego HORIBA Micros 60 OT. Oznaczone były następujące wskaźniki: RBC (liczba krwinek czerwonych), HCT (hematokryt), MCV (średnia objętość krwinki czerwonej), HGB (stężenie hemoglobiny), MCH (średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej), MCHC (średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej), WBC (liczba krwinek białych), PLT (liczba płytek krwi). Dodatkowo wykonywano rozmazy krwi mające na celu uwidocznienie ewentualnych zmian w populacji krwinek białych. W ostatnim dniu eksperymentu, bezpośrednio po uśmierceniu zwierząt, z głowy kości udowej został pobrany do analizy szpik kostny. Zarówno rozmazy szpiku kostnego, jak i krwi wybarwione zostały odczynnikami May-Grünwalda i Giemsy. Rozmazy krwi i szpiku obserwowano pod mikroskopem w stukrotnym powiększeniu. Zarówno przed rozpoczęciem podawania badanych substancji oraz w dniu 7, 14, 21 i 28 zwierzęta były ważone w celu oznaczenia ewentualnych zmian masy ciała.

Tabela 17. Zestawienie grup doświadczalnych, substancji i ich dawek oraz liczby szczurów w grupie.

Numer grupy	Podawane substancje	Dawka	Ilość szczurów
kontrolna	Olej kukurydziany	2 ml/kg m.c.	6
I	Wyciąg z surowca suszonego w oleju kukurydzianym	100 mg/kg m.c.	6
II	Wyciąg z surowca suszonego w oleju kukurydzianym	200 mg/kg m.c.	6
III	Wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego w oleju kukurydzianym	100 mg/kg m.c.	6
IV	Wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego w oleju kukurydzianym	200 mg/kg m.c.	6

Wyniki:

Wyniki opracowano statystycznie w programie R [88]. W tym też programie wykonane zostały wszystkie obliczenia i wykresy.

Charakterystyka grup badanych.

Dokonano porównania wartości startowych w pięciu grupach. Wszystkie badane wskaźniki (RBC, HCT, MCV, HGB, MCH, MCHC, WBC, PLT) w każdej z badanych grup posiadały rozkład normalny, co wykazano przeprowadzając test Shapiro-Wilka. Grupy zostały porównane za pomocą metody ANOVA (analiza wariancji), która miała wykazać czy grupy różnią się istotnie danym wskaźnikiem. W przypadku obecności różnic, za pomocą testu HSD Tukey'a sprawdzono, które grupy różniły się od których. Otrzymane wyniki przedstawia tabela 18.

Analiza zmian w czasie.

Dokonano porównania, jak poszczególne wskaźniki zmieniały się w czasie biorąc pod uwagę wartość startową oraz wartość po 4 tygodniach podawania wyciągów w każdej z grup z osobna. W każdej z grup sprawdzono, posługując się testem Shapiro-Wilka, czy zmiany danego wskaźnika mają rozkład normalny. Tam gdzie rozkład był normalny, do sprawdzenia istotności zmian użyto testu t-Studenta dla par wiązanych, a tam gdzie normalności nie było, testu Wilcoxona dla par wiązanych. Wyniki przedstawiono w tabeli 19.

Porównanie grup badanych.

Porównano wszystkie badane wskaźniki u pięciu grup szczurów przed rozpoczęciem podawania oraz w każdym kolejnym tygodniu eksperymentu. Wskaźniki te w każdej z badanych grup miały zawsze rozkład normalny, co sprawdzone zostało testem Shapiro-Wilka. Do porównania każdej z grup użyto analizy wariancji ANOVA. W przypadku, gdy wartość p z analizy ANOVA była mniejsza od 0,05, aby odpowiedzieć na pytanie które z grup różniły się od których wykonano test HSD Tukey'a. Wyniki dla poszczególnych wskaźników przedstawione zostały w tabelach 20-27 oraz na rycinach 17-24.

Tabela 18. Charakterystyka grup badanych – zmiany wskaźników hematologicznych krwi.

Wskaźnik	Grupa	Średnia	SD	ANOVA
RBC [10 ⁶ /mm ³]	kontrolna	7,8	0,4	F=0,742 p=0,573
	I	7,4	0,4	
	II	7,5	0,6	
	III	7,3	0,5	
	IV	7,5	0,6	
HCT [%]	kontrolna	48,5	2,8	F=1,138 p=0,362
	I	45,5	1,8	
	II	47,4	2,8	
	III	46,1	2,9	
	IV	47,8	3,5	
MCV [μm ³]	kontrolna	61,7	1,8	F=1,792 p=0,162
	I	61,7	1,8	
	II	63,2	1,9	
	III	63,5	1	
	IV	63,7	1,5	
HGB [g/dl]	kontrolna	13,9	0,9	F=5,345 p=0,003*
	I	11,9	0,5	
	II	12,7	0,8	
	III	12,2	0,8	
	IV	12,8	0,9	
* Test HSD: HGB w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I i III				
MCH [pg]	kontrolna	18	0,7	F=7,131 p=0,001*
	I	16,2	0,7	
	II	16,9	0,4	
	III	16,9	0,4	
	IV	17	0,6	
* Test HSD: MCH w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I,II,III				
MCHC [g/dl]	kontrolna	28,7	0,8	F=29,346 p<0,001*
	I	26,3	0,4	
	II	26,8	0,3	
	III	26,6	0,2	
	IV	26,7	0,3	
* Test HSD: MCHC w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I,II,III,IV				

Wskaźnik	Grupa	Średnia	SD	ANOVA
WBC [$10^3/\text{mm}^3$]	kontrolna	12,7	2,6	F=9,555 p<0,001*
	I	6,4	1,7	
	II	9	2,8	
	III	7,4	1	
	IV	10,6	1,3	
* Test HSD: WBC w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I,II,III; WBC w grupie IV wyższe niż w grupie I				
PLT [$10^3/\text{mm}^3$]	kontrolna	1103	186,9	F=1,386 p=0,267
	I	992	101,4	
	II	934,3	113,4	
	III	897,3	244	
	IV	943	140,2	

Tabela 19. Analiza zmian poszczególnych wskaźników w czasie (wartość startowa vs wartość po 4 tygodniach) – zmiany wskaźników hematologicznych krwi.

Wskaźnik	Grupa	Średnia zmiana	SD zmian	Mediana zmian	Zakres zmian (od-do)		Istotność zmian
RBC [$10^6/\text{mm}^3$]	kontrolna	0,82	0,47	0,86	0,21	1,35	t=4,257 p=0,008*
	I	0,98	0,26	0,92	0,62	1,28	t=-9,41 p<0,001*
	II	0,85	0,48	0,8	0,39	1,47	t=-4,316 p=0,008*
	III	1,51	0,52	1,31	1,03	2,35	t=-7,047 p=0,001*
	IV	0,9	0,54	0,86	0,22	1,75	t=-4,128 p=0,009*
HCT [%]	kontrolna	1,5	3,1	2,7	-2,9	5,1	t=-1,185 p=0,289*
	I	2,37	1,61	2,35	-0,1	4,5	t=-3,596 p=0,016*
	II	0,58	2,75	0,75	-2,4	4	t=-0,519 p=0,626*
	III	5,32	3,26	4,35	2,4	10,8	t=-3,994 p=0,01*
	IV	1,35	2,84	1,4	-3,1	5,5	t=-1,165 p=0,296*
MCV [μm^3]	kontrolna	-5	2,53	-4	-9	-3	t=4,841 p=0,005*
	I	-4,17	0,75	-4	-5	-3	t=13,558 p<0,001*
	II	-5,83	0,98	-6	-7	-4	V=21 p=0,031**
	III	-4,83	1,17	-5	-6	-3	t=10,127 p<0,001*
	IV	-5,33	0,82	-5,5	-6	-4	t=16 p<0,001*
HGB [g/dl]	kontrolna	0,32	0,93	0,5	-1	1,4	t=-0,838 p=0,44*
	I	1,3	0,39	1,35	0,6	1,7	t=-8,168 p<0,001*
	II	0,65	0,66	0,55	-0,1	1,5	t=-2,425 p=0,06*
	III	1,62	0,82	1,35	0,9	2,9	t=-4,854 p=0,005*
	IV	0,57	0,82	0,65	-0,8	1,5	t=-1,7 p=0,15*
MCH [pg]	kontrolna	-1,35	0,74	-1,15	-2,7	-0,6	t=4,439 p=0,007*
	I	-0,38	0,46	-0,35	-1,1	0,3	t=2,031 p=0,098*
	II	-0,98	0,32	-0,95	-1,4	-0,6	t=7,554 p=0,001*
	III	-1,05	0,34	-1,1	-1,5	-0,5	t=7,584 p=0,001*
	IV	-1,22	0,32	-1,3	-1,6	-0,7	t=9,347 p<0,001*
MCHC [g/dl]	kontrolna	-0,2	0,64	-0,1	-1,3	0,6	t=0,771 p=0,476*
	I	-0,27	3,88	1,5	-8,1	1,7	V=6 p=0,4**
	II	0,95	0,45	0,95	0,3	1,7	t=-5,165 p=0,004*
	III	0,42	0,26	0,5	0,1	0,7	t=-3,867 p=0,012*
	IV	0,47	0,37	0,35	0,1	1,1	t=-3,07 p=0,028*
WBC [$10^3/\text{mm}^3$]	kontrolna	-3,13	2,64	-3,2	-6,9	1,2	t=2,903 p=0,034*
	I	0,62	1,08	0,1	-0,3	2	V=7 p=0,527**
	II	-0,92	2,53	-0,55	-5,1	1,7	t=0,889 p=0,415*
	III	-0,15	1,35	0	-2,4	1,5	t=0,271 p=0,797*
	IV	-2,17	2,15	-1,2	-5,1	-0,3	V=21 p=0,031**

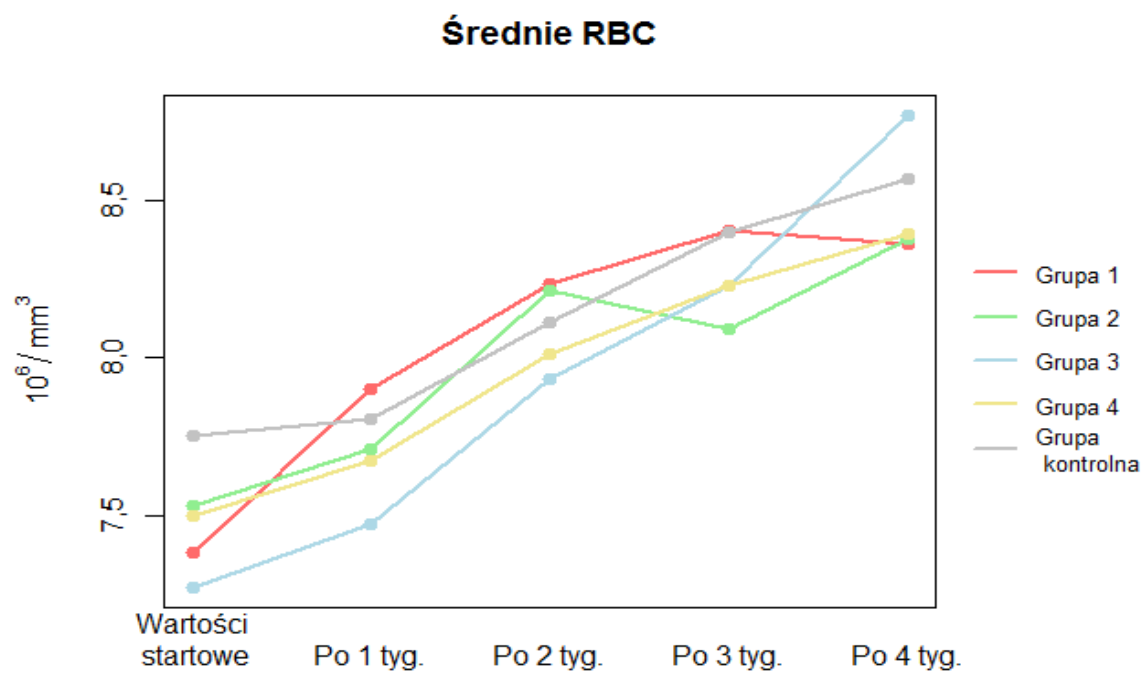
Wskaźnik	Grupa	Średnia zmiana	SD zmian	Mediana zmian	Zakres zmian (od-do)		Istotność zmian
PLT [$10^3/\text{mm}^3$]	kontrolna	-5	233,72	-42	-292	416	t=0,052 p=0,96*
	I	-162,5	228,22	-197	-498	136	t=1,744 p=0,142*
	II	-155,33	332,23	2	-766	78	V=12 p=0,844**
	III	-116,17	321,43	-133,5	-471	398	t=0,885 p=0,417*
	IV	-102,67	134,27	-102,5	-258	105	t=1,873 p=0,12*

* Zmiany okazały się mieć rozkład normalny: wykonano test t-Studenta dla par wiązanych.

** Zmiany okazały się nie mieć rozkładu normalnego: wykonano test Wilcoxona dla par wiązanych.

Tabela 20. RBC.

RBC [10 ⁶ /mm ³]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	7,8	0,4	7,4	0,4	7,5	0,6	7,3	0,5	7,5	0,6	F=0,742 p=0,573
Po 1 tygodniu	7,8	0,5	7,9	0,5	7,7	0,6	7,5	0,3	7,7	0,5	F=0,66 p=0,626
Po 2 tygodniach	8,1	0,2	8,2	0,3	8,2	0,5	7,9	0,2	8	0,3	F=0,897 p=0,481
Po 3 tygodniach	8,4	0,3	8,4	0,2	8,1	0,2	8,2	0,7	8,2	0,4	F=0,68 p=0,613
Po 4 tygodniach	8,6	0,3	8,4	0,3	8,4	0,3	8,8	0,5	8,4	0,5	F=1,333 p=0,285

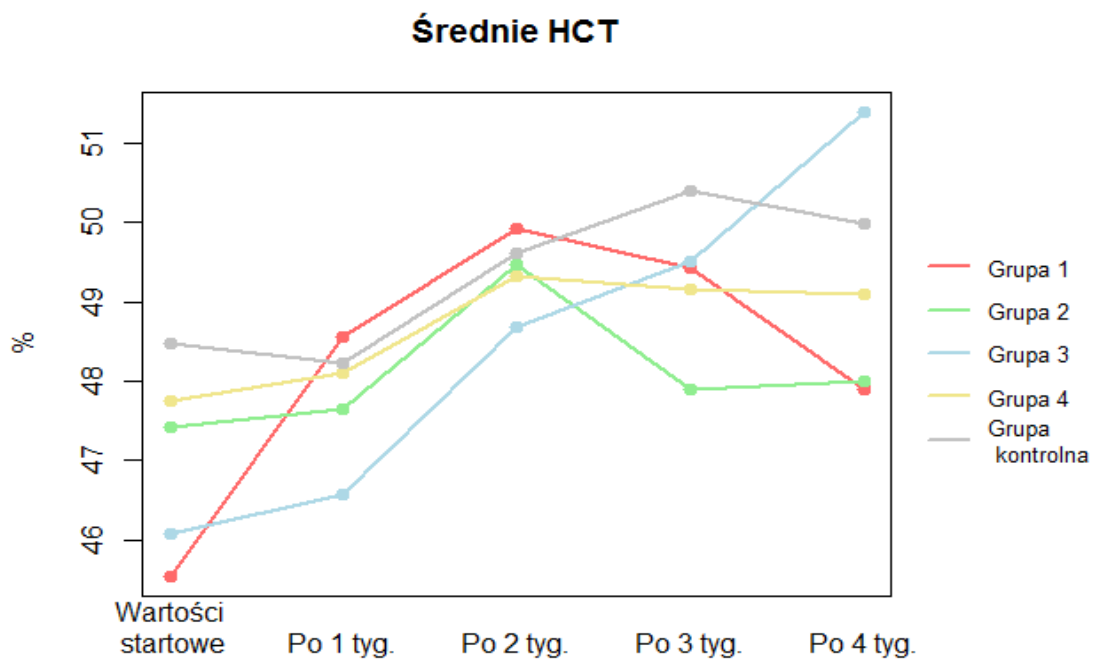


Rycina 17. Średnie RBC.

Tabela 21. HCT.

HCT [%]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	48,5	2,8	45,5	1,8	47,4	2,8	46,1	2,9	47,8	3,5	F=1,138 p=0,362
Po 1 tygodniu	48,2	2,8	48,6	2,2	47,6	2,6	46,6	1,7	48,1	2,6	F=0,618 p=0,654
Po 2 tygodniach	49,6	1,6	49,9	1,7	49,5	1,6	48,7	1,8	49,3	0,8	F=0,526 p=0,718
Po 3 tygodniach	50,4	1,4	49,4	1	47,9	1	49,5	4,4	49,1	2,2	F=0,871 p=0,495
Po 4 tygodniach	50	1,6	47,9	1	48	1,6	51,4	2,8	49,1	2,3	F=2,997 p=0,038 *

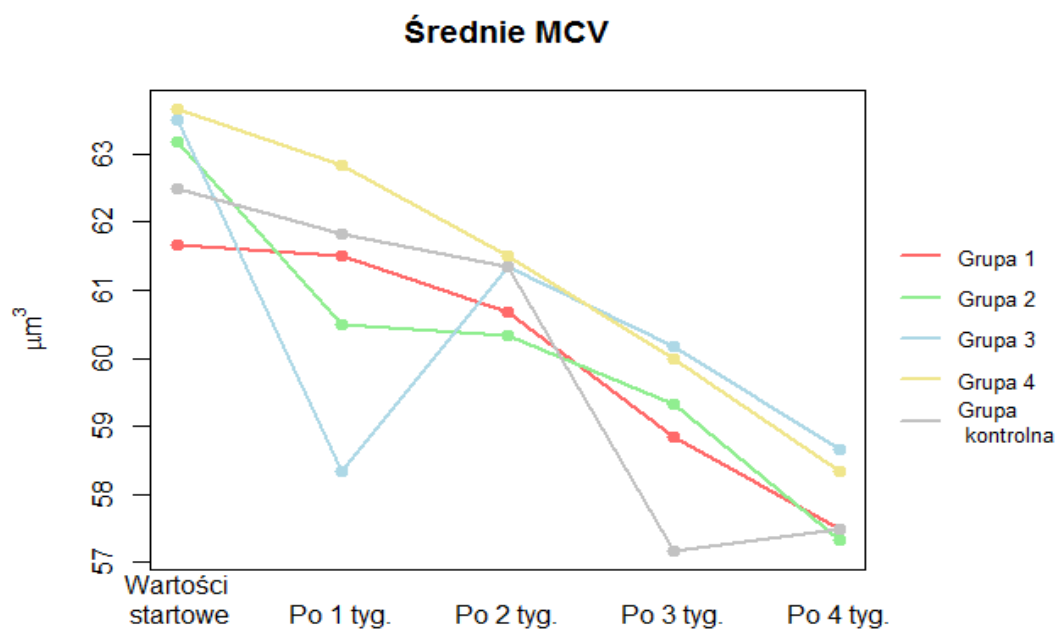
* Test HSD: HCT w grupie III wyższe niż w grupie I.



Rycina 18. Średnie HCT.

Tabela 22. MCV.

MCV [μm^3]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	62,5	1	61,7	1,8	63,2	1,9	63,5	1	63,7	1,5	F=1,792 p=0,162
Po 1 tygodniu	61,8	0,4	61,5	2,3	60,5	5,2	58,3	6,1	62,8	1,9	F=1,189 p=0,34
Po 2 tygodniach	61,3	0,5	60,7	1,4	60,3	1,6	61,3	1	61,5	2,1	F=0,754 p=0,565
Po 3 tygodniach	57,2	4,5	58,8	1,5	59,3	1,2	60,2	0,8	60	1,8	F=1,581 p=0,21
Po 4 tygodniach	57,5	1,9	57,5	1,6	57,3	1,2	58,7	0,5	58,3	1,8	F=0,962 p=0,445



Rycina 19. Średnie MCV.

Tabela 23. HGB.

