

Rośliny lecznicze z rodziny *Dipsacaceae*

Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Irena Matławska

MEDICINAL PLANTS OF THE DIPSACACEAE

SUMMARY

Plants from the *Dipsacaceae* family have already been used in folk medicine since the Middle Ages, among other things, to treat diseases of the respiratory tract (for example, asthma, tuberculosis, pleurisy, cough), metabolic disorders (i.e. rheumatism, gout) as well as cutaneous conditions, such as ulcers or warts, as an agent with antiseptic properties and ones accelerating wound healing. They have also been used to fight toothache and rheumatic pain. They contain compounds from the groups of flavonoids, phenolic acids, triterpene saponosides and mono-, bis- and tetra-iridoids. So far, analgesic and anti-inflammatory properties of *Pterocephalus hookei*, connected with the presence of triterpene saponins, have been proven, along with analgesic and antiarthritic properties of *Dipsacus asperoides*, probably determined by the presence of asperosaponin VI. Also, neuroprotective properties related with the activity of saponin fractions in the extract of *Dipsacus asperoides* have been demonstrated, just as cardioprotective properties of asperosaponin X and VI from *D. asperoides*. The polysaccharide isolated from the roots of *Dipsacus asperoides* showed antioxidant and cytotoxic activity in relation to the cells of osteosarcoma. Antiproliferative activity of gigantaside D and E from *Cephalaria gigantea* against the cells of melanoma and human leukemia has been determined, as well as antimicrobial properties of *Succisa pratensis*, *Succisella inflexa*, *Knautia arvensis*, *Scabiosa ochroleuca*, and *Dipsacus silvestris*.

KEY WORDS: DIPSACACEAE – ACTIVITY – CHEMICALS

Wstęp

Szczeciowate (*Dipsacaceae* Juss.) to rodzina kwitnących roślin okrytonasiennych z rzędu Szczeciowców (*Dipsacales*) (1). W zależności od ujęcia systematycznego rodzina obejmuje około 270 gatunków, do których należą roczne rośliny zielne, byliny oraz półkrzewy. Większość występuje w Europie, Azji oraz Afryce. W Polsce występuje pięć rodzajów – czarcikęs (*Succisa* Haller), czarcikęsik (*Succisella* Beck), driakiew (*Scabiosa* L.), szczeń (*Dipsacus* L.) i świerzbica (*Knautia* L.) (2, 3).

O zastosowaniu niektórych gatunków roślin z rodziny *Dipsacaceae* w medycynie ludowej dowiadujemy się z XVI-wiecznych zielników. Bogate opisy wskazują na wykorzystywanie *Dipsacus silvestris* (Szczeń pospolita) jako środka przeciwbólowego w leczeniu reumatyzmu oraz dny moczanowej. *Knautia arven-*

sis (Świerzbica polna) stosowana była doustnie, m.in. w leczeniu kaszlu, astmy, zapalenia płucnej, gruźlicy, biegunek, a także miejscowo, jako środek przyspieszający gojenie wrzodów i brodawek (4). *Succisa pratensis* (Czarcikęs łąkowy) została opisana przez papieża Jana XXI w średniowiecznym poradniku medycyny naturalnej pt. *Thesaurus pauperum*, jako lek łagodzący ból zębów (5). Zgnieciony korzeń *Succisa pratensis*, ze względu na właściwości ściągające i antyseptyczne, stosowano na stłuczenia oraz sączące się wypryski (4, 6). Wierzono, że zawieszony na szyi sznur z korzeniem *Succisa pratensis* będzie zapobiegał dolegliwościom oczu (4). Kwiatostany *Dipsacus sativus* (Szczeń sukiennicza) używane były do gręplowania wełny oraz czesania wełnianych tkanin. W dzisiejszych czasach suche i barwione kwiatostany znajdują zastosowanie jako składniki bukietów (7).

Charakterystyka botaniczna

Rodzina *Dipsacaceae* wykazuje podobieństwo do rodziny *Asteraceae* (*Compositae* – złożone), z którą nie jest jednak spokrewniona (8). Rośliny z rodziny Szczeciowatych mają pojedyncze, często szorstkie liście, ułożone naprzeciwlegle lub okółkowo. Kwiaty są zazwyczaj drobne, grzbieciste, zebrane w kwiatostany zwane koszyczkiem, otoczone wielolistnymi okrywami. Kielich jest słabo rozwinięty, często otoczony błoniastym kieliszkiem. Korona powstaje poprzez zrośnięcie 4-5 płatków. Rodzinę tę charakteryzują zwykle 4 pręciki, jak również słupek dolny. Jej owoc stanowi zaś niełupka (2).

Poszczególne gatunki z rodziny *Dipsacaceae* można spotkać na różnych siedliskach – w zależności od stopnia wilgotności podłoża i odczynu gleby. *Succisa pratensis* występuje pospolicie na wilgotnych łąkach torfowiskowych, łąkach górskich oraz na brzegach lasów. Dogodne podłoże do jej wzrostu stanowią słabo kwaśne i wilgotne gleby. Przeciwnie zaś, *Knautia arvensis* preferuje suche łąki, przydroża, wzgórza, a także gleby gliniaste z wysoką zawartością wapnia (9). Z kolei *Dipsacus sativus* i *Scabiosa caucasica* rosną na glebach umiarkowanie wilgotnych, o odczynie obojętnym lub zasadowym (10).