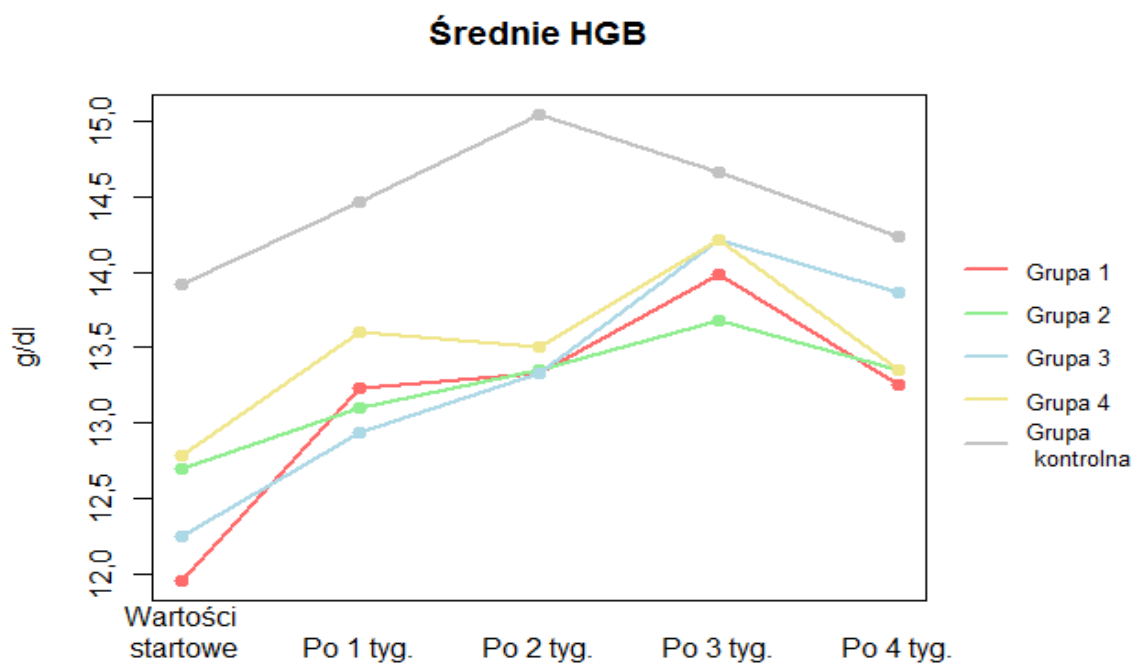
HGB [g/dl]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	13,9	0,9	11,9	0,5	12,7	0,8	12,2	0,8	12,8	0,9	F=5,345 p=0,003*
Po 1 tygodniu	14,5	0,8	13,2	0,7	13,1	0,7	12,9	0,5	13,6	0,6	F=4,82 p=0,005**
Po 2 tygodniach	15,1	1,1	13,3	0,5	13,3	0,5	13,3	0,5	13,5	0,3	F=8,189 p<0,001***
Po 3 tygodniach	14,7	0,3	14	0,5	13,7	0,3	14,2	1,1	14,2	0,7	F=1,857 p=0,149
Po 4 tygodniach	14,2	0,5	13,2	0,5	13,3	0,4	13,9	0,6	13,3	0,6	F=3,96 p=0,013 †

* Test HSD: HGB w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I i III.

** Test HSD: HGB w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I, II i III.

*** Test HSD: HGB w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I-IV.

† Test HSD: HGB w grupie kontrolnej wyższe niż w grupie I.



Rycina 20. Średnie HGB.

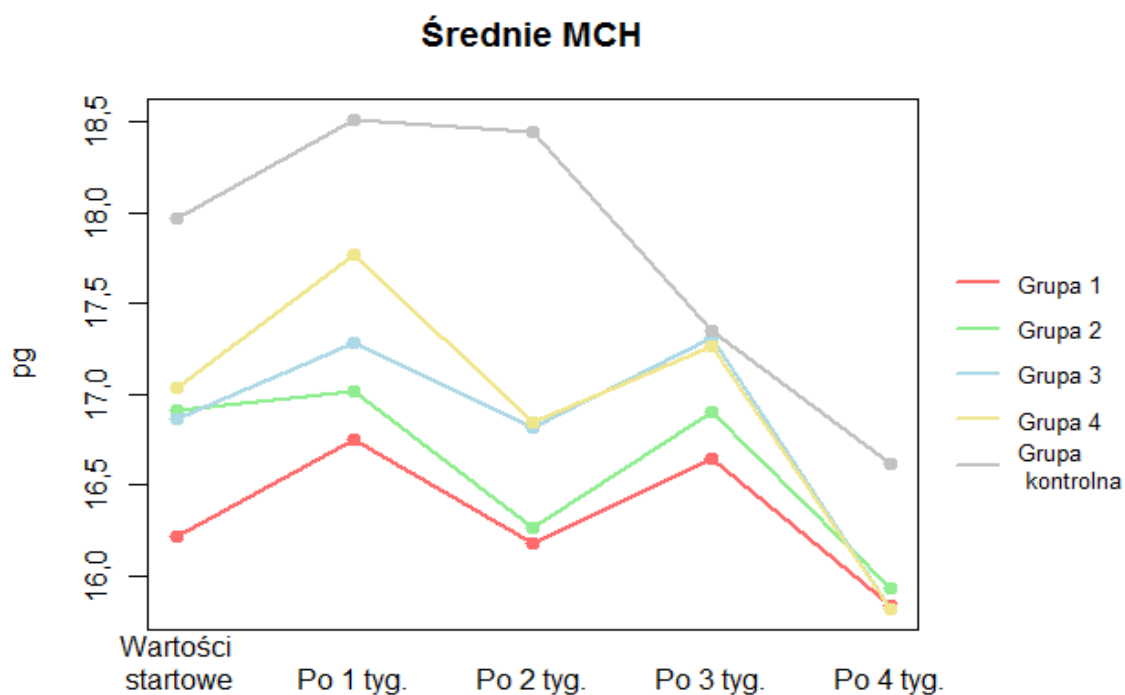
Tabela 24. MCH.

MCH [pg]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	18	0,7	16,2	0,7	16,9	0,4	16,9	0,4	17	0,6	F=7,131 p=0,001*
Po 1 tygodniu	18,5	0,3	16,8	0,9	17	0,7	17,3	0,5	17,8	1	F=5,702 p=0,002*
Po 2 tygodniach	18,4	0,9	16,2	0,5	16,3	0,6	16,8	0,2	16,9	0,8	F=11,484 p<0,001**
Po 3 tygodniach	17,4	0,4	16,6	0,8	16,9	0,5	17,3	0,3	17,3	0,9	F=1,526 p=0,225
Po 4 tygodniach	16,6	0,2	15,8	0,3	15,9	0,4	15,8	0,2	15,8	0,7	F=4,375 p=0,008***

* Test HSD: MCH w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I-III.

** Test HSD: MCH w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I-IV.

*** Test HSD: MCH w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I, III i IV.

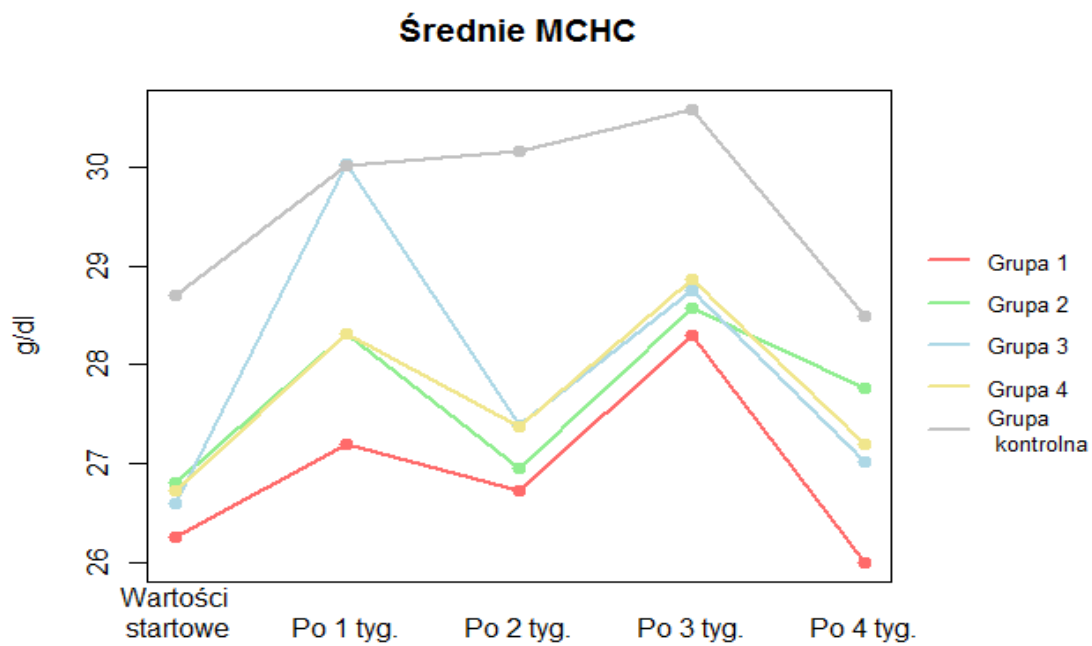


Rycina 21. Średnie MCH.

Tabela 25. MCHC.

MCHC [g/dl]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	28,7	0,8	26,3	0,4	26,8	0,3	26,6	0,2	26,7	0,3	F=29,346 p<0,001*
Po 1 tygodniu	30	0,3	27,2	0,8	28,3	1,7	30	3,4	28,3	0,9	F=2,752 p=0,051
Po 2 tygodniach	30,1	1,4	26,7	0,4	26,9	0,6	27,4	0,5	27,4	0,9	F=17,332 p<0,001*
Po 3 tygodniach	30,6	2,6	28,3	0,9	28,6	0,5	28,8	0,5	28,9	1	F=2,628 p=0,058
Po 4 tygodniach	28,5	0,2	26	3,8	27,8	0,6	27	0,4	27,2	0,4	F=1,715 p=0,178

* Test HSD: MCHC w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I-IV.



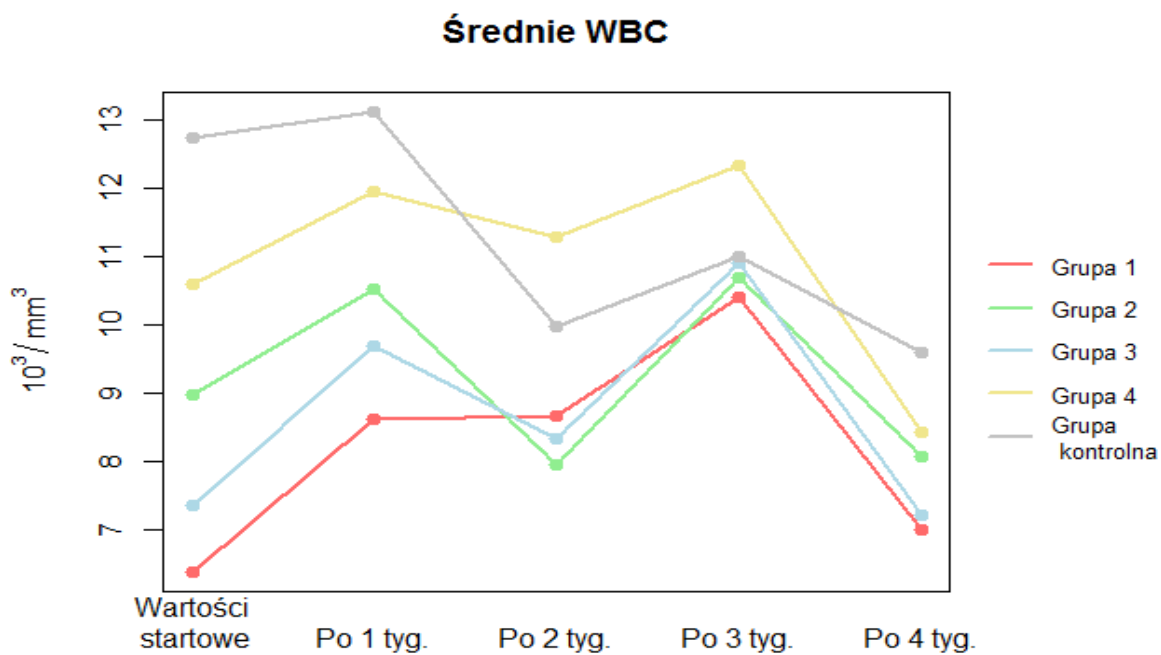
Rycina 22. Średnie MCHC.

Tabela 26. WBC.

WBC [10 ³ /mm ³]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	12,7	2,6	6,4	1,7	9	2,8	7,4	1	10,6	1,3	F=9,555 p<0,001*
Po 1 tygodniu	13,1	4,5	8,6	1,3	10,5	1,8	9,7	0,7	11,9	1,4	F=3,487 p=0,021**
Po 2 tygodniach	10	2,2	8,7	0,6	8	1,7	8,3	1,1	11,3	3,9	F=2,31 p=0,086
Po 3 tygodniach	11	1,7	10,4	1,5	10,7	2,5	10,9	3,3	12,3	3,1	F=0,515 p=0,725
Po 4 tygodniach	9,6	1,2	7	1	8,1	2	7,2	1	8,4	2,2	F=2,669 p=0,056

* Test HSD: WBC w grupie kontrolnej wyższe niż w grupach I-III; WBC w grupie IV wyższe niż w grupie I.

** Test HSD: WBC w grupie kontrolnej wyższe niż w grupie I.

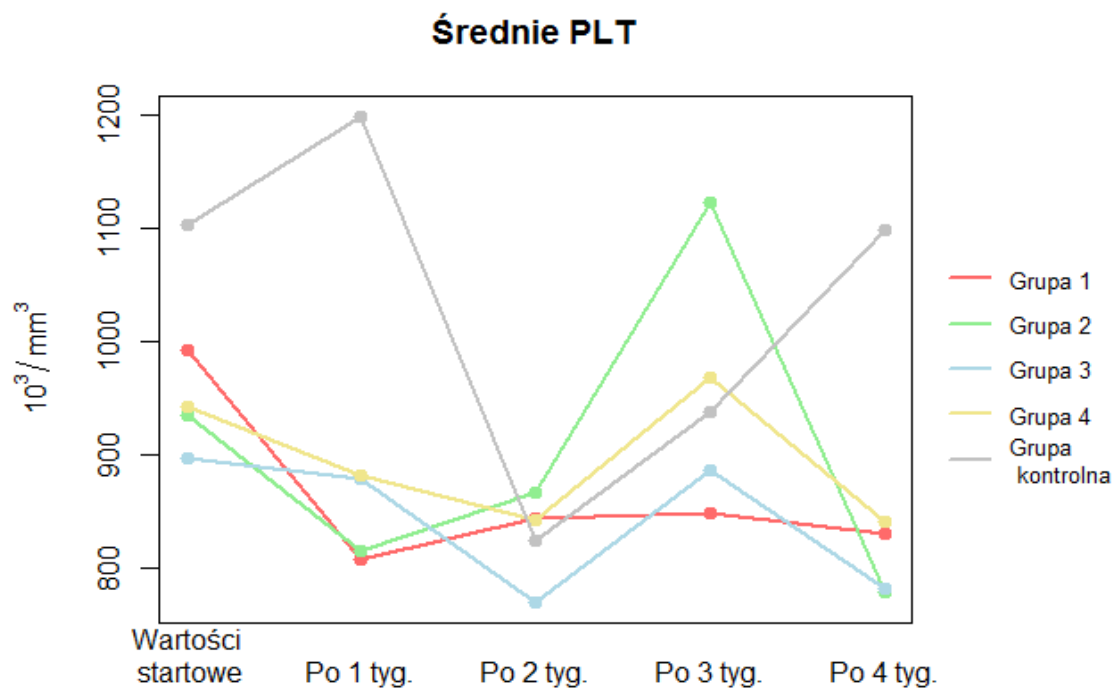


Rycina 23. Średnie WBC.

Tabela 27. PLT.

PLT [10 ³ /mm ³]	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	1103	186,9	992	101,4	934,3	113,4	897,3	244	943	140,2	F=1,386 p=0,267
Po 1 tygodniu	1200	228,4	807,8	152,7	814,8	191,4	878,8	44,8	881,5	199,8	F=5,106 p=0,004*
Po 2 tygodniach	824,2	361	843,8	152,2	866,7	54,7	769	225,8	841,8	161,5	F=0,174 p=0,95
Po 3 tygodniach	938,3	35,9	848,7	263,1	1122	167,8	885,5	252,7	968,7	114,5	F=1,904 p=0,141
Po 4 tygodniach	1098	85,1	829,5	257,8	779	348	781,2	261,2	840,3	116,4	F=1,914 p=0,139

* Test HSD: PLT w grupie kontrolnej wyższe niż w pozostałych grupach.



Rycina 24. Średnie PLT.

11.2. Badanie składu odsetkowego krwinek białych w krwi obwodowej.

Wykonanie:

Po każdorazowym pobraniu krwi wykonywano rozmaz w celu późniejszego określenia składu odsetkowego krwinek białych. Rozmazy po wysuszeniu wybarwiano metodą Pappenheima za pomocą roztworu May-Grünwalda i Giemsy (MGG) [89]. Otrzymane preparaty oglądano pod mikroskopem w powiększeniu 100x, używając olejku immersyjnego.

Wyniki:

Wyniki opracowano statystycznie w programie R [88]. W tym programie wykonano również wszystkie obliczenia i wykresy.

Charakterystyka grup badanych.

Dokonano porównania wartości startowych w pięciu grupach. Badanymi wskaźnikami były ilość granulocytów obojętnochłonnych oraz ilość limfocytów. W każdej z badanych grup posiadały one rozkład normalny, co wykazano przeprowadzając test Shapiro-Wilka. Grupy zostały porównane za pomocą metody ANOVA (analiza wariancji), która miała wykazać czy grupy różnią się istotnie danym wskaźnikiem. W przypadku obecności różnic, za pomocą testu HSD Tukey'a sprawdzono, które grupy różniły się od których. Otrzymane wyniki przedstawia tabela 28.

Analiza zmian w czasie.

Dokonano porównania jak poszczególne wskaźniki zmieniały się w czasie, biorąc pod uwagę wartość startową oraz wartość po 4 tygodniach podawania wyciągów w każdej z grup z osobna. W każdej z grup sprawdzono, posługując się testem Shapiro-Wilka, czy zmiany danego wskaźnika mają rozkład normalny. Tam gdzie rozkład był normalny, do sprawdzenia istotności zmian użyto testu t-Studenta dla par wiązanych, a tam gdzie normalności nie było, testu Wilcoxona dla par wiązanych. Wyniki przedstawiono w tabeli 29.

Porównanie grup badanych.

Porównano wszystkie badane wskaźniki u pięciu grup szczurów przed rozpoczęciem podawania oraz w każdym kolejnym tygodniu eksperymentu. Wskaźniki te w każdej z badanych grup miały zawsze rozkład normalny, co sprawdzone zostało testem Shapiro-Wilka. Do porównania każdej z grup użyto analizy wariancji ANOVA. W przypadku, gdy wartość p z analizy ANOVA była mniejsza od 0,05, aby odpowiedzieć na pytanie które z grup różniły się od których, wykonano test HSD Tukey'a. Wyniki dla poszczególnych wskaźników przedstawione zostały w tabelach 30 i 31 oraz na rycinach 25 i 26.

Tabela 28. Charakterystyka grup badanych – skład odsetkowy krwinek białych.

Wskaźnik	Grupa	Średnia	SD	ANOVA
granulocyty obojętnochłonne (10 ³ /mm ³)	kontrolna	0,4	0,2	F=4,486 p=0,007*
	I	0,5	0,3	
	II	1	0,4	
	III	0,8	0,3	
	IV	1,1	0,5	
* Test HSD: poziom granulocytów obojętnochłonnych w grupie kontrolnej niższy niż w grupach II i IV; dodatkowo w grupie I niższy niż w grupie IV.				
limfocyty (10 ³ /mm ³)	kontrolna	8	1,3	F=4,778 p=0,005*
	I	5,8	1,4	
	II	7,8	2,5	
	III	6,4	1,2	
	IV	9,5	1,2	
* Test HSD: liczba limfocytów w grupie IV niż w grupach I i III.				

Tabela 29. Analiza zmian poszczególnych wskaźników w czasie (wartość startowa vs wartość po 4 tygodniach) – skład odsetkowy krwinek białych.

Wskaźnik	Grupa	Średnia zmiana	SD zmian	Mediana zmian	Zakres zmian (od-do)		Istotność zmian
granulocyty obojętnochłonne ($10^3/\text{mm}^3$)	kontrolna	0,12	0,16	0,11	-0,06	0,4	t=-1,881 p=0,119*
	I	-0,11	0,21	-0,09	-0,37	0,21	t=1,301 p=0,25*
	II	-0,64	0,42	-0,66	-1,26	-0,15	t=3,743 p=0,013*
	III	-0,52	0,3	-0,45	-0,88	-0,14	t=4,25 p=0,008*
	IV	-0,65	0,71	-0,87	-1,33	0,53	t=2,239 p=0,075*
limfocyty ($10^3/\text{mm}^3$)	kontrolna	0,51	1,48	0,7	-2,26	2,02	t=-0,847 p=0,436*
	I	0,82	0,94	0,28	0,08	2,22	V=0 p=0,031**
	II	-0,2	2,41	-0,21	-3,93	3,05	t=0,207 p=0,844*
	III	0,48	1,32	0,55	-1,51	2,43	t=-0,899 p=0,41*
	IV	-1,53	1,97	-0,95	-3,99	0,93	t=1,904 p=0,115*

* Zmiany okazały się mieć rozkład normalny; wykonano test t-Studenta dla par wiązanych

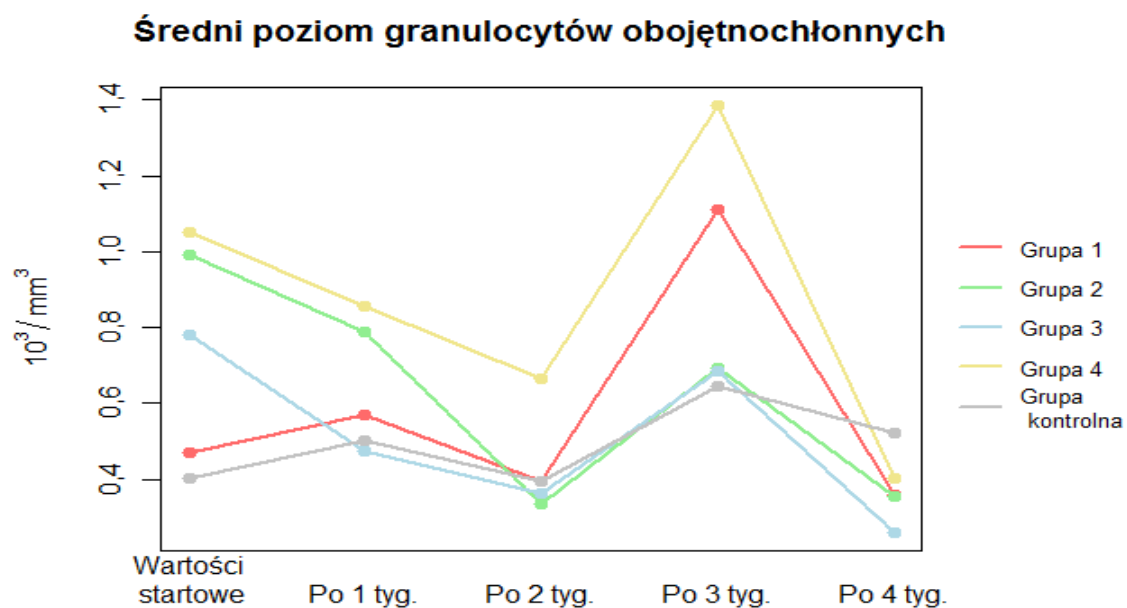
** Zmiany okazały się nie mieć rozkładu normalnego; wykonano test Wilcozona dla par wiązanych

Tabela 30. Granulocyty obojętnochłonne.

Granulocyty obojętnochłonne ($10^3/\text{mm}^3$)	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	0,4	0,2	0,5	0,3	1	0,4	0,8	0,3	1,1	0,5	F=4,486 p=0,007*
Po 1 tygodniu	0,5	0,2	0,6	0,3	0,8	0,6	0,5	0,2	0,9	0,2	F=1,756 p=0,169
Po 2 tygodniach	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3	0,1	0,4	0,1	0,7	0,3	F=2,265 p=0,091
Po 3 tygodniach	0,6	0,2	1,1	0,4	0,7	0,4	0,7	0,3	1,4	0,8	F=3,126 p=0,032**
Po 4 tygodniach	0,5	0,1	0,4	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	F=1,025 p=0,414

* Test HSD: poziom granulocytów obojętnochłonnych w grupie kontrolnej niższy niż w grupach II i IV; dodatkowo w grupie I niższy niż w grupie IV.

** Test HSD: poziom granulocytów obojętnochłonnych w grupie kontrolnej niższy niż w grupie II i IV.



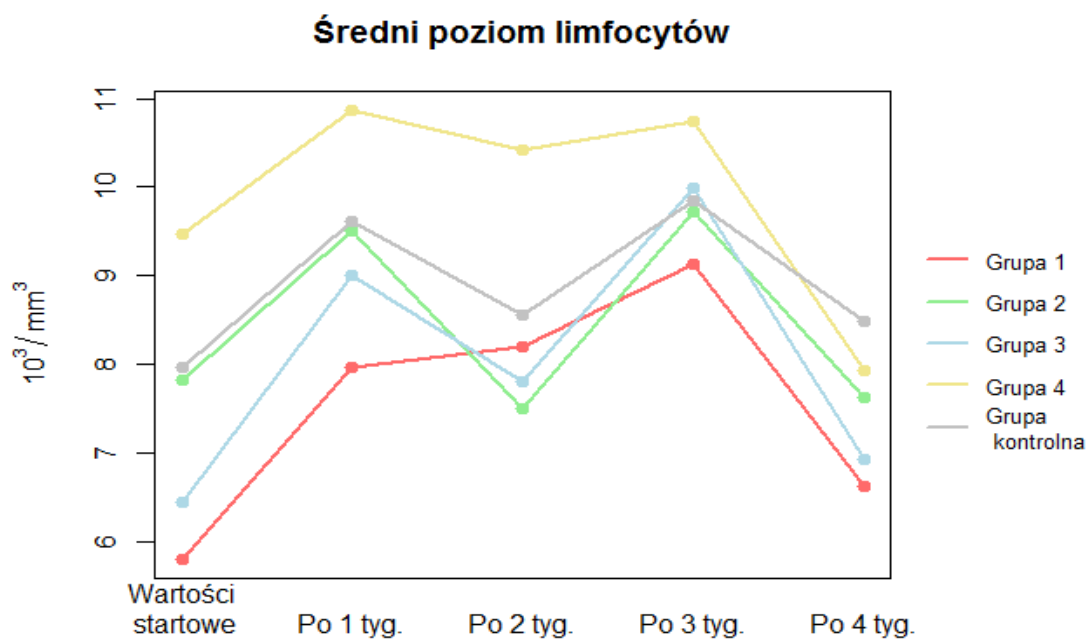
Rycina 25. Granulocyty obojętnochłonne.

Tabela 31. Limfocyty.

Limfocyty ($10^3/\text{mm}^3$)	Grupa kontrolna		Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV		ANOVA
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wartości startowe	8	1,3	5,8	1,4	7,8	2,5	6,4	1,2	9,5	1,2	F=4,778 p=0,005*
Po 1 tygodniu	9,6	1,6	8	1,1	9,5	1,2	9,	0,6	10,9	1,4	F=4,253 p=0,009**
Po 2 tygodniach	8,6	2,8	8,2	0,5	7,5	1,7	7,8	1,2	10,4	3,5	F=1,614 p=0,202
Po 3 tygodniach	9,8	2,8	9,1	1,3	9,7	2	10	3,1	10,7	2,3	F=0,347 p=0,843
Po 4 tygodniach	8,5	0,5	6,6	0,9	7,6	2	6,9	1	7,9	1,9	F=1,735 p=0,174

* Test HSD: poziom limfocytów w grupie IV wyższy niż w grupach I i III.

** Test HSD: poziom limfocytów w grupie IV wyższy niż w grupie I.



Rycina 26. Limfocyty.

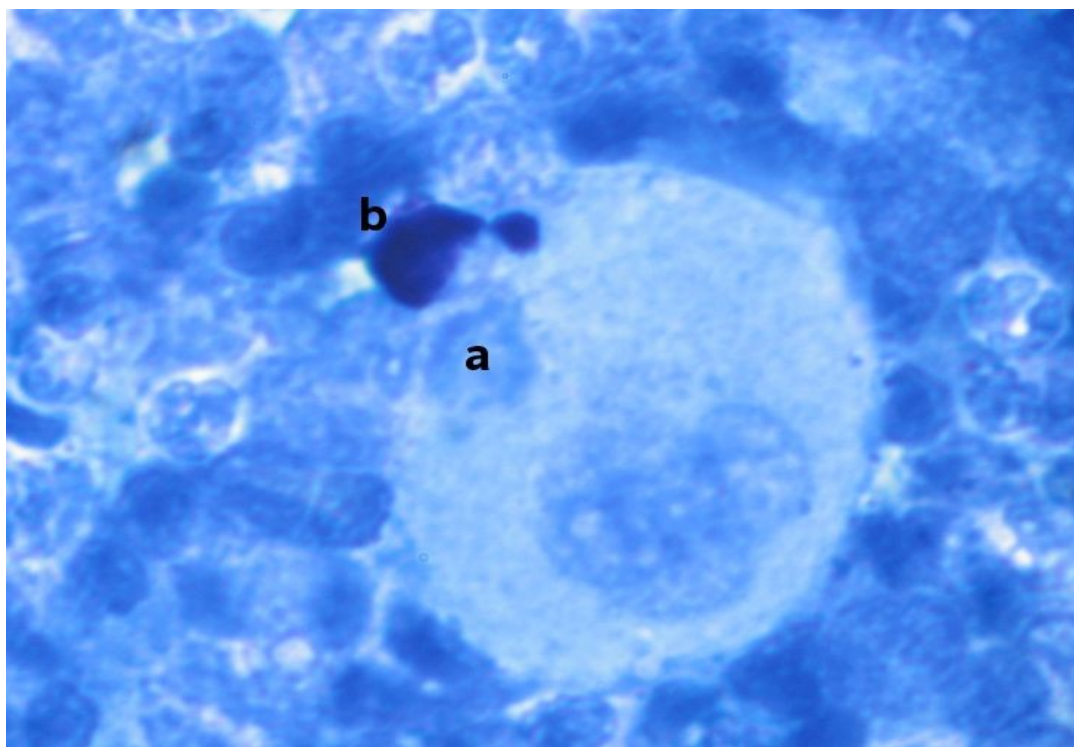
11.3. Ocena częstości występowania zjawiska emperipolezy.

Wykonanie:

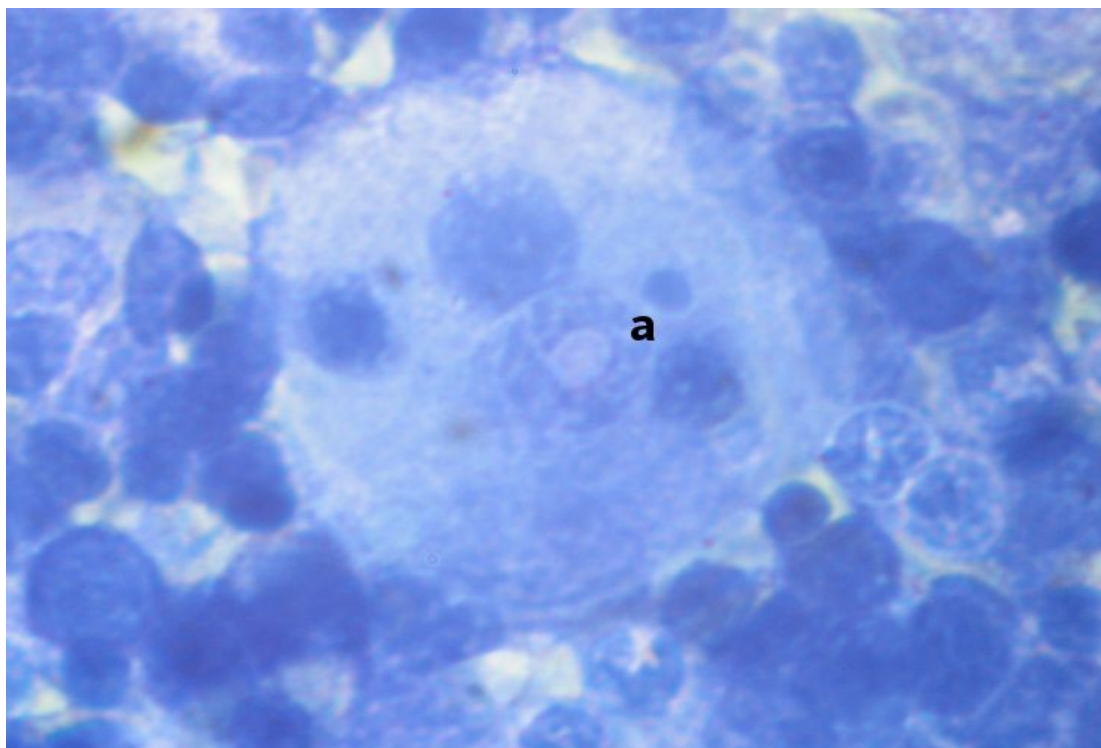
Po zakończeniu eksperymentu (opisanego w punkcie 11.1) od uśmierconych zwierząt pobrano szpik kostny z jamy szpikowej kości udowej. Wykonano rozmazy szpiku, które następnie utrwalono w metanolu. Rozmazy wybarwiono metodą Pappenheima za pomocą roztworu May-Grünwalda i Giemsy (MGG) [89]. Otrzymane preparaty oglądano pod mikroskopem w powiększeniu 100x, używając olejku immersyjnego.

Wyniki:

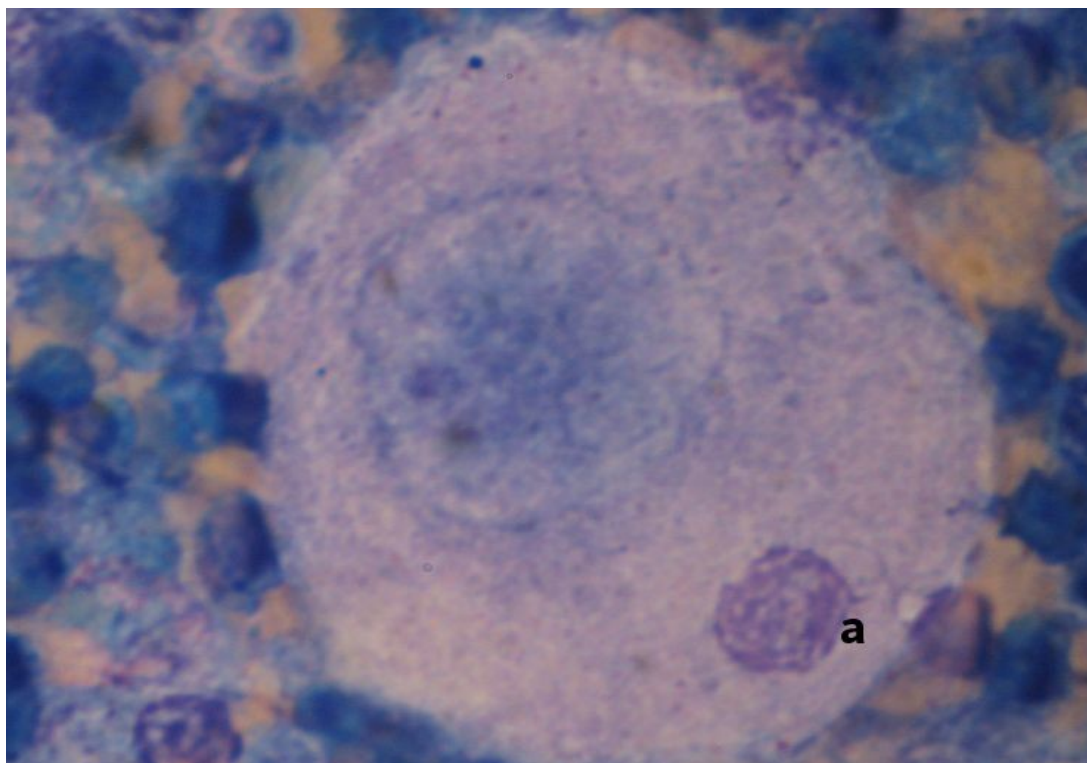
U wszystkich grup badanych zwierząt zaobserwowano zjawisko emperipolezy, którego przykłady udokumentowane zostały na zdjęciach (Ryciny 27-30). Zjawisko to występowało w średnio 5% przeliczonych megakariocytów, co mieściło się w granicach fizjologicznej normy.



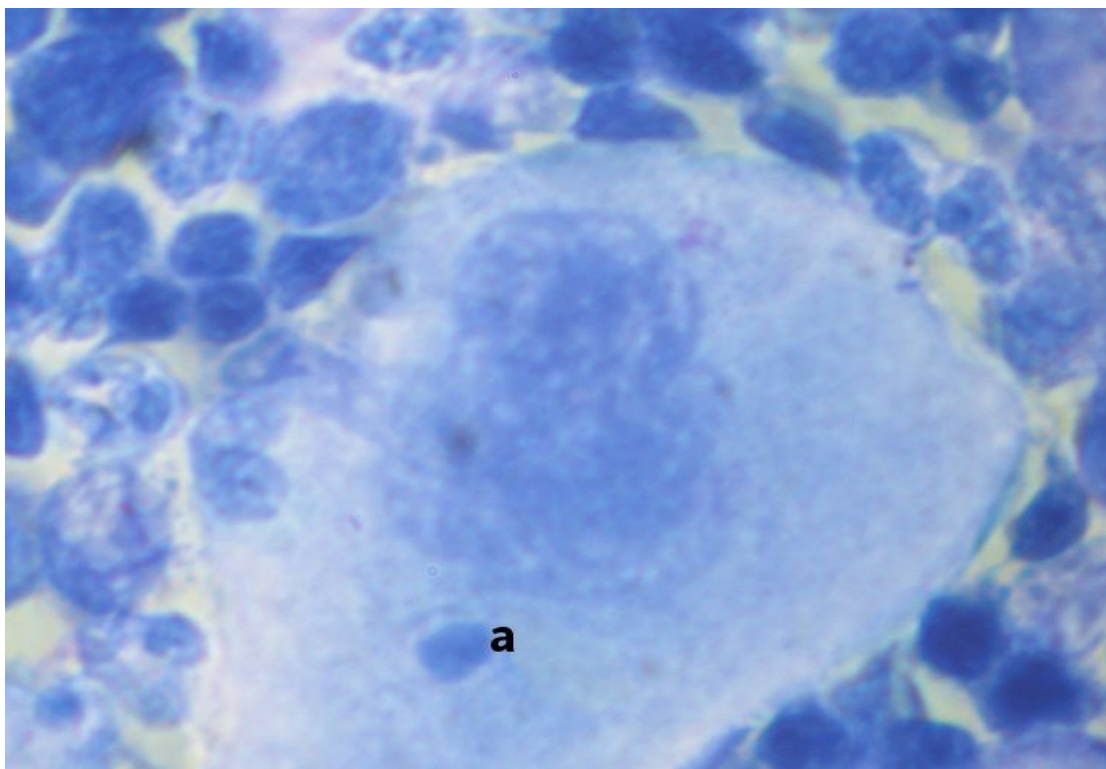
Rycina 27. Emperipoleza w szpiku kostnym u szczura. W cytoplazmie megakariocyta przy brzegu widoczny granulocyt (a). Do brzegu megakariocyta zbliżają się monocyty oraz erytrocyty, częściowo objęte jego cytoplazmą (b). Jądro megakariocyta wielopłatowe.



Rycina 28. W cytoplazmie megakariocyta liczne komórki szpikowe, wyraźnie zaznaczony granulocyt (a).



Rycina 29. W cytoplazmie megakariocyta widoczny nieokreślony mielocyt (a).



Rycina 30. W cytoplazmie megakariocyta widoczny mielocyt, prawdopodobnie erytroblast (a).