Skład chemiczny

Skład chemiczny jest stosunkowo słabo poznany. Dotychczas w roślinach z rodziny *Dipsacaceae* zidentyfikowano związki z grupy flawonoidów, kwasy fenolowe, saponozydy i irydoidy. W pięciu krajowych gatunkach: *Dipsacus silvestris* L., *Knautia arvensis* Coult., *Scabiosa ochroleuca* L., *Succisa pratensis* Moench. oraz *Succisella inflexa* Beck. zidentyfikowano związki polifenolowe z przewagą kompleksu flawonoidów, w tym luteoliny i jej 7-glukozydu, apigeniny, kwercetyny, kemferolu. Fenolokwasy, takie jak kwas chlorogenowy, protokatechowy, *p*-kumarowy i *p*-hydroksybenzoesowy, wyizolowano z surowców w dominującej ilości (11, 12).

Saponozydy triterpenowe, charakterystyczne dla rodzaju *Dipsacus*, występują w formie wolnego kwasu oleanowego i ursolowego lub aglikonów hederageniny oraz kwasu oleanowego (13, 14). Monoirydoidy, zidentyfikowane do tej pory w *Dipsacus asper* Wall., to loganina, kwas loganinowy oraz swerozyd (13, 15). Obecność swerozydu potwierdzono również w *Dipsacus laciniatus* L. i *Dipsacus silvestris* L. (13). Zidentyfikowano bisirydoidy: kanteiozyd, lacinatozyd, sylwesterozyd w *Dipsacus asper* Wall., *Dipsacus japonicus* Miq., *Dipsacus laciniatus* L. i *Dipsacus silvestris* L. Ponadto z *Dipsacus asper* Wall. wyizolowano również tetrairydoidy – dipsanozyd A i B (13).

Właściwości biologiczne

Działanie antyoksydacyjne

Przeciwutleniacze to grupa związków chemicznych, które usuwają nadmiar wolnych rodników. Antyoksydanty zapobiegają rozwojowi chorób cywilizacyjnych, takich jak miażdżyca, cukrzyca, choroby serca, czy nowotwory, ponieważ wspierają naturalne mechanizmy obronne komórek człowieka. Rośliny stanowią bogate źródło przeciwutleniaczy, ze względu na zawartość polifenoli, karotenoidów, witamin A, C, E oraz bio pierwiastków, np. selenu, które nie są syntetyzowane w organizmie człowieka (16).

Główną przyczyną ostrej niewydolności nerek jest uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne, które pojawia się podczas zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu, czy zamknięcia naczyń krwionośnych kończyn dolnych. Dziś wiadomo, że jest to proces zapalny wywołany przez reaktywne formy tlenu (ROS). Podczas niedokrwienia może dojść do nieodwracalnej dysfunkcji tkanek, w zależności od stopnia ciężkości i czasu trwania zaburzeń przepływu krwi. Szczególnie narażone są nerki, ze względu na zmniejszoną obronę antyoksydacyjną z powodu niskiego stężenia zreduko-

wanego glutationu (GSH) i dysmutazy ponadtlenowej (SOD) (17). Prawdopodobnie oprócz kwasów fenolowych i flawonoidów, także polisacharydy roślinne wykazują silne właściwości przeciwutleniające, prowadząc w ten sposób do ochrony komórek i tkanek przed wolnymi rodnikami.

Przy użyciu chromatografii jonowymiennej, chińscy naukowcy wyizolowali z korzeni *Dipsacus asperoides* polisacharyd – WRDAP-1, zbudowany z glukozy, mannozy, galaktozy, ramnozy i arabinozy, a jego ciężar oszacowano, za pomocą wysokosprawnej chromatografii żelowej, na 61 kDa. Badanie obejmowało oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej w celu ustalenia, czy polisacharyd może skutecznie zabezpieczyć uszkodzone nerki przed stresem oksydacyjnym. Liczne badania potwierdziły, że enzymy przeciwutleniające, do których należą katalaza, glutation i peroksydaza odgrywają ważną rolę w systemie endogennej obrony przed wolnymi rodnikami, takimi jak $O^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} . Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne powoduje znaczący spadek wymienionych enzymów, jednak WRDAP-1 w ilości 50, 100 i 200 mg/kg masy ciała, podawany doustnie samcom szczurów Wistar codziennie przez okres 14 dni, wywierał korzystny wpływ na odbudowę powyższych zmiataczy reaktywnych form tlenu. Dodatkowo sprawność czynności nerek oceniono za pomocą markerów biochemicznych, takich jak kreatynina i azot mocznika. W surowicy krwi zwierząt z niewydolnymi nerkami, którym nie podawano polisacharydu, stężenie kreatyniny wynosiło 1,34 mg/dl, a azot mocznika wynosił 112,5 mg/dl. Podawanie WRDAP-1 obniżyło wartości biomarkerów we wszystkich trzech testowanych dawkach, zwłaszcza w najwyższej dawce 200 mg/kg. Stężenie kreatyniny spadło do wartości 0,74 mg/dl, a azot mocznika został zredukowany do wartości 48,3 mg/dl. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy wnioskuje, że polisacharyd wyizolowany z korzeni *Dipsacus asperoides* może być obiecującym środkiem chroniącym przed stresem oksydacyjnym oraz poprawiającym czynność nerek po uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym (18).

Działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest chorobą autoimmunologiczną, która charakteryzuje się przewlekłym zapaleniem błony maziowej stawów. Stopniowe niszczenie tkanki łącznej może doprowadzić do unieruchomienia, a następnie całkowitego usztywnienia stawów. Choroba ta dotyka około 1% populacji dorosłych i ma znaczący wpływ na funkcjonowanie fizyczne, emocjonalne i społeczne pacjentów. W RZS najpowszechniej stosowane są niesteroidowe

leki przeciwzapalne (NLPZ), których działanie polega na hamowaniu mediatorów zapalnych COX-1 i COX-2. Niestety leki te obarczone są wieloma działaniami niepożądanymi, dlatego konieczne jest opracowanie bezpiecznych środków terapeutycznych (19).

Pterocephalus hookeri jest stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej w leczeniu grypy, reumatoidalnego zapalenia stawów i chorób jelit. Aby potwierdzić skuteczność jego działania zbadano wodne i etanolowe wyciągi z liści pod kątem aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej. Badanie przeprowadzono na samicach i samcach myszy oraz samcach szczurów typu Sprague-Dawley, u których przy użyciu karageniny i ksylenu wywołano obrzęki, natomiast podawanie kwasu octowego powodowało wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych. Wyciąg wodny stosowano w dawkach 2 g/kg i 4 g/kg, natomiast etanolowy w dawkach 1 g/kg i 2 g/kg. Spośród badanych wyciągów tylko wyższe stężenia łagodziły obrzęk ucha indukowany przez ksylen oraz w znaczący sposób hamowały wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych. Ponadto za pomocą testu gorącej płyty grzejszej ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$) analizowano działanie przeciwbólowe wyżej wymienionych wyciągów. Badanie polegało na obserwacji reakcji bólowych myszy po 30, 60 i 90 sekundach od podania testowanych wyciągów oraz indometacyny jako próby kontrolnej. Zauważono, że już po 60 s oba wyciągi podniosły próg bólowy szczurów. Podobny efekt uzyskano po 90 s, jednak efekt nie był zależny od dawki. Aktywność tego surowca może być związana z hamowaniem uwalniania lub syntezy endogennych mediatorów zapalnych, takich jak histamina, serotonina, prostaglandyny i bradykininy (20). Z analiz fitochemicznych wynika, że *P. hookeri* zawiera saponiny triterpenowe, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe. Powyższe badanie sugeruje, że surowiec może być stosowany w leczeniu chorób o podłożu zapalnym.

Dipsaci radix znalazł zastosowanie w medycynie orientalnej jako środek wzmacniający kości. Przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie, czy surowiec może być również wykorzystany w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. Stan chorobowy został wywołany u samców myszy DBA/1 za pomocą kolagenu typu II (CII), po czym monitorowano w surowicy krwi tych zwierząt stężenie mediatorów zapalnych IgG2a, prostaglandyny E, cytokin zapalnych (TNF- α , IL-1 β , IL-6) oraz przeciwciał anti-CII. Myszom podawano doustnie wodny ekstrakt z *Dipsaci radix* codziennie przez okres 21 dni, w dawce 50 mg/kg lub 100 mg/kg. Po tym czasie zaobserwowano zmniejszenie poziomu przeciwciał i mediatorów zapalnych u zwierząt leczonych tym wyciągiem, w porównaniu

do myszy, którym podawano placebo (woda). Co istotne, ekstrakt hamował proces chorobowy w podobnym stopniu jak indometacyna – skuteczny inhibitor COX-2, stosowany w celu złagodzenia dolegliwości bólowych związanych z artretyzmem. Na drodze analizy HPLC zidentyfikowany został główny związek znajdujący się w badanym wyciągu – asperosaponina VI, która prawdopodobnie odpowiada za korzystne właściwości *Dipsaci radix*. Wyniki jednoznacznie wskazują, iż ekstrakt z korzeni *Dipsacus asperoides* wykazywał właściwości przeciwzapalne i przeciwartretyczne (19).

Działanie neuroochronne

Choroba Alzheimer'a należy do schorzeń neurodegeneracyjnych. Charakteryzuje się postępującym otępieniem psychicznym, które wynika z zaniku neuronów – zwłaszcza w korze mózgowej i strukturach limbicznych. Patomechanizm choroby nie jest do końca wyjaśniony, jednak uważa się, że jednym z czynników mogą być hiperfosforylowane białka tau (*microtubule associated protein tau*), które powodują obumieranie neuronów. Ponadto przypuszcza się, że zaburzenia funkcji poznawczych wiążą się z odkładaniem tzw. płytek starczych zbudowanych z β -amyloidu. β -Amyloid działa neurotoksycznie, ponieważ indukuje tworzenie wolnych rodników oraz upośledza transport glukozy w neuronach, co prowadzi do uszkodzenia i śmierci komórek (21).