12. Ocena aktywności przeciwzapalnej *in vitro* metodą testu denaturacji albumin.

Wykonanie:

Badanie wykonano stosując zmodyfikowaną metodę opracowaną przez Mizushima i Kobayashi [105]. Badane związki rozpuszczono w jak najmniejszej ilości metanolu i rozcieńczono solą fizjologiczną, otrzymując roztwory o stężeniach 50, 100, 200, 300 i 500 µg/ml. Ilość metanolu w każdym roztworze była zawsze mniejsza niż 1%. Sporządzono 1% roztwór wodny albuminy bydlęcej (BSA, 98%, A7906, Sigma-Aldrich), który doprowadzono do odpowiedniego pH za pomocą niewielkich ilości 1% kwasu octowego. Następnie zmieszano po 500 µl badanego roztworu oraz roztworu albuminy bydlęcej i tak powstałą mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut, a następnie w temperaturze 70°C przez dalsze 15 minut. Stopień denaturacji albuminy określono metodą turbidymetryczną, za pomocą wielodetekcyjnego czytnika płytek (Synergy HT Biotek), badając turbidancję roztworu przy długości fali 660 nm.

Wyniki:

Uśrednione wartości otrzymanych pomiarów przedstawiono w tabeli 32. Stopień inhibicji denaturacji [% INH] obliczono ze wzoru:

$$\% \text{ INH} = \{ [T_{\text{kontroli}} - T_{\text{próby badanej}}] / T_{\text{kontroli}} \} \times 100\%$$

gdzie:

T_{kontroli} – uśredniona turbidancja próby kontrolnej negatywnej,

$T_{\text{próby badanej}}$ – uśredniona turbidancja próby badanej.

Tabela 32. Uśrednione wyniki pomiarów turbidancji wraz z odchyleniem standardowym (SD) oraz obliczonym stopniem zahamowania denaturacji dla każdej z badanych próbek i próbki wzorcowej.

Próbka	Rozcieńczenie	Uśredniona wartość turbidancji	SD	Stopień zahamowania denaturacji [%]
kontrola negatywna	1% r-r BSA	2,03	0,037	0
kontrola pozytywna (kwas acetylosalicylowy)	100 µg/ml	0,34	0,029	83,25
	200 µg/ml	0,049	0,003	97,57
wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego	50 µg/ml	1,926	0,034	5,12
	100 µg/ml	1,926	2,15	5,12
	200 µg/ml	2,019	0,03	0,5
	300 µg/ml	2,008	0,029	1,08
	500 µg/ml	1,936	0,096	4,63
wyciąg z surowca suchego	50 µg/ml	1,877	0,001	7,5
	100 µg/ml	1,823	0,043	10,19
	200 µg/ml	1,847	0,014	9,01
	300 µg/ml	1,839	0,024	9,4
	500 µg/ml	1,837	0,005	9,5
MGDG	50 µg/ml	1,938	0,059	4,53
	100 µg/ml	2,005	0,008	1,23
	200 µg/ml	2,002	0,025	1,38
	300 µg/ml	2,009	0,006	1,03
	500 µg/ml	1,988	0,005	2,06
DGDG	50 µg/ml	1,929	0,029	4,97
	100 µg/ml	1,921	0,033	5,36
	200 µg/ml	1,93	0,009	4,93
	300 µg/ml	1,908	0,011	6,01
	500 µg/ml	1,784	0,015	12,13

13. Ocena aktywności cytotoksycznej wyciągów oraz wyizolowanych mono- i digalaktozyliacyloglicerolu względem ludzkich oraz szczurzych komórek nowotworu prostaty oraz prawidłowych komórek nabłonka prostaty.

Wykonanie:

Badania przeprowadzono na szczurzych komórkach nowotworu prostaty AT-2, ludzkich komórkach nowotworu prostaty: o umiarkowanym stopniu złośliwości DU145 oraz wysokim stopniu złośliwości PC3, a także na prawidłowych ludzkich komórkach nabłonka prostaty PNT-2. Komórki hodowano w inkubatorze z atmosferą 5% CO₂, temperaturą 37°C i stałą wilgotnością, na pożywce DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz mieszaniny antybiotyków.

Przed doświadczeniem komórki oderwano od ścianek naczynia przy pomocy roztworu trypsyny i odwirowano. Uzyskaną zawiesinę komórek w płynie hodowlanym przeniesiono do 24-dółkowej płytki (gęstość komórek $1,5 \times 10^4$ /dółek). Po 24 godzinach inkubacji płyn zmieniono i dodano badaną substancję w zakresie stężeń od 10 do 100 µg/ml. Jako kontrolę pozytywną przyjęto zawiesinę komórek w płynie hodowlanym bez dodanej substancji badanej. Badane substancje rozpuszczano w metanolu, a następnie doprowadzano do odpowiednich stężeń metodą kolejnych rozcieńczeń w płynie hodowlanym. Komórki inkubowano z badaną substancją przez 24 godziny. Po tym czasie żywotność komórek określano kolorymetrycznym testem żywotności LDH, opierającym się na redukcji soli tetrazoliowych do formazanów, z wykorzystaniem czytnika spektrofotometrycznego. Do każdego dołka dodano odpowiednią ilość mieszaniny reakcyjnej, po wcześniejszym usunięciu płynu hodowlanego, i inkubowano w ciemności przez 30 minut. Jako kontrolę stosowano komórki bez dodanych związków (kontrola I, negatywna) oraz komórki z dodatkiem Triton X-100 (kontrola II, pozytywna). Jako dodatkową kontrolę pozytywną stosowano mitoksantron, cytostatyk wykorzystywany w terapii nowotworów prostaty. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali 490 nm (długość fali odniesienia nie mniej niż 600 nm). Każde doświadczenie powtarzano trzykrotnie.

Wyniki:

Cytotoksyczność badanych substancji obliczano według wzoru:

$$CYT = [(Abs_{subst.badanej} - Abs_{kontroli\ I}) : (Abs_{kontroli\ II} - Abs_{kontroli\ I})] \times 100\%$$

gdzie:

$Abs_{subst.badanej}$ – absorbancja dla poszczególnych substancji badanych,

$Abs_{kontroli\ I}$ – absorbancja komórek bez dodatku substancji badanych,

$Abs_{kontroli\ II}$ – absorbancja komórek z dodatkiem Tritonu X-100.

Wyniki (w postaci średniej z trzech odczytów, wraz z odchyleniem standardowym SD) dla poszczególnych linii komórkowych przedstawiają tabele 33-36. Wynik dla mitoksantronu przedstawiono w tabeli 37.

Tabela 33. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek AT-2.

Stężenie [µg/ml]	Ilość komórek martwych [%] ± SD			
	Wyciąg z surowca stabilizowanego	Wyciąg z surowca suszonego	DGDG	MGDG
10	0	5,4 ± 0,98	0	0
20	0	13,07 ± 1,86	0	0
30	0	18,29 ± 2,34	0	0
50	0	25,81 ± 3,12	10,30 ± 1,85	0
100	15,85 ± 2,57	52,44 ± 5,23	24,39 ± 2,88	0

Tabela 34. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek DU145.

Stężenie [µg/ml]	Ilość komórek martwych [%] ± SD			
	Wyciąg z surowca stabilizowanego	Wyciąg z surowca suszonego	DGDG	MGDG
10	1,45±0,21	5,79±0,21	15,94±1,22	17,39±1,65
20	4,35±0,54	21,74±2,79	20,29±1,87	21,74±1,99
30	7,25±0,87	46,38±3,98	24,64±2,33	30,43±2,12
50	28,98±3,32	62,32±5,64	49,27±4,27	42,03±2,26
100	40,58±4,89	97,10±6,39	52,17±4,90	57,97±4,14

Tabela 35. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek PC3.

Stężenie [µg/ml]	Ilość komórek martwych [%] ± SD			
	Wyciąg z surowca stabilizowanego	Wyciąg z surowca suszonego	DGDG	MGDG
10	0	0	0	0
20	0	6,07±0,05	0	0
30	16,23±1,08	24,58±1,04	0	0
50	26,34±1,23	48,66±2,78	4,08±0,02	8,53±0,45
100	38,75±1,96	76,45±5,96	14,67±0,98	22,76±1,74

Tabela 36. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek PNT-2.

Stężenie [µg/ml]	Ilość komórek martwych [%] ± SD			
	Wyciąg z surowca stabilizowanego	Wyciąg z surowca suszonego	DGDG	MGDG
10	8,58±0,78	2,61±0,08	0	1,49±0,03
20	11,19±0,93	6,72±0,45	1,86±0,03	11,19±0,25
30	13,43±0,98	7,84±0,59	5,97±0,07	14,93±0,84
50	19,03±1,05	8,58±0,71	6,72±0,07	17,16±1,12
100	25,75±1,27	10,82±0,83	6,34±0,10	19,78±1,21

Tabela 37. Wpływ mitoksantronu na żywotność komórek DU145, PC3 i PNT-2.

	DU145	PC3	PNT-2
IC ₅₀ [µg/ml]	>5	2	0,45

14. Omówienie i dyskusja wyników.

14.1. Wprowadzenie.

Przymiotno kanadyjskie (*Erigeron canadensis* L. Cronq) jest rośliną występującą popularnie w całej Europie, w tym w Polsce. Od dawna jest stosowana w medycynie tradycyjnej jako środek o działaniu przeciwzapalnym, przeciwkrwotocznym i diuretycznym. Zalecenia te jednak nie znajdują swojego potwierdzenia w badaniach naukowych. Zwłaszcza podstawowe zastosowanie surowca – jako środka przeciwkrwotocznego, do dziś pozostaje niezweryfikowane. Mimo to na rynku aptecznym dostępny jest lek zawierający w swoim składzie wyciąg gęsty z ziela przymiotna kanadyjskiego – HEMORIGEN®, który, według obecnych wskazań producenta, może być stosowany jako pomocniczy środek w leczeniu siniaków oraz stłuczeń. Wcześniej zalecany był jako lek mający zmniejszać krwawienia z dróg rodnych u kobiet (np. przy zbyt obfitych miesiączkach), krwawienia z hemoroidów, czy też krwawienia pooperacyjne, obecnie jednak, ze względu na brak odpowiednich badań, wskazania te zostały zmienione.

Przymiotno kanadyjskie jest rośliną o dobrze poznanym chemizmie. Liczne badania fitochemiczne donoszą o obecności flawonoidów [14,15,16,17,18], garbników [14], fenolokwasów [14,17,18,20], olejku eterycznego [12,13,14,15], związków triterpenowych [15,16,17,18,22,29], lipidów [15,16,18,28,29] oraz innych, nie dających się zaklasyfikować do wyżej wymienionych grup związków [15,16,17,20,29]. Istnieje również sporo doniesień literaturowych dotyczących aktywności biologicznej oraz farmakologicznej różnego rodzaju wyciągów bądź związków wyizolowanych z ziela przymiotna. Dotychczas opisany został wpływ wyciągów z ziela lub odpowiednich frakcji z nich uzyskanych, na agregację płytek krwi [50,51], ich działanie przeciwzakrzepowe [44] oraz przeciwutleniające [50,53,62]. Sporo prac dotyczy również cytotoksycznego działania wyciągów bądź izolowanych z nich związków [15,18,53,54].

Galaktozyłodiacyloglicerole, takie jak mono- oraz digalaktozyłodiacyloglicerol, są glikolipidami najpowszechniej występującymi w świecie przyrody. Wchodzą one w skład chloroplastów odgrywając istotną rolę w procesie fotosyntezy [65]. W licznych badaniach wykazano ich aktywność przeciwnowotworową i cytotoksyczną [66,67,68,69], a także przeciwzapalną [73,74,75,79].

14.2. Uzasadnienie celu i założeń pracy.

Prace nad składem chemicznym oraz aktywnością przetworów z ziela przymiotna kanadyjskiego prowadzone były w Katedrze Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie od lat 90-tych. Opisana w nich została analiza fitochemiczna wyciągów otrzymanych z rośliny, podjęte zostały także próby oceny ich aktywności biologicznej. Duże zainteresowanie gatunkiem oraz konieczność poszerzenia dotychczasowych badań zaowocowały powstaniem niniejszej pracy. Podstawowymi jej celami było porównanie metodami chromatograficznymi wyciągów metanолоwych z surowca świeżego stabilizowanego oraz suszonego, a także izolacja, określenie struktury oraz zmian dynamiki kumulacji dominujących związków różnicujących te wyciągi. W pracy określono również wpływ wyciągów z surowca świeżego stabilizowanego i suszonego na podstawowe wskaźniki hematologiczne krwi obwodowej oraz zjawisko emperipolezy w szpiku kostnym w badaniu przeprowadzonym *in vivo*. Dokonano także oceny aktywności przeciwzapalnej i cytotoksycznej zarówno wyciągów, jak i wyizolowanych związków. Przeprowadzone badania miały zweryfikować tradycyjne wskazania do stosowania surowca oraz ocenić jaki surowiec, świeży czy suszony, wywiera korzystniejsze działanie.

Tradycyjne wskazania do stosowania surowca obejmujące m.in. krwawienia z hemoroidów, ran pooperacyjnych, czy też dróg rodnych u kobiet nie znajdują potwierdzenia w danych literaturowych. Część doniesień obecnych w literaturze, np. jakoby stosowanie przetworów z ziela przymiotna kanadyjskiego miało zwiększać poziom płytek krwi [33,34,44], nie znajduje natomiast pokrycia w danych eksperymentalnych. Przymiotno kanadyjskie może być również stosowane jako środek o działaniu przeciwzapalnym w lumbago i artretyzmie [12,34,35]. Istnieje tylko jedno doniesienie potwierdzające działanie przeciwzapalne wyciągów z suszonego surowca [43]. Nie ma natomiast żadnych danych dotyczących wyciągów sporządzonych z surowca świeżego.

Niepełne dane dotyczące wskazań do stosowania rośliny w konkretnych schorzeniach zaowocowały pomysłem aby je rozszerzyć i uzupełnić brakujące informacje. Badania prowadzone były równolegle na ekstraktach z surowca suszonego oraz świeżego, który poddany został stabilizacji wrzącym metanolem. Wszystkie dotychczasowe badania fitochemiczne (Rozdział 3) były przeprowadzane na surowcu suszonym i to właśnie z surowca suszonego wyizolowane zostały opisywane w literaturze związki. Surowiec świeży w pracach tych nie był uwzględniany, podczas gdy wstępna analiza chromatograficzna przeprowadzona metodą TLC wykazała istotne różnice jakościowe pomiędzy wyciągami sporządzonymi z surowca świeżego stabilizowanego oraz suszonego. Dominujące związki różniące wyciągi zostały wyizolowane oraz zidentyfikowane jako mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerol. Związki te posiadają udokumentowane działanie

przeciwzapalne [75,78,79], co stanowiło dodatkowy przyczynek do zbadania aktywności przeciwzapalnej wyciągu z surowca świeżego. Do identyfikacji opisywanych wyżej związków wykorzystane zostały metody spektralne (NMR, MS) oraz porównanie (metodami TLC i HPLC) izolatów z komercyjnie dostępnymi wzorcami. Obecność tych struktur w przymiotnie kanadyjskim stwierdzona została po raz pierwszy. Określono również zmiany dynamiki kumulacji tych związków w zależności od okresu wegetacyjnego w jakim znajduje się roślina. W celu wykonania takiego oznaczenia opracowano oraz zwalidowano metodę densytometryczną, która była przedmiotem publikacji [90]. Dotychczas do oznaczeń ilościowych tych związków wykorzystywana była metoda HPLC [85,86]. W jednej pracy istnieje wzmianka na temat możliwości oznaczania galaktozylodiacyllogliceroli za pomocą densytometrii [68].

Kolejny aspekt niniejszej pracy doktorskiej dotyczył określenia wpływu wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego na wybrane wskaźniki hematologiczne krwi. Badanie to zostało przeprowadzone *in vivo*, z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. W eksperymencie oceniono wskaźniki hematologiczne krwi u zwierząt otrzymujących codziennie określone dawki wyciągów z surowca suszonego i świeżego stabilizowanego, wykonano także rozmazy krwi mające na celu określenie wpływu na układ białokrwinkowy oraz rozmazy szpiku, w których oceniono częstotliwość występowania zjawiska emperipolezy. Medycyna tradycyjna zaleca przetwory z ziela przymiotna jako środek o działaniu przeciwkrwotocznym oraz podwyższającym liczbę płytek krwi [33,34,44]. Nie istnieją jednak żadne badania, które mogłyby potwierdzić skuteczność oraz zasadność stosowania przymiotna w wyżej wymienionych wskazaniach. Badanie wpływu wyciągów na wskaźniki hematologiczne krwi jest podstawowym badaniem jakie należy przeprowadzić w celu weryfikacji opisywanych wyżej wskazań. W niniejszej pracy zostało to zrobione po raz pierwszy.

Jak już wspomniano, przymiotno kanadyjskie może być stosowane jako środek o działaniu przeciwzapalnym w lumbago i artretyzmie [12,34,35]. Literatura donosi o aktywności przeciwzapalnej wyciągów z surowca suszonego [43], jednak brak jest informacji na temat działania wyciągów z surowca świeżego. Bogata zawartość galaktozylodiacyllogliceroli w takim surowcu sugerować może jego znaczną aktywność przeciwzapalną. Zarówno wyciągi jak i wyizolowane związki poddane zostały badaniom mającym na celu ocenę takiej aktywności. Dokonano jej w oparciu o test denaturacji albumin (albumin denaturation assay), gdzie porównano działanie wyciągu metanolowego z surowca świeżego stabilizowanego i suszonego oraz wyizolowanych galaktozylodiacyllogliceroli. Test denaturacji albumin jest szybkim testem skriningowym pozwalającym na wstępną ocenę aktywności przeciwzapalnej zarówno substancji pochodzenia naturalnego [91,92,93,94] jak i syntetycznych [95].

Ostatnim aspektem pracy doktorskiej była ocena aktywności cytotoksycznej wyciągów oraz

wyizolowanych galaktozyldiacylgliceroli względem ludzkich oraz szczurzych linii komórkowych nowotworu prostaty. Bezpośrednim przyczynkiem do wykonania tego rodzaju badań były liczne doniesienia literaturowe dotyczące aktywności cytotoksycznej wyciągów oraz różnego rodzaju związków wyizolowanych z ziela przymiotna kanadyjskiego [15,18,53,54,55]. Do tej pory określono aktywność wyciągów oraz różnych związków z nich wyizolowanych względem linii komórkowych Hep-2 (nowotwór krtani), MCF7 (nowotwór piersi), HeLa (nowotwór jajnika), A431 (nowotwór nabłonka) oraz mysich komórek czerniaka B16. Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki niektórych z cytowanych w punkcie 4.5.1. badań są obiecujące, zasadne wydaje się poszerzenie tych badań o nieprzebadane do tej pory ludzkie linie komórkowe nowotworu prostaty DU145 i PC3, szczurzą linię komórkową nowotworu prostaty AT-2 oraz ludzką prawidłową linię komórkową nabłonka prostaty PNT-2.

14.3. Analiza porównawcza wyciągów.

Pierwszym etapem prac była analiza porównawcza sporządzonych wyciągów metanolowych. Przeprowadzono ją metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC.

Do chromatografii cienkowarstwowej wykorzystano fazę ruchomą chloroform-metanol-kwas octowy 1% 40:10:1, dla której rozdział związków obecnych w wyciągach był najwyraźniejszy. Fazę tą dobrano empirycznie, spośród kilku testowanych faz ruchomych (chloroform:metanol, 40:10, chloroform:metanol:woda, 23:12:2, chloroform:metanol:kwas octowy 1%, 40:10:1, chloroform:metanol:amoniak 25%, 40:10:2). Chromatogramy wywołano poprzez spryskanie 25% metanolowym roztworem kwasu siarkowego (VI) i ogrzanie. Na chromatogramie, w świetle widzialnym zaobserwowano obecność dwóch plam barwy czerwono-fioletowej, o współczynnikach R_f 0,48 i 0,8, w wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego, które nie występowały w wyciągu z surowca suszonego (Rycina 4). W świetle UV przy długościach fali 254 i 365 nm plamy dawały pomarańczową fluorescencję. Związkom tym nadano wstępne nazwy: EC₁ dla związku o współczynniku R_f 0,48 i EC₂ dla związku o współczynniku R_f 0,8.

14.3.1. Izolacja związków EC₁ i EC₂ z wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego.

Kolejnym etapem pracy była izolacja związków EC₁ i EC₂ z wyciągu z surowca świeżego. W tym celu zastosowano metodę średniociśnieniowej chromatografii kolumnowej (MPLC), która pozwoliła uzyskać wstępnie oczyszczone frakcje zawierające związki badane. Metoda MPLC jest odpowiednikiem tradycyjnej metody chromatografii kolumnowej, z tą jednak różnicą, że

czynnikiem determinującym rozdział badanej mieszaniny związków jest nie siła grawitacyjna, a ciśnienie wytwarzane przez dwie pompy. Zaletami tej metody są skrócenie czasu analizy oraz lepsza rozdzielczość analizowanych związków. Uzyskane wstępnie oczyszczone związki były następnie doczyszczane za pomocą cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej TLC, co pozwoliło uzyskać po 20 mg czystego związku EC₁ i EC₂. Cienkowarstwowa chromatografia preparatywna przeprowadzona została w warunkach opisanych w punkcie 9.4.