Zbadano potencjał neuroochronny wodnego wyciągu z *Dipsacus asper*. Kontrolę pozytywną stanowił kwas salwianolowy B wyizolowany z *Salvia miltiorrhiza*, o udowodnionym działaniu chroniącym przed β -amyloidem. Eksperyment przeprowadzono na komórkach linii PC12, wyizolowanych z guza chromochłonnego szczurów. Komórki początkowo hodowano na podłożu RPMI-1640 (zawierającym L-glutaminę i NaHCO_3) z dodatkiem 10% NBSC (surowicy cielęcej), a po 25 dniach przeniesiono na płytki pokryte poli-D-lizyną. Analiza wykazała, że wyciąg wodny z *D. asper* w stężeniu 0,1-1 mg/ml, w dużym stopniu zabezpieczał przed uszkodzeniem badanych komórek (żywołność komórek wzrosła o 30%). Stężenia wyciągu wodnego powyżej 5 mg/ml doprowadziły do znacznej cytotoxyczności (zmniejszenie żywołności komórek o 80%). Autorzy argumentują, że prawdopodobnie nadmierna dawka wyciągu spowodowała obniżenie pH, które jest niekorzystne dla przeżycia komórek. Ponadto w wyciągu mogły występować śladowe ilości związków neurotoksycznych, które uległy kumulacji. Dalsze badania potwierdziły, że cytoochronne związki znajdowały się we frakcji saponin, z których najważniejsza okazała się akebia saponina

D. Metodą hydrolizy kwasowej przekształcono akebia saponinę D w aglikon – hederageninę, jednak ani wysoka, ani niska dawka hederageniny nie wykazywały właściwości ochronnych przed działaniem β -amyloidu. Aby zapobiec rozkładowi saponiny po podaniu doustnym przez bakterie jelitowe, naukowcy sugerują wykorzystanie nowoczesnych nośników leku, takich jak nanocząsteczki czy liposomy (22).

Działanie kardioochronne

Działanie ochronne na mięsień sercowy jest szczególnie istotne przy chorobie niedokrwiennej, która w rezultacie może doprowadzić do zawału. Objawy chorobowe są następstwem przewlekłego, niewystarczającego zaopatrzenia komórek mięśnia sercowego w tlen i substancje odżywcze. Naukowcy poddali analizie asperosaponinę X, wyizolowaną z korzeni *Dipsacus asper*, w celu sprawdzenia jej potencjalnych właściwości kardioochronnych. Do eksperymentu posłużyły dorosłe szczury linii Sprague-Dawley, u których po znieczuleniu ketaminą (100 mg/kg) i ksylazyną (10 mg/kg), badacze doprowadzili operacyjnie do częściowej niedrożności aorty. W ciągu 5 min od tego zabiegu, zwierzęta otrzymały drogą iniekcji dożylną wodny roztwór asperosaponiny X w dawce 10 mg/kg, a po 24 godz. od wywołania hipoksji, zbadano histopatologicznie tkanki mięśnia sercowego. Zgodnie z oczekiwaniami, u szczurów otrzymujących jedynie roztwór soli fizjologicznej, zaobserwowano liczne obszary nekrotyczne, a także obfite oznaki krwawienia (żywność komórek serca wyniosła 51,2%). Zaobserwowano, że w grupie zwierząt, którym wstrzyknięto dożylnie saponinę z *Dipsaci radix*, obszar dotknięty zmianami w wyniku zawału był znacznie mniejszy, a żywność komórek serca wyniosła 66,8%. Prawdopodobnie główny mechanizm polegał na osłabieniu cytotoksyczności spowodowanej przez hipoksję, a także zablokowaniu interleukiny 6 oraz czynnika prozapalnego TNF- α , co w konsekwencji chroniło niewydolne komórki mięśnia sercowego szczurów przed dalszym uszkodzeniem. Badacze wyciągnęli wnioski, że podanie asperosaponiny X natychmiast po stwierdzeniu incydentu wieńcowego, spowodowało poprawę hemodynamiki oraz zmniejszyło niedokrwienie serca (23).

Jak dotąd jedynym skutecznym postępowaniem przy zawale serca jest leczenie reperfuzyjne, które polega na jak najszybszym przywróceniu krążenia w naczyniach wieńcowych. W tym celu wykonuje się przezskórną angioplastykę wieńcową i stosuje leki fibrynolityczne, które rozpuszczają skrzep i tym samym zmniejszają ryzyko zgonu. Właściwości kardio-rotekcyjne asperosaponiny VI, pozyskanej z frakcji

wodno-metanolowej korzeni *Dipsacus asper*, badano w warunkach *in vivo* na samcach szurów Sprague-Dawley oraz *in vitro* na hodowlach komórkowych kardiomiocytów. Model zawału mięśnia sercowego uzyskano przez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej, po czym sztucznie wentylowano zwierzęta oraz monitorowano i rejestrowano parametry elektrokardiograficzne (EKG). Szczurom, które przeżyły w ciągu 5 min po okluzji naczyń wieńcowych, wstrzyknięto dożylnie asperosaponinę VI w dawce 5 mg, 10 mg oraz 20 mg/kg m.c. Po 240 min zakończono badanie, a następnie serca poddano obserwacji histopatologicznej. Asperosaponina VI w dawce 10 mg i 20 mg/kg masy ciała powodowała wzrost przeżywalności komórek serca, odpowiednio o 70% i 80%, w porównaniu do grupy otrzymującej roztwór soli fizjologicznej – 55%.