14.3.2. Identyfikacja związków EC₁ i EC₂.

W celu identyfikacji oczyszczonych związków poddano je analizie widmowej. Wykonane zostały widma ¹H NMR, ¹³C NMR oraz FAB MS.

W przypadku związku EC₁ w widmie ¹³C NMR stwierdzono obecność sygnałów pochodzących od atomów węgla przy grupach metylowych, metylenowych oraz atomów węgla przy wiązaniach podwójnych kwasów tłuszczowych, a także charakterystyczne sygnały pochodzące od atomów węgla grup karbonylowych. Słaby sygnał przy 69,9 ppm przyporządkować można atomowi węgla C2 cząsteczki glicerolu. Sygnały w zakresie od 70 do 77 ppm pochodzą od atomów węgla w cząsteczce cukru. W widmie ¹H NMR widoczne są sygnały protonów grup metylowych oraz grup metylenowych pochodzących od reszt acylowych kwasów tłuszczowych. Sygnały protonów grup metylenowych są przesunięte w zależności od lokalizacji względem karbonylu – im bliżej karbonylu znajduje się grupa metylenowa, tym większe jest przesunięcie chemiczne. Widmo FAB MS związku EC₁ pozwoliło ustalić jego masę, która wyniosła 959,5 [M⁺+Na]. Kolejnym etapem było przeprowadzenie analizy profilu kwasów tłuszczowych. W tym celu, zgodnie z obowiązującymi wytycznymi [86], przeprowadzona została analiza GLC związku EC₁. Jako wzorzec zastosowano standardową mieszaninę estrów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Stwierdzono, iż w cząsteczce związku EC₁ dominującym kwasem tłuszczowym jest kwas α-linolenowy (C-18:3 n-3), który stanowił ponad 50% wszystkich rodzajów kwasów tłuszczowych jakie w nim występują. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że badany związek jest glicerolem zestryfikowanym przy dwóch grupach OH cząsteczkami kwasów tłuszczowych oraz jedną cząsteczką cukru przy trzeciej grupie OH. Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi [82] pozwoliło stwierdzić, że badany związek EC₁ jest digalaktozyloglicerolem, a pełna jego struktura określona została jako 1,2-di-O-α-linolen-3-digalaktozyloglicerol. Związek ten z ziela przymiotna kanadyjskiego wyizolowany został po raz pierwszy.

Związek EC₂ w widmie ¹³C NMR wykazał obecność sygnałów pochodzących od atomów

węgla przy grupach metylowych, metylenowych oraz atomów węgla przy wiązaniach podwójnych kwasów tłuszczowych, a także charakterystyczne sygnały pochodzące od atomów węgla grup karbonylowych. Obecne są także sygnały przy 62,9 ppm, które przyporządkować można atomowi węgla C1 cząsteczki glicerolu oraz przy 70,1 ppm pochodzące od węgla C2 glicerolu. Sygnały w zakresie od 70 do 77 ppm pochodzą od atomów węgla w cząsteczce cukru. W widmie ^1H NMR widoczne są sygnały protonów grup metylowych oraz grup metylenowych pochodzące od reszt acylowych kwasów tłuszczowych. Sygnały protonów grup metylenowych są przesunięte w zależności od lokalizacji względem karbonyłu – im bliżej karbonyłu znajduje się grupa metylenowa, tym większe jest przesunięcie chemiczne. Widmo FAB MS związku EC₂ pozwoliło ustalić jego masę, która wyniosła 797,4 [$\text{M}^+ + \text{Na}$]. W celu ustalenia profilu kwasów tłuszczowych cząsteczkę związku EC₂ poddano, zgodnie z obowiązującymi wytycznymi [87], analizie GLC. Jako wzorzec zastosowano standardową mieszaninę estrów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Stwierdzono, iż w cząsteczce związku EC₂ dominującym kwasem tłuszczowym jest, podobnie jak w cząsteczce związku EC₁ kwas α -linolenowy (C-18:3 n-3), który stanowił aż ponad 89% wszystkich rodzajów kwasów tłuszczowych jakie w nim występują. Mniejsza niż w przypadku związku EC₁ masa cząsteczkowa, wskazuje na mniejszą liczbę cząsteczek cukru w cząsteczce związku EC₂. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że badany związek jest glicerolem zestryfikowanym przy dwóch grupach OH cząsteczkami kwasów tłuszczowych oraz jedną cząsteczką cukru przy trzeciej grupie OH. Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi [82,84] pozwoliło stwierdzić, że badany związek EC₂ jest monogalaktozylodiacylglicerolem, a pełna jego struktura określona została jako 1,2-di-O- α -linoleno-3-galaktozylglicerol. Związek ten, podobnie jak związek EC₁, z ziela przymiotna kanadyjskiego wyizolowany został po raz pierwszy.

W celu weryfikacji ustalonej wcześniej opisywanymi metodami tożsamości związków EC₁ i EC₂, dokonano ich porównawczej analizy z komercyjnie dostępnymi wzorcami mono- oraz digalaktozylodiacylglicerolu. Analizę tą przeprowadzono z wykorzystaniem metod chromatograficznych TLC oraz HPLC. Porównane zostały także widma ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz FAB MS związków wyizolowanych oraz odpowiadających im związków wzorcowych.

Analiza TLC przeprowadzona została w opisywanych wcześniej w punkcie 9.2. warunkach. Współczynniki R_f zakupionych wzorców mono- oraz digalaktozylodiacylglicerolu okazały się być identyczne z współczynnikami R_f wyizolowanych, odpowiadających im związków. Także kolor oraz struktura plam substancji wyizolowanych była zgodna z wzorcowymi (Rycina 11). Cienkowarstwowa analiza chromatograficzna galaktolipidów jest uznaną, opisywaną w literaturze metodą pozwalającą rozdzielić różne ich klasy [96], co tłumaczy zasadność użycia jej w tym celu.

HPLC jest dogodną metodą chromatograficzną, którą wykorzystywać można z powodzeniem nie tylko do rozdzielania, ale także identyfikacji różnych klas lipidów, w tym galaktozylodiacyllogliceroli [85,86]. Najczęściej stosowanymi fazami ruchomymi jest chloroform oraz mieszanina metanolu i wody, stosowana w odpowiednim gradiencie [85], istnieją jednak także modyfikacje polegające na dodatku acetonu do mieszaniny metanolu i wody [86]. W analizie opisywanej w niniejszej pracy zastosowano odmienną niż w literaturze fazę ruchomą, która okazała się wystarczająca do przeprowadzanej analizy porównawczej. Na chromatogramach HPLC związków EC₁ i EC₂ (Rycina 12 i 13) zaobserwowano pik o czasie retencji odpowiadającym czasom retencji substancji wzorcowych: digalaktozylodiacylloglicerolu (Rt 5,850) oraz monogalaktozylodiacylloglicerolu (Rt 5,883).

Porównanie widm ¹H NMR, ¹³C NMR oraz FAB MS wykazało brak istotnych różnic pomiędzy wyizolowanymi związkami EC₁ i EC₂ a wzorcami mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerolu.

14.4. Ilościowa analiza zmian zawartości mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerolu w zależności od okresu wegetacji rośliny metodą densytometryczną.

Celem wykonywanej analizy ilościowej było określenie zmian dynamiki kumulacji mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerolu w ziele przymiotna kanadyjskiego w zależności od okresu wegetacji rośliny. W tym celu została opracowana oraz zwalidowana metoda densytometryczna [88], za pomocą której wykonane zostało oznaczenie. Zwykle do oznaczeń ilościowych galaktozylodiacyllogliceroli stosowana jest technika HPLC [85,86]. W literaturze istnieją jednak doniesienia na temat możliwości zastosowania metody densytometrycznej, jak w przypadku ilościowego oznaczenia mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerolu w liściach szpinaku [68].

Analizę zmian dynamiki kumulacji mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerolu rozpoczęto od zbioru surowca, który wykonywany był co 2 tygodnie. Zawsze zbierana była ta sama ilość surowca, z tego samego stanowiska. Niezwłocznie po zbiorze, z surowca sporządzano wyciągi zgodnie z procedurą opisywaną w punkcie 9.1.b. Próbkami tak przygotowanych wyciągów, wraz z uprzednio przygotowanymi próbkami roztworów wzorcowych, analizowano metodą TLC w warunkach opisywanych w rozdziale 9.2. Po wywołaniu chromatogramy skanowano przy empirycznie dobranej długości fali 477 nm, a zmierzone pola powierzchni otrzymanych pików posłużyły do obliczenia zawartości badanych związków. Opracowana metoda została zwalidowana poprzez określenie takich parametrów jak liniowość, specyficzność, precyzja, odzysk, granica wykrywalności oraz granica oznaczalności zgodnie z wytycznymi ICH [97,98]. Specyficzność

określono poprzez porównanie chromatogramów roztworów substancji wzorcowych z chromatogramami roztworów badanych wyciągów. Tożsamość otrzymanych plam potwierdzono porównując ich współczynniki R_f oraz zakresy absorpcji poszczególnych pików. Liniowość określono w oparciu o stosunek pomiędzy średnim polem powierzchni danego pików, a ilością substancji (wyrażoną w μg) przypadającą na daną plamę. Przedstawiona została ona za pomocą równania regresji oraz współczynnika korelacji r . Wykonano także test reszt (residual test). Krzywą wzorcową wykorzystaną do ilościowego oznaczenia zawartości MGDG oraz DGDG przygotowano w oparciu o analizę 6 roztworów wzorcowych tych substancji o różnych stężeniach (zakres 25 – 275 $\mu\text{g/ml}$). Granica wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ) została obliczona w oparciu o współczynnik a krzywej wzorcowej oraz błąd standardowy reszt za pomocą równań: $\text{LOD}=3,3 \times S_y \cdot a^{-1}$, $\text{LOQ}=10 \times S_y \cdot a^{-1}$. Powtarzalność metody określono poprzez wykonanie pięciokrotnej analizy trzech roztworów wzorcowych (o stężeniach 75, 150 i 225 $\mu\text{g/ml}$) w tych samych warunkach pracy, w krótkich odstępach czasu. Precyzję średnioterminową określono poprzez analizę roztworów o tych samych stężeniach przez różnych analitików wykonujących tą samą analizę w tygodniowym odstępie. Odzysk określono definiując jaki procent składnika dodanego do roztworu wyciągu stanowi składnik w nim określany. W tym celu do trzech roztworów wyciągu o znanym stężeniu dodano roztwory substancji wzorcowych o stężeniu wynoszącym 80, 100 i 120% znanego stężenia roztworów wyciągów. Każdy roztwór analizowano trzykrotnie, do obliczeń wykorzystując otrzymaną średnią z 9 pomiarów.

Otrzymane wyniki (Tabela 16, Rycina 15 i 16) wskazują, że zawartość digalaktozylodiacylloglicerolu w świeżym ziele przymiotna kanadyjskiego jest znacznie większa niż monogalaktozylodiacylloglicerolu. Ilość obu oznaczanych w danym okresie galaktozylodiacyllogliceroli utrzymuje się stale na tym samym poziomie. Niewielkie wahania ich zawartości w poszczególnych okresach zbioru, są najprawdopodobniej wynikiem zmiennych warunków pogodowych oraz wpływu czynników środowiskowych.

Podsumowując, można stwierdzić iż opracowana metoda stanowi dobrą alternatywę do ilościowego oznaczania galaktozylodiacyllogliceroli dla metody HPLC. Można stosować ją również do oznaczania zawartości tych związków w innych roślinach.

14.5. Ocena wpływu wyciągów z ziele przymiotna kanadyjskiego na wybrane wskaźniki hematologiczne krwi u szczurów.

Ziele przymiotna kanadyjskiego jest tradycyjnym środkiem przeciwkrwotocznym, stosowanym w hamowaniu krwotoków z hemoroidów, dróg rodnych oraz ran pooperacyjnych

[12,33,34,44]. Brak jest jednak odpowiednich danych literaturowych, które mogłyby potwierdzić zasadność stosowania surowca w wyżej wymienionych wskazaniach. Istnieją także doniesienia, iż przyjmowanie przetworów z ziela miało zwiększać liczbę płytek krwi oraz skracać czas krzepnięcia [33,34,44]. One również nie znajdują swojego potwierdzenia w literaturze. Tylko jedno doniesienie literaturowe opisuje skrócenie czasu krwawienia naciętego ogona u myszy zarówno po zewnętrznym jak i wewnętrznym zastosowaniu różnego rodzaju przetworów z ziela przymiotna kanadyjskiego [49]. Skrócenie czasu krwawienia występujące w tym przypadku można przypisać bogatej zawartości flawonoidów oraz garbników w ziele rośliny, które jak wiadomo, mogą działanie takie wywierać poprzez uszczelniający wpływ na naczynia włosowate [45,46,47,48] oraz tworzenie nierozpuszczalnych garbnikanów po połączeniu się z białkami [45]. Niepotwierdzone pozostają doniesienia o rzekomym pozytywnym wpływie przetworów z ziela przymiotna kanadyjskiego na liczbę płytek krwi.

Celem badania było określenie wpływu wyciągów z surowca świeżego stabilizowanego oraz z surowca suszonego na wskaźniki hematologiczne, w tym liczbę płytek krwi. Badanie to przeprowadzone zostało *in vivo*, na szczurach rasy Wistar. Oprócz wskaźników hematologicznych krwi, ocenie poddano również rozmazy krwi, które miały na celu uwidocznienie ewentualnych zmian w układzie białokrwinkowym oraz częstość występowania zjawiska emperipolezy w szpiku kostnym, który pobrany został na końcu eksperymentu, po uśmierceniu zwierząt.

14.5.1. Ocena wskaźników hematologicznych krwi.

a) RBC (erytrocyty)

Porównanie początkowej ilości erytrocytów w każdej grupie zwierząt nie wykazało istotnych statystycznie różnic. Analiza statystyczna wykazała, że po czwartym tygodniu eksperymentu, ilość erytrocytów w każdej z badanych grup, w tym także w grupie kontrolnej była istotnie statystycznie wyższa niż na początku eksperymentu. Należy jednak zauważyć, że nie udało się zaobserwować żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami na żadnym etapie eksperymentu. Wywnioskować można więc, że wzrost ilości erytrocytów jest zjawiskiem naturalnym, będącym efektem dojrzewania zwierzęcia. Należy zauważyć, że ilość erytrocytów u poszczególnych grup zwierząt przez cały czas trwania eksperymentu mieściła się w granicach norm podawanych przez literaturę [99].

b) HCT (hematokryt)

Porównanie hematokrytu we wszystkich grupach na początku eksperymentu nie wykazało pomiędzy nimi istotnych statystycznie różnic. Podczas trwania eksperymentu również nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w wartościach hematokrytu pomiędzy grupami. Jedynie w czwartym tygodniu eksperymentu grupa III miała istotnie wyższy hematokryt niż grupa I. W pozostałych grupach różnic nie stwierdzono. Hematokryt jest frakcją objętościową erytrocytów w pełnej krwi. Jego wartość zależy od takich czynników jak nawodnienie organizmu czy ilość erytrocytów [89]. Nieznaczne wahania poziomu hematokrytu w trakcie trwania badania, w tym także widoczny na wykresie (Rycina 18) silny jego wzrost w grupie III, przypisać należy raczej fizjologicznym procesom wzrostu i rozwoju zwierzęcia, niż wpływowi testowanych wyciągów. Za takim wyjaśnieniem przemawia również fakt, iż podczas trwania eksperymentu, liczba erytrocytów u szczurów nie ulegała istotnie znaczącym wahaniom. Dane literaturowe opisujące badania wpływu wyciągów roślinnych na wskaźniki hematologiczne krwi, w tym hematokryt, donoszą o równoczesnym wzroście hematokrytu oraz liczby erytrocytów [100,101]. Wzrost hematokrytu w III grupie zwierząt przypisać można też ich nieznacznemu, fizjologicznemu odwodnieniu.

c) MCV (średnia objętość krwinki czerwonej)

Porównanie średniej objętości krwinki czerwonej we wszystkich grupach na początku eksperymentu nie wykazało istotnych statystycznie różnic. Po upływie czterech tygodni, wskaźnik ten był u wszystkich grup zwierząt istotnie niższy w porównaniu z wartościami startowymi. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż na żadnym etapie eksperymentu nie zauważono istotnych statystycznie różnic w średniej objętości krwinki czerwonej u żadnej z grup. Z uzyskanych wyników można więc wywnioskować, że obserwowany spadek wartości tego wskaźnika nie był zależny od podawania badanych wyciągów. Nadmienić także należy, że wartości MCV przez cały czas trwania eksperymentu mieściły się w granicach podanej w literaturze normy [99], nie ma więc również podstaw aby sądzić, że spadek ten był przyczyną procesu o charakterze patologicznym.

d) HGB (stężenie hemoglobiny)

Porównanie początkowego stężenia hemoglobiny u każdej z grup zwierząt wykazało, że było ono istotnie statystycznie większe w grupie kontrolnej niż w grupach I i III. Po upływie tygodnia grupa kontrolna miała również istotnie statystycznie wyższe stężenie hemoglobiny niż

grupa II. Po dwóch tygodniach stężenie hemoglobiny w grupie kontrolnej była istotnie statystycznie wyższa również w porównaniu z grupą IV. W trzecim tygodniu eksperymentu stężenie hemoglobiny we wszystkich grupach uległo wyrównaniu, tak aby w czwartym tygodniu grupa kontrolna miała je istotnie wyższe tylko w porównaniu z grupą IV.

Z danych literaturowych wynika, że stężenie hemoglobiny oraz ilość erytrocytów u szczurów podlegają (w przybliżeniu) równoległym wahaniom. Na stężenie hemoglobiny wpływa także w pewnym stopniu wiek oraz waga zwierzęcia, a także sposób w jaki została pobrana krew [99]. W czasie trwania eksperymentu, w pierwszym i drugim tygodniu zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia hemoglobiny w grupie kontrolnej w porównaniu z grupami badanymi. Wzrost ten został zahamowany w trzecim tygodniu eksperymentu, kiedy to stężenie hemoglobiny we wszystkich grupach nie różniło się w sposób statystycznie istotny. Brak jest danych literaturowych które mogłyby potwierdzić wpływ oleju kukurydzianego na stężenie hemoglobiny we krwi, nie ma więc podstaw aby sądzić, że jego podawanie może je zwiększać. Zauważyć natomiast można, że po drugim tygodniu eksperymentu rozpoczął się spadek stężenia hemoglobiny w grupie kontrolnej, podczas gdy w grupach badanych ciągle ono wzrasta. Zjawisko to wyjaśnić można albo podtrzymującym nieco dłużej wzrost stężenia hemoglobiny działaniem wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego, albo samoistnym, fizjologicznym spadkiem tego stężenia wskutek osiągnięcia zbyt wysokiego poziomu. W świetle dostępnych danych literaturowych, stopniowy wzrost stężenia hemoglobiny wydaje się być procesem fizjologicznym, związanym z dojrzewaniem zwierzęcia [99]. Uzyskane wyniki nie pozwalają w sposób jednoznaczny określić wpływu wyciągów na stężenie hemoglobiny we krwi.

e) MCH (średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej)

Porównanie średniej zawartości hemoglobiny w krwince czerwonej u wszystkich grup zwierząt na początku eksperymentu wykazało, że wskaźnik ten był istotnie statystycznie wyższy w grupie kontrolnej niż w grupach I, II i III. Po upływie dwóch tygodni grupa kontrolna miała istotnie wyższe MCH również w porównaniu z grupą IV. W trzecim tygodniu nastąpiło wyrównanie i grupy nie różniły się istotnie wartością MCH, natomiast po upływie czterech tygodni grupa kontrolna miała istotnie wyższą średnią zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej w stosunku do grup I, III i IV. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzić można, że gwałtowny spadek wartości MCH następuje w grupie kontrolnej po trzech, podczas gdy w grupach badanych dopiero po czterech tygodniach trwania eksperymentu, co widać na wykresie (Rycina 21). Mogłoby sugerować to, że podawanie wyciągów z przymiotna kanadyjskiego (obydwóch rodzajów i dawek), opóźnia

nieco wystąpienie gwałtownego spadku MCH. Z drugiej strony jednak, średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej przez cały czas trwania eksperymentu mieści się w granicach literaturowej normy [99], co przeczy istnieniu procesów o charakterze patologicznym. Wskaźnik MCH jest pochodną liczby krwinek czerwonych, średniej objętości krwinki czerwonej (MCV) oraz stężenia hemoglobiny (HGB) [89]. Fizjologiczne wahania wartości tych wskaźników mogą więc wpływać również na wartość wskaźnika MCH. O ile liczba krwinek czerwonych oraz średnia objętość krwinki czerwonej pozostawały podczas trwania eksperymentu na podobnym poziomie u wszystkich grup (nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi wskaźnikami u żadnej z grupy, zmiany ich wartości były porównywalne pomiędzy grupami), o tyle stężenie hemoglobiny w grupie kontrolnej było wyższe niż w grupach badanych (patrz punkt d), co tłumaczyć może obserwowane zmiany wartości wskaźnika MCH.

f) MCHC (średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej)

Porównanie średniego stężenia hemoglobiny w erytrocytach u wszystkich grup zwierząt na początku eksperymentu wykazało, że wskaźnik ten był istotnie statystycznie wyższy w grupie kontrolnej niż w grupach I, II, III i IV. Po upływie tygodnia nastąpiło wyrównanie. W drugim tygodniu eksperymentu wartość MCHC powróciła do wartości startowej, by w trzecim tygodniu znów się wyrównać. Do końca eksperymentu nie stwierdzono już istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami.