Analiza *in vitro* polegała na dodaniu nadtlenu wodoru do hodowli kardiomiocytów, a następnie zbadaniu metodą kolorymetryczną za pomocą testu MTT zmian, które zaszły wewnątrz komórek. Kardioochronne działanie saponiny autorzy tłumaczą zmiataniem produktów peroksydacji lipidów i reaktywnych form tlenu, takich jak anion ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy i H₂O₂, które są uważane za ważne czynniki wywołujące uszkodzenie kardiomiocytów. Ponadto podczas zawału serca wzrasta poziom wewnątrzkomórkowego Ca²⁺, który zakłóca gradient protonów w błonie mitochondrialnej, mając negatywny wpływ na produkcję ATP. Badacze zaobserwowali, że wyizolowany saponozyd zapobiegał wzrostowi mitochondrialnego Ca²⁺, dzięki czemu hamował przepuszczalność błon mitochondrialnych i utrzymywał wytwarzanie ATP, przywracając w ten sposób funkcje mitochondriów (24).

Mimo rosnącego zainteresowania suplementami oraz naparami ziołowymi, stosowanymi przewlekłe w problemach zdrowotnych, ich wpływ na homeostazę układu krążenia pozostaje w dużej mierze nieznaną. Nadmierna ilość płytek krwi przyczynia się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, poprzez promowanie kaskady krzepnięcia i formowanie agregatów. Aktywność prokoagulacyjna może doprowadzić do nadciśnienia, zawału mięśnia sercowego, czy zakrzepicy płucnej. W związku z powyższym zbadano 21 wodnych ekstraktów ziołowych, aby sprawdzić czy mogą prowadzić do nadmiernej krzepliwości krwi. Świeżo wyizolowane ludzkie trombocyty potraktowane zostały wyciągami roślinnymi w dawce 500 μ g/ml przez 1 godz., po czym oceniono ich aktywność prokoagulacyjną za pomocą kompleksowego testu protrombinazy, mierząc szybkość wytwarzania trombin z protrombiny. Napar z *Dipsacus radix* najsilniej indukował kaskadę krzepnięcia płytek krwi. Aktywność

prokoagulacyjna ekstraktu sięgała 2,0 Ila/min/10⁵ komórek i była 10 razy wyższa od próby kontrolnej (15). Według badaczy działanie prozakrzepowe związane było ze zwiększoną ekspresją fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony komórkowej trombocytów, na której mogą zachodzić niektóre etapy krzepnięcia krwi (25). Zdarzenia te mogą być inicjowane przez zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, które powoduje wyczerpywanie ATP lub mechanizmów zależnych od reaktywnych form tlenu.

Spośród wyizolowanych i zidentyfikowanych związków z *Dipsacus asper* (loganina, swerozyd, cantleiozyd, hederagenina, akebia saponina D, dipsacus saponina A i C, kwas oleanolowy), jako kluczowy czynnik zwiększający aglutynację krwi została zidentyfikowana dipsacus saponina C. Aby potwierdzić prozakrzepowe działanie dipsacus saponiny C, związek ten w dawce 10 i 25 mg/kg m.c., podano za pomocą jednorazowej iniekcji dożylniej samcom szczurów linii Sprague-Dawley. Stosując cytometrię przepływową analizowano szczurzy model zakrzepicy żylniej. Zaobserwowano pojawienie się licznych skrzeplin w naczyniach krwionośnych (15).

Działanie cytotoksyczne

Gatunki z rodziny *Dipsacaceae*: *Dipsacus asperoides* oraz *Cephalaria gigantea* przebadano w kierunku aktywności cytotoksycznej.

Aktywność cytotoksyczną oznaczono dla polisacharydu wyizolowanego z wodnego wyciągu z korzeni *Dipsacus asperoides* (Szczec popołita). Związek o średniej masie cząsteczkowej 16 Da, zbudowany był z glukozy, ramnozy, arabinozy i mannozy. Badanie obejmowało ocenę wpływu polisacharydu na żywotność komórek nowotworu złośliwego tkanki kostnej – mięsaka kościopochodnego oraz ustalenie możliwych mechanizmów aktywności cytotoksycznej. Analiza została przeprowadzona w warunkach *in vitro* na linii komórkowej ludzkiego kostniakomięsaka. Komórki hodowano na pożywce DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) z dodatkiem 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Następnie komórki potraktowano różnymi stężeniami polisacharydu (25-400 µg/ml) i inkubowano przez 24 godz. Po tym czasie zmierzono żywotność komórek za pomocą testu MTT, który umożliwia pomiar przemian energetycznych w mitochondriach. Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a ściślej do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. Ekstrakt hamował proliferację linii komórkowej nowotworu złośliwego tkanki kostnej w sposób zależny od dawki. Przy stężeniu 25 µg/ml wskaźnik przeżywalności komórek wynosił 70%, tym-

czasem przy stężeniu 400 µg/ml spadł do 35%. Za kluczowe działanie uznano indukcję apoptozy, która była głównie związana z wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS). Ponadto autorzy wykonali test Western blood i na jego podstawie udowodnili, iż polisacharyd hamował również szlak sygnalizacji 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) i fosforylowanej kinazy białkowej AKT oraz odgrywał istotną rolę w progresji nowotworów (26).

Działanie antyproliferacyjne metanolowego ekstraktu z korzeni *Cephalaria gigantea* (Głowaczek olbrzymi) zostało przeprowadzone w warunkach *in vitro*. W wyciągu zidentyfikowano gigantozidy od D do N. Do oceny cytotoksyczności wykorzystano linie komórkowe czerniaka MEL-5 oraz ludzkiej białaczki HL-60, które inkubowano przez 72 godz. Spośród testowanych związków jedynie gigantozidy D i E w stężeniu 7,5 µM działały antyproliferacyjnie, powstrzymując rozwój komórek czerniaka MEL-5. Komórki białaczki ludzkiej HL-60 okazały się bardziej wrażliwe na wyżej wymienione saponiny – IC₅₀ gigantozydu D było równe 3,15 µM, a gigantozydu E – 6,8 µM (27).

Aktywność cytostatyczną związków wyizolowanych z korzeni *Dipsacus asper*, takich jak asperosaponina A, B i C, akebia saponina D, X i PA, 3-O-α-L-arabinopiranozylo-28-O-(β-D-glukopiranozylo – (1→6)-β-D-glukopiranozyd kwasu oleanolowego oraz 3-O-β-D-glukopiranozylo-(1→3)-α-L-ramnopiranozylo – (1→2)-α-L-arabinopiranozyd hederageniny badano na ludzkich liniach komórek nowotworowych raka płuc A-549, raka wątroby BEL-7402 i raka żołądka BGC-823. Analizę prowadzono na pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydłowej. Związki w stężeniu 100 µM наносzono na płytki i inkubowano przez 48 godz. Wyniki badań wskazywały, że żaden związek nie odznaczał się aktywnością cytotoksyczną wobec badanych komórek nowotworowych (IC₅₀ < 100 µM) w porównaniu z doksorubicyną (IC₅₀ < 10 µM) (14).

Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Badano aktywność przeciwdrobnoustrojową wyciągów metanolowych otrzymanych z ziela *Succisa pratensis*, *Succisella inflexa*, *Knautia arvensis*, *Scabiosa ochroleuca* oraz *Dipsacus silvestris* względem trzech patogennych grzybów: *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* i *Aspergillus fumigatus*. Najsilniejszą aktywnością przeciwko *Candida albicans* charakteryzowały się wyciągi z *S. inflexa* i *D. silvestris*. Aktywność wyciągu z *K. arvensis* była porównywalna do nystatyny (związek referencyjny), natomiast najmniejszą strefę zahamowania wzrostu zaobserwowano dla wyciągów otrzymanych z *S. pratensis* i *S. ochroleuca*.

Najsilniej w stosunku do *Rhodotorula rubra* działał wyciąg z *S. pratensis*. Wyciągi z *S. inflexa* i *D. silvestris* działały nieco słabiej, podczas gdy wyciągi z *S. ochroleuca* i *K. arvensis* wykazywały najslabszą aktywność (słabszą od nystatyny). Wyciągi z *S. pratensis*, *S. inflexa* i *D. silvestris* charakteryzowały się także najsilniejszą aktywnością, porównywalną do nystatyny, w stosunku do *Aspergillus fumigatus*. Analiza fitochemiczna HPLC wykazała obecność w badanych wyciągach kwasów fenolowych i flawonoidów, które jak sugerują autorzy, mogą odpowiadać za działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Ustalono, że wyciąg z *D. silvestris* zawierał 7-glikozyd apigeniny, kwercetynę, kwas chlorogenowy, kwas ferulowy, kwas izoferulowy, kwas *p*-kumarowy; z *K. arvensis*: 7-glikozyd apigeniny, 7-glikozyd luteoliny, kwas *p*-kumarowy, kwas *p*-hydroksybenzoesowy, kwas syringowy; z *S. ochroleuca*: 3-glikozyd kemferolu, 7-glikozyd luteoliny, kwas chlorogenowy, kwas *o*-kumarowy, kwas *p*-hydroksybenzoesowy, kwas protokatechowy; z *S. pratensis*: 3-glikozyd kemferolu, 7-glikozyd luteoliny, naryngeninę, kwas chlorogenowy, kwas izoferulowy, kwas *p*-hydroksybenzoesowy, kwas protokatechowy; z *S. inflexa*: 7-glikozyd apigeniny, kwas chlorogenowy, kwas ferulowy, kwas izoferulowy, kwas *o*-kumarowy, kwas *p*-kumarowy oraz kwas *p*-hydroksybenzoesowy (12).