Wartość średniego stężenia hemoglobiny w krwinkach jest, podobnie jak średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej, pochodną liczby erytrocytów, poziomu hemoglobiny oraz średniej objętości krwinki czerwonej [89]. Fizjologiczne wahania wartości tych wskaźników mogą wpływać również na wartość wskaźnika MCHC. Średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej była początkowo istotnie wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu z innymi grupami, co przekłada się na istotnie wyższą w porównaniu z innymi grupami wartość średniego stężenia hemoglobiny w krwince czerwonej. Wahania wartości tego wskaźnika w trakcie trwania eksperymentu należy raczej przypisać fizjologicznym procesom towarzyszącym rozwojowi zwierząt niż wpływowi podawanych wyciągów. Należy zauważyć, że przez cały czas trwania eksperymentu wartość MCHC znajdowała się w granicach podawanej w literaturze normy [99].

g) WBC (leukocyty)

Porównanie początkowej ilości leukocytów u pięciu grup zwierząt wykazało, iż w grupie kontrolnej była ona istotnie wyższa niż w grupach I, II i III. Ponadto w grupie IV ilość leukocytów była istotnie większa niż w grupie I. Analiza zmian ilości leukocytów w czasie wykazała, iż po upływie tygodnia grupa kontrolna miała wyższą ich ilość jedynie w stosunku do grupy I, natomiast po upływie dwóch tygodni wykazano, że grupy przestały różnić się między sobą i stan taki utrzymał się do końca eksperymentu. Po czwartym tygodniu eksperymentu jedynie u grupy IV, a więc przyjmującej wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego w dawce 200 mg/kg m.c., oraz u grupy kontrolnej, otrzymującej olej kukurydziany w dawce 2 ml/kg m.c., zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie ilości leukocytów w stosunku do wartości początkowych.

W eksperymencie nie wykazano wpływu wyciągu z suszonego ziela w żadnej ze stosowanych dawek oraz wyciągu z ziela świeżego stabilizowanego w dawce 100 mg/kg m.c. na ilość leukocytów. Przez cały czas trwania badania utrzymywała się ona na stałym poziomie. W grupie kontrolnej początkowa ilość leukocytów była istotnie statystycznie wyższa niż w grupach I, II i III. Ponadto w grupie IV ilość leukocytów była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie I. Wyższą ilość leukocytów w tych grupach wyjaśnić można jej dużymi osobniczymi wahaniami u szczurów, o czym donosi literatura [99], potencjalnym procesem infekcyjnym lub zapalnym, który w danym momencie mógł doprowadzić do jej chwilowego zwiększenia. Obniżenie się poziomu białych ciałek krwi w tych grupach w dalszych etapach eksperymentu, wytłumaczyć należy raczej działaniem naturalnych mechanizmów regulacyjnych niż wpływem oleju kukurydzianego bądź wyciągu ze świeżego stabilizowanego surowca w dawce 200 mg/kg m.c. W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat potencjalnego wpływu oleju kukurydzianego na liczbę leukocytów. Brak jest także takich danych w przypadku wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego, jednak aby dowieść wpływu wyciągu świeżego stabilizowanego w tej dawce na podwyższony poziom leukocytów, należałoby również sprawdzić, jak przy ich zwiększonej ilości działać będą wyciągi z surowca suszonego oraz wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego w dawce 100 mg/kg m.c.

h) PLT (trombocyty)

Zarówno na początku eksperymentu jak i w czasie jego trwania nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ilości trombocytów pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt. Wyjątek stanowi jedynie pierwszy tydzień eksperymentu, kiedy ilość płytek krwi była istotnie większa w grupie kontrolnej w porównaniu z pozostałymi grupami. Różnica ta jest najprawdopodobniej

wynikiem chwilowego zaburzenia fizjologicznej równowagi, która szybko wróciła do normy. Liczba płytek krwi u szczurów wykazuje dość duże wahania, które widoczne są także na wykresie (Rycina 24). Według danych literaturowych liczba płytek może wynosić nawet od 121 000 do 1 200 000, przy czym przeciętnie wynosi ok 640 000. Wpływ na nią może mieć także sam proces pobierania krwi do badania, jako że trombocyty są podatne na aglutynację oraz rozpad [99]. Na podstawie analizy otrzymanych wyników nie można jednoznacznie potwierdzić doniesień literaturowych, jakoby wyciągi z ziela przymiotna kanadyjskiego miały zwiększać liczbę płytek krwi [33,34,44]. W przeprowadzonym eksperymencie wyciąg z suszonego oraz świeżego stabilizowanego ziela przymiotna kanadyjskiego nie wpłynął w żadnym stopniu na liczbę płytek krwi u zdrowych szczurów. Wyjaśnienie ewentualnego wpływu takich wyciągów na patologicznie obniżoną liczbę trombocytów wymagałoby przeprowadzenia eksperymentu z wykorzystaniem zwierzęcego modelu małopłytkowości.

14.5.2. Ocena składu odsetkowego białych krwinek.

W celu określenia wpływu wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego na skład odsetkowy białych krwinek wykonano rozmazy krwi, które wybarwiono metodą Pappenheima. Podczas oceny zmian składu odsetkowego pod uwagę brano granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) oraz limfocyty.

Porównanie ilości granulocytów u pięciu grup zwierząt na początku eksperymentu wykazało, że ich poziom w grupie kontrolnej był istotnie statystycznie niższy niż w grupach II i IV. Ponadto w grupie I było istotnie mniej granulocytów obojętnochłonnych niż w grupie IV. Po upływie tygodnia różnice te zanikły, dopiero po trzecim tygodniu eksperymentu poziom neutrofilów w grupie kontrolnej był istotnie wyższy niż w grupie IV, jednak różnice te ponownie zanikły w tygodniu czwartym.

Różnice pojawiające się po trzecim tygodniu eksperymentu potraktować można jako artefakt, ponieważ mają charakter chwilowy. Po czterech tygodniach poziom granulocytów obojętnochłonnych w grupach II i III był istotnie statystycznie niższy w porównaniu z wartościami startowymi. Mogłoby to sugerować, że mała dawka wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego oraz duża dawka wyciągu z surowca suchego powodują obniżenie liczby neutrofilów. Zastanawiający wydaje się jednak całkowity brak wpływu dużych dawek wyciągu świeżego stabilizowanego oraz małych wyciągu suchego. Sugerować może to fizjologiczny charakter zmian w grupach II i III. Ponadto całkowita liczba leukocytów w grupie II i III nie zmieniła się w sposób istotny statystycznie podczas trwania eksperymentu w stosunku do wartości startowych (patrz punkt

g). Oznacza to że w grupach tych nastąpiło jedynie przesunięcie w rozmiarze w kierunku neutrofilów, co może być spowodowane czynnikami takimi jak np. zakażenie bakteryjne, grzybicze czy infekcja wirusowa i inne [88]. Liczba granulocytów obojętnochłonnych podczas trwania eksperymentu utrzymuje się w granicach podawanych w literaturze norm [99]. Obniżającemu poziom granulocytów obojętnochłonnych wpływowi podawanych wyciągów zdaje się także przeczyć fakt, iż spadek ich ilości nie następuje w sposób ciągły (Rycina 25), ale w trzecim tygodniu eksperymentu dochodzi do zwiększenia ich ilości. Pomimo więc istotnego zmniejszenia się ilości granulocytów obojętnochłonnych w grupach II i III, wątpliwym wydaje się fakt, aby było to spowodowane działaniem podawanych wyciągów.

Porównanie ilości limfocytów u pięciu grup zwierząt na początku eksperymentu wykazało, że w grupie IV ich liczba była statystycznie wyższa niż w grupach I i III. Po upływie tygodnia istotna różnica pozostawała tylko pomiędzy grupą IV i I, a po dwóch tygodniach różnice całkowicie zanikły. W czwartym tygodniu eksperymentu jedynie grupa I posiadała istotnie wyższą liczbę limfocytów w porównaniu do wartości początkowej.

Limfocyty są frakcją leukocytów mogącą podlegać dużym wahaniom w organizmie szczura. Istotny wpływ na ich liczbę mogą mieć nawet takie czynniki jak stres wywołany pobraniem krwi, czy też sposób jej pobrania [99]. Z uzyskanych wyników wnioskować można, że badane wyciągi nie wywierają istotnego wpływu na rozmiar frakcji limfocytów u zwierząt. Jedynie u grupy I, a więc przyjmującej dawkę 100 mg/kg m.c. wyciągu z surowca suszonego, zaobserwowano istotnie wyższy, w odniesieniu do wartości początkowych, poziom tych krwinek. Zjawisko to należy tłumaczyć raczej wpływem czynników środowiskowych niż działaniem wyciągu. Nie stwierdzono zwiększenia ilości limfocytów (w odniesieniu do wartości początkowej) u pozostałych grup zwierząt. Różnice występujące na poszczególnych etapach eksperymentu również wytłumaczyć należy raczej wpływem czynników środowiskowych niż wyciągów, jako że mają charakter krótkotrwały. We wszystkich grupach zwierząt (oprócz I) przez cały czas trwania eksperymentu widać, że wahania poziomu limfocytów przebiegają w podobny sposób, niezależnie od przyjmowanej substancji i jej dawki, co zaobserwować można na wykresie (Rycina 26). Obserwacja ta również zdaje się przeczyć wpływowi wyciągów na poziom limfocytów u badanych zwierząt.

14.5.3. Zjawisko emperipolezy w szpiku kostnym u szczurów.

Emperipoleza jest zjawiskiem polegającym na czynnym wnikięciu jednej komórki do drugiej. Obydwie komórki zachowują swoją strukturę oraz odrębność. Komórką wnিকającą może

być neutrofil, limfocyt, erytroblast, a nawet niedojrzałe formy szpiku. Komórką przyjmującą jest megakariocyt. Zjawisko to obserwuje się często w takich chorobach układu krwiotwórczego jak przewlekłe i ostre białaczki, chłoniak Hodgkina, trombocytopenia, czy zwłóknienie szpiku. Emperipoleza może występować jednak również w warunkach fizjologicznych, w prawidłowym szpiku kostnym. Przykładowo, u młodych około 2-12 miesięcznych szczurów występuje rzadko – średnio w 0,3% przypadków, jednak wraz z wiekiem liczba ta wzrasta. U szczurów 18-24 miesięcznych zjawisko to występuje w 2-5% przypadków [102]. Patofizjologiczna rola emperipolezy pozostaje do dziś niewyjaśniona, jednak zauważono że nasila się ona np. w przypadku dużej utraty krwi czy niedoborów żelaza, a ulega zmniejszeniu podczas narażenia na niektóre substancje toksyczne jak np. akrylamid [103]. Autorzy opisujący to zjawisko, nie znają losu komórek wewnątrz megakariocyta, czy dochodzi do ich rozpadu, czy też opuszczają te komórki.

Celem eksperymentu było określenie, czy wyciągi z ziela przymiotna kanadyjskiego mają wpływ na częstość występowania procesu emperipolezy w szpiku kostnym u szczurów, które te wyciągi przyjmowały. Analiza sporządzonej dokumentacji fotograficznej wykazała brak różnic w częstości występowania tego zjawiska pomiędzy grupami zwierząt. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach badanych emperipoleza zauważalna była średnio w 5 na 100 obserwowanych megakariocytach, a więc w 5% przypadków. Wartość ta zgodna jest z opisywaną w literaturze fizjologiczną częstością występowania emperipolezy u szczurów w wieku 18-24 miesięcy [102]. Można stwierdzić więc że wyciągi z ziela przymiotna kanadyjskiego nie mają wpływu na opisywane wyżej zjawisko w żadnej z zastosowanych dawek, co świadczy o braku ich toksyczności.

14.6. Ocena aktywności przeciwzapalnej wyizolowanych monogalaktozylodiacylglicerolu i digalaktozylodiacylglicerolu oraz wyciągów z surowca suszonego i świeżego stabilizowanego za pomocą testu denaturacji albumin (albumin denaturation assay).

Niektóre źródła literaturowe zalecają ziele przymiotna kanadyjskiego jako środek o działaniu przeciwzapalnym, nadający się do stosowania w schorzeniach takich jak lumbago, artretyzm czy reumatyzm [12,34,35]. Istnieje jednakże tylko jedno badanie dotyczące przeciwzapalnej aktywności tego surowca. Lenfeld i wsp. [43] wykazali przeciwzapalne działanie wyciągów z surowca suszonego, w modelu obrzęku karageninowego u szczura. Do dziś pozostaje jednak niezbadana ewentualna aktywność przeciwzapalna wyciągu z surowca świeżego. Nie znany jest także mechanizm działania przeciwzapalnego surowca.

Istnieje natomiast sporo doniesień literaturowych na temat przeciwzapalnego działania galaktozylodiacylogliceroli izolowanych z różnych gatunków roślin. Ich aktywność przeciwzapalna testowana była zarówno w warunkach *in vivo* [75] jak i *in vitro* [74]. Szczególnie dużo prac poświęconych jest tzw. galaktolipidowi GOPO ((2S)-1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-oktadeka-9,12,15-trieno]-3-O-β-D-galaktopiranozyloglicerol), który jest jednym z głównych składników owoców dzikiej róży i wywiera działanie przeciwzapalne w takich chorobach jak reumatyzm czy artretyzm [71,72,73,74]. Ustalono, że aktywność przeciwzapalna galaktozylodiacylogliceroli może być wynikiem inhibicji cyklooksygenazy typu I i II [104] lub hamowania chemotaksji leukocytów [72,74].

Ocenę aktywności przeciwzapalnej wyciągów oraz wyizolowanych związków przeprowadzono w oparciu o metodę opracowaną przez Mizushina i wsp. [105], którą poddano niewielkim modyfikacjom. Metoda ta wykorzystuje zdolność niesteroidowych leków przeciwzapalnych do hamowania koagulacji cieplnej albumin osocza. Zapobiegają one zarówno zmniejszeniu rozpuszczalności albumin, jak i zwiększeniu ich lepkości, które to procesy zwykle towarzyszą zmianom strukturalnym zachodzącym w białkach podczas denaturacji [106]. Metoda ta pozwala na relatywnie szybką ocenę aktywności przeciwzapalnej zarówno związków syntetycznych [95], jak i związków pochodzenia naturalnego [91,92,93,94] w warunkach *in vitro*.

Zarówno badane wyciągi jak i wyizolowane związki analizowane były w 5 różnych stężeniach. Każda próba analizowana była trzykrotnie, a do obliczeń wykorzystano wynik uśredniony. Próba kontrolna negatywna przeprowadzona została dla roztworu wodnego albuminy bydlęcej bez żadnych dodatków. Próba kontrolna pozytywna przeprowadzona została dla kwasu acetylosalicylowego w rozcieńczeniach 100 i 200 µg/ml. Z otrzymanych wyników wnioskować można o braku aktywności przeciwzapalnej w przeprowadzonym teście zarówno wyciągów z surowca świeżego stabilizowanego i suszonego, jak i wyizolowanych związków: mono- oraz digalaktozylodiacyloglicerolu. Najwyższy stopień zahamowania denaturacji albumin otrzymano w przypadku wyciągu z surowca suchego (10,19% przy stężeniu 100 µg/ml) oraz dla digalaktozylodiacyloglicerolu (12,13% przy stężeniu 500 µg/ml). Wyniki dla związku kontrolnego, uznanego leku o działaniu przeciwzapalnym, jakim jest kwas acetylosalicylowy, były jednak wielokrotnie wyższe, wynosiły bowiem 83,25% dla stężenia 100 µg/ml oraz 97,57% dla stężenia 200 µg/ml. Brak aktywności przeciwzapalnej wyżej wymienionych związków w przeprowadzonym teście nie stoi w sprzeczności z danymi literaturowymi potwierdzającymi taką aktywność zarówno dla samego wyciągu z surowca suchego [43] jak i izolowanych galaktozylodiacylogliceroli [71,72,73,74,75,104]. Zdolność do hamowania denaturacji cieplnej albumin osocza nie jest cechą wszystkich środków o działaniu przeciwzapalnym. Wykazują ją głównie związki o charakterze

kwaśnym [105]. Efekt przeciwzapalny nie zawsze jest też wynikiem bezpośredniego zahamowania aktywności cyklooksygenaz typu I i II. W leczeniu wielu chorób o etiologii zapalnej, jak np. reumatoidalne, czy łuszczycowe zapalenie stawów lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego stosowane są często leki działające na innej drodze, poprzez hamowanie migracji leukocytów, proliferacji komórek i syntezy protein. Leki takie nie hamują indukowanej temperaturą denaturacji albumin [106]. Przeciwzapalna aktywność galaktozylodiacyllogliceroli, pomimo braku aktywności w teście denaturacji albumin, pozostaje niepodważalna w świetle dostępnych danych literaturowych. Dokładniejszej analizy wymaga jednak potencjalna aktywność wyciągu z suszonego ziela przymiotna kanadyjskiego, który dał negatywny wynik w teście denaturacji albumin, jednak, jak donosi literatura, wykazał aktywność w teście obrzęku karageninowego łapy szczura [43]. Dalsze badania konieczne są w przypadku wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego. Zasadnym wydaje się sprawdzenie, czy podobnie jak wyciąg z surowca suszonego, okaże się on aktywny w innych modelach reakcji zapalnej.

14.7. Ocena aktywności cytotoksycznej wyciągów z surowca suszonego i świeżego stabilizowanego oraz wyizolowanych mono- i digalaktozylodiacylloglicerolu.

Ziele przymiotna kanadyjskiego nie jest wykorzystywane w medycynie ludowej jako środek o działaniu przeciwnowotworowym. Pomimo tego, jak opisane zostało w punkcie 4.5.1, wyciągi z ziela tej rośliny oraz pewne związki z niego wyizolowane wykazują aktywność cytotoksyczną wobec niektórych linii komórek nowotworowych. Należy wymienić tu między innymi takie linie komórkowe jak Hep-2 (nowotwór krtani), MCF7 (nowotwór piersi), HeLa (nowotwór jajnika), A431 (nowotwór nabłonka) oraz mysich komórek czerniaka B16. W niniejszej pracy podjęto próbę rozszerzenia aktualnego stanu wiedzy na temat aktywności cytotoksycznej wyciągów z ziela przymiotna, dokonując jej oceny względem linii komórkowych nowotworu prostaty szczura AT-2, linii komórkowych nowotworu prostaty człowieka DU145 (o mniejszym stopniu złośliwości) i PC3 (o większym stopniu złośliwości), a także linii prawidłowych ludzkich komórek nabłonka prostaty PNT-2. Ocenie poddano także wyizolowane z wyciągów związki.

Wobec szczurzych komórek nowotworu prostaty AT-2 największą aktywnością odznaczał się wyciąg z surowca suszonego. EC_{50} wynosiło w tym przypadku 100 $\mu\text{g/ml}$. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że według danych literaturowych, związek lub wyciąg posiada skuteczną aktywność cytotoksyczną, jeśli wartość EC_{50} wynosi maksymalnie 50 $\mu\text{g/ml}$ [107]. Wyizolowany digalaktozylodiacylloglicerol był skuteczny jedynie w największych stężeniach (tj. 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$), jednak stężenia te stanowiły wartości EC_{50} . Zarówno monogalaktozylodiacylloglicerol jak i wyciąg z

surowca świeżego stabilizowanego okazały się praktycznie nieaktywne wobec komórek AT-2. W przypadku ludzkich komórek nowotworu prostaty DU145 najbardziej aktywny okazał się, podobnie jak w przypadku komórek AT-2, wyciąg sporządzony z surowca suszonego. EC_{50} wynosiło w tym przypadku około 30 $\mu\text{g/ml}$. Wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego działał zdecydowanie słabiej, ponieważ nawet stężenie 100 $\mu\text{g/ml}$ nie spowodowało śmierci 50% badanych komórek. Wyizolowane mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerol wykazywały porównywalne, umiarkowane działanie. EC_{50} mieściło się w przedziale 50-70 $\mu\text{g/ml}$. Zauważyć można zdecydowanie lepszą aktywność zarówno wyciągów, jak i wyizolowanych związków wobec ludzkich komórek DU145 niż szczurzych komórek AT-2. Wobec ludzkich komórek nowotworu prostaty PC3 najwyższą aktywność wykazał wyciąg z surowca suszonego. EC_{50} wynosiło w tym przypadku około 50 $\mu\text{g/ml}$. Można zauważyć, że w przypadku komórek DU145 ten sam wyciąg powodował śmierć 50% komórek nowotworowych już przy stężeniu około 30 $\mu\text{g/ml}$, był więc aktywniejszy. Fakt ten wytłumaczyć można większą złośliwością, a co za tym idzie także odpornością komórek PC3 w porównaniu z komórkami DU145. Aktywność wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego była mniejsza niż wyciągu z surowca suszonego i wyglądała podobnie jak w przypadku komórek DU145. EC_{50} wynosiło nieco powyżej 100 $\mu\text{g/ml}$. Zarówno mono- jak i digalaktozylodiacylloglicerol były praktycznie nieaktywne (EC_{50} dużo powyżej 100 $\mu\text{g/ml}$). Ostatnim etapem badania było sprawdzenie aktywności cytotoksycznej wyciągów oraz wyizolowanych związków względem prawidłowych komórek nabłonka prostaty ludzkiej PNT-2. Oznaczenie takie miało na celu określenie selektywności działania wyciągów oraz związków. Największą selektywność działania w badaniu wykazał wyciąg z surowca suszonego, który był praktycznie nieaktywny względem komórek PNT2. Wyciąg z surowca stabilizowanego był zdecydowanie mniej selektywny. Wyizolowany digalaktozylodiacylloglicerol działał bardzo słabo, jednak jego działanie w przypadku komórek nowotworowych (za wyjątkiem linii DU145) również było słabe. Można więc powiedzieć, że związek ten był selektywny w działaniu w porównaniu do wpływu na komórki DU145. Podobnie wyglądała aktywność wyizolowanego monogalaktozylodiacylloglicerolu, który okazał się również selektywny w działaniu w porównaniu do swojego wpływu na komórki DU145. Podsumowując można stwierdzić, iż generalnie największą aktywność wobec ludzkich komórek nowotworowych DU145 i PC3 wykazał wyciąg z surowca suszonego. Odznaczał się on także największą selektywnością działania. EC_{50} w przypadku tego wyciągu mieściło się zwykle w przedziale 30-50 $\mu\text{g/ml}$, co świadczyć może o wyraźnie zarysowanej aktywności cytotoksycznej [107]. Aktywność wyciągu z surowca suszonego była zdecydowanie mniejsza niż stosowanego jako pozytywna kontrola mitoksantronu, jednak na korzyść wyciągu niewątpliwie przemawia fakt, iż jest on bardziej niż mitoksantron selektywny i

tym samym nie wywołuje zaburzeń rozwoju komórek prawidłowych. Komórki DU145 jako mniej złośliwe, łatwiej niż komórki PC3 poddawały się działaniu badanych wyciągów i związków. Najwyższa odporność cechowała szczurze komórki AT-2. Galaktozylodiacylloglicerole są związkami o niskiej aktywności cytotoksycznej. Z dostępnych w literaturze danych opisujących aktywność tych związków względem innych linii komórkowych jak A549, BALL-1, HeLa, Molt-4 czy NUGC-3 wynika, że wartości EC_{50} zawierały się w przedziale 58,5-81,7 $\mu\text{g/ml}$ [65]. Otrzymane wyniki wskazują, że w stosunku do komórek prostaty PC3 związki te są praktycznie nieaktywne, natomiast w stosunku do komórek DU145 ich aktywność jest porównywalna z tą opisywaną w literaturze wobec innych linii komórkowych.

15. Wnioski.

Na podstawie analizy zgromadzonych wyników wyciągnąć można następujące wnioski:

1. Wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego bogaty jest w galaktozylodiacylloglicerole, które nie występują jednak w wyciągu z surowca suszonego. Przyczyną braku tych związków w surowcu suszonym jest ich rozkład, następujący podczas procesu suszenia. Analiza, przeprowadzona za pomocą metod chromatograficznych i widmowych, wykazała, iż głównymi związkami obecnymi w wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego są mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerol. Związki te, z ziela przymiotna kanadyjskiego, zostały wyizolowane po raz pierwszy. Analiza ilościowa wykazała, że przez cały okres wegetacji rośliny zawartość tych związków utrzymuje się na stałym poziomie, przy czym zawartość digalaktozylodiacylloglicerolu jest większa niż monogalaktozylodiacylloglicerolu.
2. Nie udało się w sposób jednoznaczny potwierdzić korzystnego wpływu wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego na wskaźniki hematologiczne krwi obwodowej u zdrowych zwierząt, jednak nie można też wykluczyć takiego działania w przypadku organizmu u którego, wskutek różnego rodzaju procesów patologicznych, doszło do zmian wartości tych wskaźników. W tym celu konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, z wykorzystaniem odpowiednich modeli zwierzęcych (np. modelu małopłytkowości). Zauważyć należy także, że wyciągi z ziela przymiotna nie wywierają żadnego negatywnego wpływu na badane wskaźniki hematologiczne, a także nie wpływają na liczebność populacji neutrofilów oraz limfocytów, co uwidocznione zostało w wykonanych rozmazach krwi obwodowej. Nie zaobserwowano również zwiększenia częstości występowania procesu emperipolezy w szpiku kostnym zwierząt przyjmujących badane wyciągi, co świadczyć może o braku ich toksyczności.
3. Działanie przeciwzapalne wyciągów oraz wyizolowanych galaktozylodiacyllogliceroli w zastosowanym w niniejszej pracy teście było bardzo słabe. Pomimo dużej zawartości galaktozylodiacyllogliceroli o udokumentowanej aktywności przeciwzapalnej, wyciąg z surowca świeżego stabilizowanego nie wykazał takiego działania. W świetle dostępnych danych literaturowych konieczne jednak wydaje się przeprowadzenie dalszych badań, w celu ostatecznej weryfikacji aktywności przeciwzapalnej zarówno wyciągów, jak i wyizolowanych związków, jako że może opierać się ona na innym mechanizmie działania. Należałoby przeprowadzić badania *in vivo* w indukowanym procesie zapalnym oraz ocenę stężeń mediatorów procesu zapalnego.

4. Największą aktywnością cytotoksyczną względem szczurzych linii komórek nowotworu prostaty AT-2 oraz ludzkich linii komórek nowotworu prostaty DU145 i PC3 odznaczał się wyciąg z surowca suszonego. Posiadał on też największą selektywność działania. Wyizolowane galaktozylodiacylloglicerole wykazywały aktywność cytotoksyczną jedynie wobec komórek linii DU145. Wobec pozostałych były praktycznie nieaktywne. Zasadnym wydaje się ocena aktywności wyciągów oraz wyizolowanych związków względem innych, nieprzebadanych do tej pory linii komórkowych.

16. Streszczenie.

Chromatograficzne porównanie metanolowych wyciągów z suszonego oraz świeżego stabilizowanego ziela przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L. Cronq) wykazało istotne różnice w składzie tych wyciągów. W wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego stwierdzono obecność związków, które zidentyfikowane zostały jako mono- oraz digalaktozyłodiacyloglicerol. Związki te wyizolowano z ziela przymiotna kanadyjskiego po raz pierwszy. Wykorzystując opracowaną i zwalidowaną metodę densytometryczną określono zawartość tych związków w ziele przymiotna kanadyjskiego. Stwierdzono, iż zawartość digalaktozyłodiacyloglicerolu w roślinie jest znacznie większa niż zawartość monogalaktozyłodiacyloglicerolu.

W przeprowadzonym na zwierzętach eksperymencie nie udało się w sposób jednoznaczny określić wpływu wyciągów z ziela przymiotna kanadyjskiego na hematologiczne wskaźniki krwi obwodowej. Na podstawie otrzymanych wyników nie można też porównać działania dwóch wyciągów. Z całą pewnością stwierdzić natomiast można, że wyciągi te nie wykazały negatywnego działania na wskaźniki hematologiczne krwi, szpik kostny oraz skład odsetkowy krwinek białych. Nie zwiększały też częstości występowania procesu emperipolezy w szpiku kostnym u szczura.

W teście denaturacji albumin dokonano oceny aktywności przeciwzapalnej wyciągów oraz wyizolowanych galaktozyłodiacylogliceroli, przy czym ocena aktywności przeciwzapalnej wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego przeprowadzona została po raz pierwszy. W teście tym zarówno wyciągi jak i wyizolowane związki, wykazały niską aktywność przeciwzapalną w porównaniu z substancją referencyjną, jaką był kwas acetylosalicylowy.

Określono również cytotoksyczną aktywność wyciągów oraz wyizolowanych galaktozyłodiacylogliceroli względem ludzkich linii komórkowych nowotworu prostaty DU145 oraz PC3, a także szczurzych linii komórkowych nowotworu prostaty AT-2 oraz prawidłowych linii nabłonka prostaty PNT-2. Badania na wymienionych liniach komórkowych przeprowadzone zostały po raz pierwszy. Największą aktywność oraz selektywność wykazał wyciąg z surowca suszonego. Galaktozyłodiacyloglicerole były praktycznie nieaktywne.

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy niewątpliwie w istotny sposób rozszerzają dotychczasową wiedzę na temat przymiotna kanadyjskiego. Konieczne jest jednak przeprowadzenie dalszych analiz, które pozwolą lepiej poznać skład wyciągu z surowca świeżego stabilizowanego oraz określić działanie wyciągów na patologicznie zmienione wskaźniki hematologiczne krwi obwodowej, ze szczególnym uwzględnieniem płytek krwi.

Indeks tabel

Tabela 1. Najważniejsze składniki olejku eterycznego przymiotna kanadyjskiego rosnącego w Polsce.....	17
Tabela 2. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR dla wyizolowanego związku EC_1 z danymi literaturowymi dla digalaktozylodiacylloglicerolu (DGDG).....	42
Tabela 3. Zestawienie sygnałów ^1H NMR dla wyizolowanego związku EC_1 z danymi literaturowymi dla digalaktozylodiacylloglicerolu (DGDG).....	42
Tabela 4. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR dla wyizolowanego związku EC_2 z danymi literaturowymi dla monogalaktozylodiacylloglicerolu (MGDG).....	45
Tabela 5. Zestawienie sygnałów ^1H NMR dla wyizolowanego związku EC_2 z danymi literaturowymi dla monogalaktozylodiacylloglicerolu (MGDG).....	45
Tabela 6. Zestawienie mas uzyskanych doświadczalnie oraz obliczonych teoretycznie i wzorów sumarycznych badanych związków EC_1 oraz EC_2	48
Tabela 7. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w wyizolowanym związku EC_1	52
Tabela 8. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w wyizolowanym związku EC_2	52
Tabela 9. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR związku EC_1 z digalaktozylodiacylloglicerolem.....	58
Tabela 10. Zestawienie sygnałów ^{13}C NMR związku EC_2 z monogalaktozylodiacylloglicerolem.....	59
Tabela 11. Zestawienie sygnałów ^1H NMR związku EC_1 z digalaktozylodiacylloglicerolem.....	59
Tabela 12. Zestawienie sygnałów ^1H NMR związku EC_2 z monogalaktozylodiacylloglicerolem.....	59
Tabela 13. Zestawienie sygnałów FAB MS związku EC_1 i EC_2 z mono- oraz digalaktozylodiacylloglicerolem.....	60
Tabela 14. Wyniki walidacji metody densytometrycznej dla MGDG i DGDG.....	63
Tabela 15. Powtarzalność oraz precyzja średnioterminowa.....	63
Tabela 16. Zawartość DGDG oraz MGDG w poszczególnych stadiach wegetacyjnych rośliny.....	64
Tabela 17. Zestawienie grup doświadczalnych, substancji i ich dawek oraz liczby szczurów w grupie.....	67
Tabela 18. Charakterystyka grup badanych – zmiany wskaźników hematologicznych krwi.....	69
Tabela 19. Analiza zmian poszczególnych wskaźników w czasie – zmiany wskaźników hematologicznych krwi.....	71
Tabela 20. RBC.....	73
Tabela 21. HCT.....	74
Tabela 22. MCV.....	75

Tabela 23. HGB.....	76
Tabela 24. MCH.....	77
Tabela 25. MCHC.....	78
Tabela 26. WBC.....	79
Tabela 27. PLT.....	80
Tabela 28. Charakterystyka grup badanych – skład odsetkowy krwinek białych.....	83
Tabela 29. Analiza zmian poszczególnych wskaźników w czasie – skład odsetkowy krwinek białych	83
Tabela 30. Granulocyty obojętnochłonne.....	84
Tabela 31. Limfocyty.....	85
Tabela 32. Uśrednione wyniki pomiarów turbidancji wraz z obliczonym stopniem zahamowania denaturacji.....	90
Tabela 33. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek AT-2.....	93
Tabela 34. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek DU145.....	93
Tabela 35. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek PC3.....	93
Tabela 36. Wpływ badanych wyciągów i związków na żywotność komórek PNT-2.....	93
Tabela 37. Wpływ mitoksantronu na żywotność komórek DU145, PC3 i PNT-2.....	93

Indeks rycin

Rycina 1. Przymiotno kanadyjskie – <i>Erigeron canadensis</i> L. Cronq.....	14
Rycina 2. HEMORIGEN® – tabletki.....	21
Rycina 3. Wzór ogólny galaktozydylodiacyllogliceroli.....	29
Rycina 4. Chromatogram wyciągu metanolowego z surowca suszonego oraz surowca świeżego stabilizowanego.....	40
Rycina 5. Widmo ^{13}C NMR dla wyizolowanego związku EC_1	43
Rycina 6. Widmo ^1H NMR dla wyizolowanego związku EC_1	44
Rycina 7. Widmo ^{13}C NMR dla wyizolowanego związku EC_2	46
Rycina 8. Widmo ^1H NMR dla wyizolowanego związku EC_2	47
Rycina 9. Widmo FAB MS wyizolowanego związku EC_1	49
Rycina 10. Widmo FAB MS wyizolowanego związku EC_2	50
Rycina 11. Chromatogram TLC wyciągu metanolowego z surowca suszonego oraz surowca świeżego stabilizowanego wraz ze wzorcami digalaktozydylodiacylloglicerolu oraz monogalaktozydylodiacylloglicerolu.....	54
Rycina 12. Chromatogram HPLC wyizolowanego związku EC_1 wraz z wzorcem digalaktozydylodiacylloglicerolu.....	56
Rycina 13. Chromatogram HPLC wyizolowanego związku EC_2 wraz z wzorcem monogalaktozydylodiacylloglicerolu.....	57
Rycina 14. Densytogram substancji wzorcowych MGDG i DGDG oraz wyciągów.....	62
Rycina 15. Zawartość DGDG w ziele przymiotna kanadyjskiego w zależności od okresu wegetacji	65
Rycina 16. Zawartość MGDG w ziele przymiotna kanadyjskiego w zależności od okresu wegetacji	65
Rycina 17. Średnie RBC.....	73
Rycina 18. Średnie HCT.....	74
Rycina 19. Średnie MCV.....	75
Rycina 20. Średnie HGB.....	76
Rycina 21. Średnie MCH.....	77
Rycina 22. Średnie MCHC.....	78
Rycina 23. Średnie WBC.....	79
Rycina 24. Średnie PLT.....	80
Rycina 25. Granulocyty obojętnochłonne.....	84
Rycina 26. Limfocyty.....	85

Rycina 27. Emperipoleza w szpiku kostnym u szczura (1).....	86
Rycina 28. Emperipoleza w szpiku kostnym u szczura (2).....	87
Rycina 29. Emperipoleza w szpiku kostnym u szczura (3).....	87
Rycina 30. Emperipoleza w szpiku kostnym u szczura (4).....	88

Bibliografia:

1. Pawłowski B., Jasiewicz A., Flora Polska - Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych, Tom XII, 1971, Wydawnictwo PWN, Warszawa.
2. Yong L.H., Li D., Ren B., Jing-Ping G., Meng X.L., Zhou Y.Z., Yu Q., Li Y., Wan L.L., Guo C., Evaluation of Impact of *Herba Erigerontis* injection, a Chinese Herbal Prescription, on Rat Hepatic Cytochrome P450 Enzymes by Cocktail Probe Drugs, Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139, 104-109.
3. Guo H., Hu L.M., Wang S.X., Wang Y.L., Shi F., Li H., Liu Y., Kang L.Y., Gao X.M., Neuroprotective Effects of Scutellarin Against Hypoxic-ischemic-induced Cerebral Injury via Augmentation of Antioxidant Defense Capacity, Chinese Journal of Physiology, 2011, 54(6), 399-405.
4. Jian T.Y., He J.C., He G.H., Feng E.F., Li H.L., Bai M., Xu G.L., Scutellarin Inhibits Cytochrome P450 Isoenzyme 1A2 (CYP1A2) in Rats, Phytotherapy Research, 2012 (artykuł w druku).
5. Anani K., Hudson J.B., De Souza C., Akpagana K., Tower G.H.N., Arnason J.T., Gbeasor M., Investigation of Medicinal Plants of Togo for Antiviral and Antimicrobial Activities, Pharmaceutical biology, 2000, 38, 1, 2000.
6. Ragasa C.Y., Rideout J.A., Sy J.O., Alcachupas D., Inte V.M.L., Coll J.C., Bioactive Monoterpene Glycosides from *Erigeron linifolius*, Phytochemistry, 1997, 46(1), 151-154.
7. Chaudhry B.A., Janbaz K.H., Uzair M., Ejaz A.S., Biological Studies of *Conyza* and *Euphorbia* Species, Journal of Research (Science), 2001, 12(1), 85-88.
8. Strzelecka H., Kowalski J., Encyklopedia Zielaństwa i Ziółolecznictwa., 2000, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
9. Broda B., Zarys Botaniki Farmaceutycznej., 2002, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
10. Podlech D., Rośliny lecznicze – encyklopedia kieszonkowa, 1994, Wydawnictwo Muza S.A, Warszawa.
11. Weaver S.E., The Biology of Canadian Weeds. 115. *Conyza canadensis*, Canadian Journal of Plant Science, 2001, 81, 867-875.
12. Kostecka-Mądalska O., *Erigeron canadensis* L., Przymiotno kanadyjskie – roślina lecznicza i olejkodajna, Farmacja Polska, 1962, 6, 134-136.
13. Szigeti Z., Racz I., Lasztity D., Paraquat Resistance of Weeds – The Case of *Conyza canadensis* (L.) Cronq, Zeitschrift für Naturforschung, 2001, 56(5-6), 319-328.
14. Strzelecka H., Glinkowska G., Badanie chemizmu ziela *Erigeron canadensis* L. cz. I., Herba Polonica, 1981, 27(3), 201-211.
15. Csupor-Löffler B., Hajdu Z., Zupko I., Molnar J., Forgo P., Vasas A., Kele Z., Hohmann J., Antiproliferative Constituents of the Roots of *Conyza canadensis*, Planta Medica, 2011, 77, 11.
16. Wei D.X., Gao X., Zhong J.J., A New C-10 Acetylene and a New Triterpenoid from *Conyza canadensis*, Archives of Pharmacal Research, 2007, 30(5), 547-551.
17. Shao S., Yan M., Bi S., Huang Y., Fu Y., Xu Y., Chemical Constituents of *Erigeron canadensis*, Chinese Pharmaceutical Journal, 2009, 44(14), 1053-1055.
18. Ming M.Y., Ting Y.L., Da Q.Z., Shuai S., Sheng N.B., A New Derivative of Triterpene with Anti-Melanoma B16 Activity from *Conyza canadensis*, Chinese Chemical Letters, 2010, 21, 834-837.
19. Shao S., Yang M.M., Bi S.N., Wan Z.Q., Flavonoids of *Erigeron canadensis*, China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(19), 2902-2905.
20. Olszewska H., Praca Magisterska, Wydział Farmacji CM UJ, 1998, Kraków.
21. Ding Y., Su Y., Guo H., Yang F., Mao H., Gao X., Zhu Z., Tu G., Phenylpropanoyl Esters