Wyciągi: etanolowy, octanu etylu oraz dichlormetanu ze świeżych korzeni *Dipsacus silvestris* Huds. badano pod kątem aktywności przeciwko *Borrelia burgdorferi*. Analizę prowadzono przez 8 dni w warunkach *in vitro* na podłożu BSK II (Barbour-Stoener-Kelly). Próbę odniesienia stanowiła amoksycylina, stosowana jako standard w leczeniu boreliozy. Na podstawie wyników ustalono, że wyciągi otrzymane za pomocą octanu etylu i dichlormetanu, charakteryzowały się zbliżoną aktywnością do amoksycyliny (0,5 µg/ml). Niepolarne frakcje spowodowały inhibicję wzrostu *Borrelia burgdorferi* już w pierwszym dniu badań, a po 8 dniach obserwowano blisko 100% efekt bakteriobójczy. Badacze zaobserwowali również, że wyciąg etanolowy spotęgował wzrost drobnoustrojów. Kolejny etap badań polegał na ustaleniu charakteru związków bioaktywnych obecnych w korzeniach z *Dipsacus silvestris* (28).

Olejki eteryczne wyizolowane z świeżych owoców, ziela oraz kwiatów *Scabiosa arenaria* Forssk. poddano analizie identyfikacyjnej, ustalając kamforę, α-tujon oraz chryzantenon jako dominujące w ziele i kwiatach, podczas gdy w olejku z owoców dominowały β-tujon, kamfora i 1,8-cyneol. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejków w stosunku do bakterii Gram-dodatnich: *Streptococcus* gr. B,

Staphylococcus saprophyticus, *S. aureus*, *S. epidermidis* i bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter diversus*, *Salmonella enteritidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, a także patogennych grzybów z rodzaju *Candida* wykazało, że najsilniej działał olejek eteryczny z kwiatów, następnie olejek z ziela, a najslabiej olejek z owoców. Aktywność olejku eterycznego z kwiatów wobec *S. aureus* (MIC = 0,1562 mg/ml; MBC = 0,3125 mg/ml) była nieznacznie niższa od tymolu (MIC = 0,2 mg/ml) oraz wyższa od gentamycyny (MBC = 0,01562 mg/ml) stosowanych jako substancje referencyjne. W stosunku do pozostałych drobnoustrojów olejek z kwiatów wykazywał umiarkowaną aktywność (MIC = 5-10 mg/ml), podobnie jak olejek eteryczny z ziela oraz owoców (MIC = 2,5-10 mg/ml). Działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec *S. aureus* olejku z owoców było znacząco słabsze niż olejku z ziela, podczas gdy wobec *E. cloacae* i *S. marcescens* działanie to było silniejsze (29).

Działanie wzmacniające tkankę kostną

Zbadano wpływ całkowitej frakcji saponinowej z *Dipsaci radix* na metabolizm kostny u samic szczurów linii Sprague-Dawley po owariotomii. Eksperyment prowadzono przez cztery miesiące. Terapię rozpoczęto tydzień po zabiegu usunięcia jajników. Zwierzętom podawano doustnie etanolowy ekstrakt z surowca w dawce 50, 100 lub 200 mg/kg/dzień. Jako kontrolę pozytywną stosowano 17-β-etynyloestradiol, o udowodnionym korzystnym wpływie zmniejszającym ubytek masy kostnej. Przy pomocy absorpcjometrii rentgenowskiej, markerów biochemicznych i testu trójpunktowego zginania, określano stan kości udowych zwierząt. Frakcja saponin stosowana w dawce 100 mg oraz 200 mg/kg/dzień zapobiegała spadkowi gęstości mineralnej kości, podobnie jak estrogen, a także zmniejszała wydalanie fosforu oraz wapnia z moczem. Leczenie wzmocniło również wytrzymałość biomechaniczną kości, jednocześnie zapobiegając pogorszeniu mikroarchitektury gąbczastej. Wyniki te wskazują na zwiększoną aktywność osteoblastów i zmniejszenie aktywności osteoklastów (30).

W kolejnym doświadczeniu analizowano efekt terapeutyczny wyciągów wodnych z *Dipsaci radix* i *Pyrola herba* (w stężeniu 1 mg/ml) na metabolizm kostny u szczurów z usuniętymi jajnikami. Przez 12 tyg podawano samicom szczurów linii Wistar ekstrakty wodne z wyżej wymienionych surowców w ilości 5,6 ml na kg m.c./dzień. Grupę pozytywną traktowano dietylostilbesterolem (estrogen) w dawce 0,008 mg/ml wody destylowanej. Po zakończeniu badania

oszacowano obrót masy kostnej szczurów za pomocą histomorfometrii, natomiast ekspresję białka i mRNA osteoblastów oraz komórek zrębowych szpiku poddano analizie metodą immunohistochemiczną. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy zauważyli, że wyciągi z *Dipsacus radix* i *Pyrola herba* zwiększyły objętość kości gąbczastych (odpowiednio 12,43% i 18,58%) oraz zmniejszyły powierzchnię resorpcji beleczek kości (odpowiednio 5,71% i 4,63%). Badacze tłumaczą to zjawisko zwiększoną stymulacją komórek kościotwórczych (osteoblastów) oraz zmniejszoną ekspresją mRNA i białek komórek kościogubnych (osteoklastów) (31).

Podsumowanie

Gatunki roślin z rodziny *Dipsacaceae* od dawna wykorzystywano w medycynie ludowej w leczeniu chorób metabolicznych, zakażeń bakteryjnych i wirusowych układu oddechowego, skóry, a także w bólach reumatycznych i bólach zębów. Wyniki przeprowadzonych badań naukowych potwierdzają ich potencjał leczniczy, wskazując na działanie przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, kardioochronne, przeciwnowotworowe i wzmacniające tkankę kostną. Do tej pory największą liczbę badań przeprowadzono dla gatunku *Dipsacus asperoides*, który jest stosowany w celu wzmocnienia kości, w medycynie konwencjonalnej Dalekiego Wschodu.