- from Horseweed (*Conyza canadensis*) and Their Inhibitory Effects on Catecholamine Secretion, *Journal of Natural Products*, 2010, 73, 270-274.
22. Mukhtar N., Iqbal K., Malik A., Novel Sphingolipids from *Conyza canadensis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 50(12), 1558-1560.
 23. Lis A., Piggot R.J., Góra J., Chemical Composition Variability of the Essential Oil of *Conyza canadensis* L. Cronq, *Flavour and Fragrance Journal*, 2003, 18, 364-367.
 24. Kostecka-Mądalska O., Polanowski A., Olejek lotny z krajowego ziela *Erigeron canadensis* L. (Przymiotno kanadyjskie), *Acta Poloniae Pharmaceuticae*, 1964, 21, 3, 275-279.
 25. Lis A., Góra J., Essential Oil of *Conyza canadensis* L. Cronq, *Journal of Essential Oil Research*, 2000, 12, 781-783.
 26. Tzakou O., Vagias C., Gani A., Yannitsaros A., Volatile Constituents of Essential Oils Isolated at Different Growth Stages from Three *Conyza* Species Growing in Greece, *Flavour and Fragrance Journal*, 2005, 20(4), 425-428.
 27. Góra J., Lis A., Kula J., Staniszevska M., Wołoszyn A., Chemical Composition Variability of Essential Oils in the Ontogenesis of Some Plants, *Flavour and Fragrance Journal*, 2002, 17, 445-451.
 28. Mukhtar N., Iqbal K., Anis I., Malik A., Sphingolipids from *Conyza canadensis*, *Phytochemistry*, 2002, 61, 1005-1008.
 29. Csupor-Löffler B., Hajdu Z., Zupko I., Molnar J., Forgo P., Kele Z., Hohmann J., New Dihydropyrone Derivates and Further Antitumour Compounds from *Conyza canadensis*, *Planta Medica*, 2010, 76, 12.
 30. Queiroz S.C.N., Cantrell C.L., Duke S.O., Wedge D.E., Nandula V.K., Moraes R.M., Cerdeira A.L., Bioassay-Directed Isolation and Identification of Phytotoxic and Fungitoxic Acetylenes from *Conyza canadensis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 5893-5898.
 31. Veres K., Csupor-Löffler B., Lázár A., Hohmann J., Antifungal Activity and Composition of Essential Oils of *Conyza canadensis* Herbs and Roots, *The Scientific World Journal*, 2012, 1-5.
 32. Liu B.L., Wang G.C., Liu L.H., Dai Y., Ye C.W., Li L.Y., Pyromeconic Acid Derivatives from *Conyza canadensis* L. Cronq, *Chinese Chemical Letters*, 2011, 22, 694-696.
 33. Koniuszy E., Zioła a zdrowie, *Dodatek do Aury*, 12, 2001.
 34. Lis A., Góra J., Przymiotno kanadyjskie – roślina lecznicza i olejkodajna., *Wiadomości Zielarskie*, 2002, 6, 11-12.
 35. Anioł-Kwiatkowska J., Kwiatkowski S., Berdowski W., *Atlas Roślin Leczniczych*, 1993, Wydawnictwo „Arkady”, Warszawa.
 36. Polat R., Satul F., An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey), *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 136, 626-641.
 37. De Natale A., Pollio A., Plants Species in the Folk Medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy), *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 109, 295-303.
 38. Inta A., Shengji P., Balslev H., Wangpakapattanawong P., Trisonthi C., A Comparative Study on Medicinal Plants Used in Akha's Traditional Medicine in China and Thailand, Cultural Coherence or Ecological Divergence, *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 116, 508-517.
 39. Neves M.J., Matos C., Moutinho C., Querioz G., Gomes R.L., Ethnopharmacological Notes about Ancient Uses of Medicinal Plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal), *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 124, 270-283.
 40. Santayana P.M., Blanco E., Morales R., Plants known as té in Spain: An Ethnopharmacobotanical Review, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 98, 1-19.
 41. Demarque D., Jouanny J., Poiteuin B., Saint-Jean Y., *Homeopatyczna Materia Medica*, 2005, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
 42. *Poradnik terapeutyczny Heel*, 2000, Wroclawska Drukarnia Naukowa, Warszawa.

43. Lenfeld J., Motl O., Trka A., Anti-inflammatory Activity of Extracts from *Conyza canadensis*, Pharmazie, 1986, 41(4), 268-269.
44. Pawlaczyk I., Gancarz R., Czerchawski L., Kawala Z., Sposób wytwarzania preparatu hamującego krzepliwość krwi, wniosek patentowy nr P 351697, data 14.01.2002.
45. Kohlmunzer S., Farmakognozja - podręcznik dla studentów farmacji, 2007, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
46. Haslam E., Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action, Journal of Natural Products, 1996, 59, 205-215.
47. Lee H.J., Kim H.G., Evaluation of Antioxidant and Inhibitory Activities for Different Subclasses Flavonoids on Enzymes for Rheumatoid Arthritis, Journal of Food Science, 2010, 75(7), 212-217.
48. Moon H.S., Kim T.K., Lee K.N., Han S.Y., Nah Y.S., Cho G.S., Park Y.S., Paik D.H., Inhibitory Effects of Naryngenine and its Novel Derivatives on Hyaluronidase, Food Science and Biotechnology, 2009, 18(1), 267-270.
49. Przybylska D., Ocena działania przeciwwrotocznego przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L.), Normae Herbarum IPZ, 5, 1977.
50. Olas B., Saluk-Juszczak J., Pawlaczyk I., Nowak P., Kolodziejczyk J., Gancarz R., Wachowicz B., Antioxidant and Antiaggregatory Effects of an Extract from *Conyza canadensis* on Blood Platelets *in vitro*, Platelets, 2006, 17(6), 354-360.
51. Saluk-Juszczak J., Olas B., Pawlaczyk I., Gancarz R., Wachowicz B., Effects of the Extract from *Conyza canadensis* on Human Blood Platelet Aggregation, General Physiological Biophysics, 2007, 26, 150-152.
52. Saluk-Juszczak J., Olas B., Nowak P., Wachowicz B., Bald E., Głowacki R., Pawlaczyk I., Gancarz R., Extract from *Conyza canadensis* as a Modulator of Plasma Protein Oxidation Induced by Peroxynitrite *in vitro*, Central European Journal of Biology, 2010, 5(6), 800-807.
53. Hayet E.L., Maha M., Samia A., Ali M.M., Souhir B., Abderaouf K., Mighri Z., Mahjoub A., Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Extracts of *Conyza canadensis* L. Cronq Growing in Tunisia, Medicinal Chemistry Research, 2009, 18(6), 447-454.
54. Rana A.D., Afifi F., Antiproliferative Activity of Selected Medicinal Plants of Jordan against a Breast Adenocarcinoma Cell Line (MCF7), Scientia Pharmaceutica, 2007, 75, 121-136.
55. Rethy B., Csupor-Löffler B., Zupko I., Hajdu Z., Mathe I., Hohmann J., Redei T., Falkay G., Antiproliferative Activity of Hungarian *Asteraceae* Species against Human Cancer Cell Lines. Part I, Phytotherapy Research, 2007, 21(12), 1200-1208.
56. Hayet E.L., Laurent G., Mahjoub A., Mastouri M., Antiviral Activity of *Conyza canadensis* L. Cronq Extracts Grown in Tunisia, African Journal of Biotechnology, 2011, 10(45), 9097-9100.
57. Oskay M., Sari D., Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants, Pharmaceutical Biology, 2007, 45(3), 176-181.
58. LiXiao N., Xiang Yang H., ShiYin L., ShinJin C., GaoXiang R., Liang Z., Inhibitory Effects of the Extracts with Different Solvents from three *Compositae* plants on Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, Science China Chemistry, 2011, 54(7), 1123-1129.
59. Shakirullah M., Ahmad H., Shah M.R., Ahmad I., Ishaq M., Khan N., Badshah A., Khan I., Antimicrobial Activities of Conyzolide and Conyzoflavone from *Conyza canadensis*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2011, 26(4), 468-471.
60. Curini M., Bianchi A., Epifano F., Bruni R., Torta L., Zambonelli A., Composition and *in vitro* Antifungal Activity of Essential Oil of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France, Chemistry of Natural Compounds, 2003, 39(2), 191-194.
61. Begum Z., Shaukat S.S., Siddiqui A.I., Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Conyza canadensis*, *Blumea obliqua*, *Amaranthus viridis* and *Eclipta prostrata*, Pakistan Journal of Plant Pathology, 2003, 2(3), 174-180.

62. Woo K.S., Song S.B., Oh B.G., Seo M.C., Ko J.Y., Lee J.S., Kang J.R., Nam M.H., Jeong H.S., Antioxidant Activity of Ethanol Extracts from Horseweed (*Erigeron canadensis* L.) with Pretreatment Conditions, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2009, 38(9), 1279-1283.
63. Maurya D.S.P., Bagha H.S., Soni K.B., Preliminary Pharmacological Studies on *Erigeron canadensis* L., *The Indian Journal of Pharmacy*, 1973, 35(2), 62-63.
64. Lassere B., Kaiser R., Chanh P.H., Effects on Rats of Aqueous Extracts of Plants Used in Folk Medicine as Antihypertensive Agents, *Naturwissenschaften*, 1983, 70, 95-96.
65. Achrem-Achremowicz J., Grabowska K., Ellnain M., Budowa, występowanie oraz aktywność farmakologiczna glikoglicerolipidów, *Farmacja Polska*, 2009, 65(3), 184-191.
66. Maeda N., Kokai Y., Ohtani S., Sahara H., Yonezawa K.Y., Kuriyama I., Hada T., Sato N., Yoshida H., Mizushina Y., Antitumor Effect of Orally Administered Spinach Glycolipid Fraction on Implanted Cancer Cells, colon 26, in Mice, *Lipids*, 2008, 43, 741-748.
67. Maeda N., Kokai Y., Ohtani S., Sahara H., Hada T., Ishimaru C., Kuriyama I., Yonezawa Y., Iijima H., Yoshida H., Sato N., Mizushina Y., Anti-tumor Effects of the Glycolipids Fraction from Spinach which Inhibited DNA Polymerase Activity, *Nutrition and Cancer*, 2007, 57(2), 216-223.
68. Kuriyama I., Musumi K., Yonezawa Y., Takemura M., Maeda N., Iijima H., Hada T., Yoshida H., Mizushina Y., Inhibitory Effects of Glycolipids Fraction from Spinach on Mammalian DNA Polymerase Activity and Human Cancer Cell Proliferation, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005, 16, 594-601.
69. Matsubara K., Matsumoto H., Mizushina Y., Mori M., Nakajima N., Fuchigami M., Yoshida H., Hada T., Inhibitory Effect of Glycolipids from Spinach on *in vitro* and *ex vivo* Angiogenesis, *Oncological Reports*, 2005, 14(1), 157-160.
70. Kharazmi A., Laboratory and Preclinical Studies on the Anti-inflammatory and Anti-oxidant Properties of Rosehip Powder – Identification and Characterization of the Active Component GOPO®, *Osteoarthritis and cartilage*, 2008, 16(1), 5-7.
71. Chrubasik C., Wiesner L., Black A., Ladner M.U., Chrubasik S., A One-year Survey on the Use of a Powder from *Rosa canina* in Acute Exacerbations of Chronic Pain, *Phytotherapy Research*, 2008, 22, 1141-1148.
72. Kharazmi A., Winther K., Rose Hip Inhibits Chemotaxis and Chemiluminescence of Human Peripheral Blood Neutrophils *in vitro* and Reduces Certain Inflammatory Parameters *in vivo*, *Inflammopharmacology*, 1999, 7(4), 377-386.
73. Wenzig E.M., Widowitz U., Kunert O., Chrubasik S., Bucar F., Knauder E., Bauer R., Phytochemical Composition and *in vitro* Pharmacological Activity of Two Rose Hip (*Rosa canina* L.) Preparations, *Phytomedicine*, 2008, 15, 826-835.
74. Larsen E., Kharazmi A., Christensen P.L., Christensen B.S., An Antiinflammatory Galactolipid from Rose Hip (*Rosa canina*) that Inhibits Chemotaxis of Human Peripheral Blood Neutrophils *in vitro*, *Journal of Natural Products*, 2003, 66, 994-995.
75. Bruno A., Rossi C., Marcolongo G., Lena D.A., Venzo A., Berrie P.C., Corda D., Selective *in vivo* Anti-inflammatory Action of the Galactolipid Monogalactosyldiacylglycerol, *European Journal of Pharmacology*, 2005, 524, 159-168.
76. Berge J.P., Debiton E., Dumay Y., Durand P., Barthomeuf C., In Vitro Anti-inflammatory and Anti-proliferative Activity of Sulfolipids from the Red Alga *Porphyridium cruentum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 6227-6232.
77. Manez S., Carmen Recio M., Gil I., Gomez C., Giner R.M., Waterman P.G., Rios J.L., A Glycosyl Analogue of Diacylglycerol and Other Antiinflammatory Constituents from *Inula viscosa*, *Journal of Natural Products*, 1999, 62, 601-604.
78. Winget R.R., Antiinflammatory Compositions Containing Monogalactosyldiecosapentenoyle Glycerol and Methods of Relating thereto, wniosek patentowy nr 5620962, data

15.04.1997.

79. Ulivi V., Lenti M., Gentili C., Marcolongo G., Cancedda R., Cancedda D.F., Anti-inflammatory Activity of Monogalactosyldiacylglycerol in Human Articular Cartilage *in vitro*: Activation of an Anti-inflammatory Cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway, *Arthritis Research&Therapy*, 2011, 13, 92.
80. Martins A., Vasas A., Viveiros M., Molnar J., Hohmann C., Amaral L., Antibacterial Properties of Compound Isolated from *Carpobrotus edulis*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 37, 438-444.
81. Parrish C.C., Bodennes G., Gentien P., Haemolytic Glycoglycerolipids from *Gymnodinium species*, *Phytochemistry*, 1998, 47(5), 783-787.
82. Sakano Y., Mutsuga M., Suganuma H., Inakuma T., Toyoda M., Goda Y., Shibuya M., Ebizuka Y., Inhibition of Human Lanosterol Synthase by the Constituents of *Colocasia esculenta* (Taro), *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(2), 299-304.
83. Eitsuka T., Nakagawa K., Igarashi M., Miyazawa T., Telomerase Inhibition by Sulfoquinovosyldiacylglycerol from Edible Purple laver (*Porphyra yezoensis*), *Cancer Letters*, 2004, 212, 15-20.
84. Wang R., Furumoto T., Motoyama K., Okazaki K., Kondo A., Fukui H., Possible Antitumor Promoters in *Spinacia oleracea* (Spinach) and Comparison of their Contents among Cultivars, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66(2), 248-254.
85. Sugawara T., Miyazawa T., Separation and Determination of Glycolipids from Edible Plant Sources by High Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light-scattering Detection, *Lipids*, 1999, 34, 11, 1231-1237.
86. Yunoki K., Sato M., Seki K., Ohkubo T., Tanaka Y., Ohnishi M., Simultaneous Quantification of Plant Glyceroglycolipids Including Sulfoquinovosyldiacylglycerol by HPLC-ELSD with Binary Gradient Elution, *Lipids*, 2009, 44, 77-83.
87. Cunniff P., Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., AOAC International, 1995, Arlington, VA.
88. R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
89. Mariańska B., Fabijańska-Mitek J., Windyga J., Badania laboratoryjne w hematologii – Podręcznik dla słuchaczy studiów medycznych, 2006, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
90. Ellnain M., Hubicka U., Żuromska B., Janeczko Z., Krzek J., Densitometric Quantification of Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) in Extracts of Fresh Samples of *Erigeron canadensis* Collected at Different Stages of Growth, *Journal of Planar Chromatography*, 2011, 24(3), 248-252.
91. Sakat S.S., Juvekar R.A., Gambhire M.N., *In-vitro* Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Methanol Extracts of *Oxalis corniculata* L., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2010, 2(1), 146-155.
92. Sannigrahi S., Parida S., Patro J.V., Mishra S.U., Pathak A., Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of *Pterospermum acerifolium*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Review and Research*, 2010, 2(1), 1-5.
93. Leelaprakash G., Daas M.S., *In vitro* Anti-inflammatory Activity of Methanol Extract of *Enicostemma axillare*, *International Journal of Drug Development&Research*, 2011, 3(3), 189-196.
94. Govindappa M., Naga S.S., Poojashri M.N., Sadananda T.S., Chandrappa C.P., Antimicrobial, Antioxidant and *in vitro* Anti-inflammatory Activity of Ethanol Extract and Active Phytochemical Screening of *Wedelia trilobata* L. Hitchc., *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2011, 3(3), 43-51.

95. Sathe B.S., Jagtap V.A., Deshmukh S.D., Jain B.V., Screening of *in vitro* Anti-inflammatory Activity of Some Newly Synthesized Fluorinated Benzothiazolo Imidazole Compounds, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2011, 3(3), 220-222.
96. Christie W.W., Advances in lipid methodology - 3, The Oily Press, 1996, 211-332.
97. ICH-Q2 (R1) Validation and Analytical Procedures: Text and Methodology, International Conference on Harmonization, Geneva, November 2005, <http://www.ich.org>.
98. Ferenczi-Fodor K., Renger B., Vegh Z., The Frustrated Reviewer – Recurrent Failures in Manuscripts Describing Validation of Quantitative TLC/HPTLC Procedures for Analysis of Pharmaceuticals, Journal of Planar Chromatography, 2010, 23(3), 173–179.
99. Barański S., Czerski P., Krzemińska-Ławkowicz I., Krzymowski T., Ławkowicz W., Układ krwiotwórczy zwierząt laboratoryjnych, wartości prawidłowe i atlas, 1962, PWN, Warszawa.
100. Ozougwu J.C., An Investigation of the Effects of *Allium sativum* (garlic) Extracts on Haematological Profile of White Albino Rats, Pharmacologyonline, 2011, 2, 299-306.
101. Nwinuka N.M., Monamu M.O., Nwiloh B.I., Effects of Aqueous Extract of *Mangifera Indica* (Mango) Stem Bark on Haematological Parameters of Normal Albino Rats, Pakistan Journal of Nutrition, 2008, 7(5), 663-666.
102. Lee K.P., Emperipolesis of Hematopoietic Cells within Megakaryocytes in Bone Marrow of the Rat, Veterinary Pathology, 1989, 26, 473-478.
103. Yener Y., Dikmenli M., The Effects of Acrylamide on the Frequency of Megakaryocytic Emperipolesis and the Mitotic Activity of Rat Bone Marrow Cells, Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91, 1810-1813.
104. Jayaprakasam B., Zhang Y., Nair G.M., Tumor Cell Proliferation and Cyclooxygenase Enzyme Inhibitory Compounds in *Amaranthus tricolor*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52, 6939-6943.
105. Mizushima Y., Kobayashi M., Interaction of Anti-inflammatory Drugs with Serum Proteins, Especially with Some Biologically Active Proteins, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1968, 20, 169-173.
106. Grant N.H., Harvey E., Kryzanasuskas A., Kryzanasuskas C., Stabilization of Serum Albumin by Anti-inflammatory Drugs, Biochemical Pharmacology, 1970, 19, 715-722.
107. Boik J., Natural Compounds in Cancer Therapy, 2001, Oregon Medical Press, Minnesota, USA.