Piśmiennictwo

1. <http://crescentbloom.com>. 2. Broda B, Mowszowicz J. Systematyka roślin leczniczych. Wyd II poprawione. PZWL, Warszawa 1972. 3. Broda B, Mowszowicz J. Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych. Wyd V. PZWL, Warszawa 1966. 4. Madaus G. Lehrbuch der Biologischen Heilmitteln. Georg Thieme Verlag, Leipzig 1938. 5. Czekański M. Papież Jan XXI. Kompendium medycyny naturalnej: Wyd M, Kraków 2004. 6. Henel A: Czarcie rośliny – czarcikęs i czarcikęsik. Czas Biebrzański Parku Narod 2008; 25:7. 7. Jura C (red). Encyklopedia biologiczna, t II. Opres, Kraków 1998. 8. Mowszowicz J. Zarys systematyki roślin. PWN, Warszawa 1986. 9. Mowszowicz J. Flora jesienna. WSiP, Warszawa 1986. 10. www.atlas-roslin.pl 11. Kowalczyk A, Rządowska-Bodalska H. Nauka i praktyka farmaceutyczna w ochronie zdrowia. Mat Zjazdowe.: Pol Tow Farm, Warszawa 1995: 110. 12. Kowalczyk A, Krzyżanowska J. Preliminary anti-

fungal activity of some *Dipsacaceae* family plants. Herba Pol 1999; 2:101-7. 13. Zhao YM, Shi YP. Phytochemical and biological activities of *Dipsacus* Species. Chem Biodiv 2011; 8:414-30. 14. De J, Yue W, Bin Z i wsp. Triterpene saponins from the roots of *Dipsacus asper* and their protective effects against the $A\beta_{25-35}$ induced cytotoxicity in PC12 cells. Fitoter 2012; 83:834-48. 15. Song JS, Lim KM, Kang S i wsp. Procoagulant and prothrombotic effects of herbal medicine, *Dipsacus asper* and its active ingredient, dip-sacus saponin C, on human platelets. J Thromb Haemost 2012; 10:895-906. 16. Modzelewska M. Antyoksydacyjne właściwości roślin. Aptekarz Pol 2009; (38):16. 17. Boratyńska M, Kamińska D, Mazanowska O. Patofizjologia uszkodzenia niedokrwiennoreperfuzyjnego w przeszczepieniu nerek. Post Hig Med Dośw 2004; 58:1-8. 18. Cong G, Cui L, Zang M i wsp. Attention of renal ischemia/reperfusion injury by a polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides*. Inter J Biol Macromolec 2013; 56:14-9. 19. Jung HW, Jung JK, Syn KH i wsp. Inhibitory effects of the root extract of *Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et al T.M.Ai on collagen-induced arthritis in mice. J Ethnopharmacol 2012; 139(1):98-103. 20. Zhang L, Hu JJ, Lin JW i wsp. Anti-inflammatory and analgesic effects of ethanol and aqueous extracts of *Pteroccephalus hookeri* (C.B. Clarke) Höeck. Ethnopharmacol 2009; 123(3). 21. Zając M, Pawełczyk E, Jelińska A. Chemia leków. Wyd AM, Poznań 2006. 22. Zhou YQ, Yang ZL, Xu L i wsp. Akebia saponin D, a saponin component from *Dipsacus asper* Wall., protects PC 12 cells against amyloid-beta induced cytotoxicity. Cell Biol Inter 2009; 33:1102-10. 23. Jiang WL, Zhang SP, Zhu HB i wsp. Cardioprotection of asperosaponin X on experimental myocardial ischemia injury. Intern J Cardiol 2012; 155(3). 24. Li C, Liu Z, Tian J i wsp. Protective roles of asperosaponin VI, a triterpene saponin isolated from *Dipsacus asper* Wall. on acute myocardial infarction in rats. Eur J Pharmacol 2010; 235-41. 25. Radziwon P, Kłoczko J, Kiss B.: Współczesna teoria aktywności i kontroli krzepnięcia krwi. Przew Lek 2004; 11:50-6. 26. Chen J, Yao D, Yuan H i wsp. *Dipsacus asperoides* polysaccharide induces apoptosis in osteosarcoma cells by modulating the PI3K/Akt pathway. Carbohydr Polym 2013; 95(2). 27. Tabatadze N, Elias R, Faure R i wsp. Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Cephalaria gigantea*. Chem Pharm Bull 2007; 55(1):102-5. 28. Liebold T, Straunbinger RK, Rauwald HW. Growth inhibiting activity of lipophilic extracts from *Dipsacus silvestris* Huds. roots against *Borrelia burgdorferi* s. in vitro. Pharmazie 2011; 66(8):628-30. 29. Besbes M, Omri A, Cheraif I i wsp. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Scabiosa arenaria* Forssk. growing wild in Tunisia. Chem Biodiv 2012; 9:829-39. 30. Niu YB, Li YH, Kong XH i wsp. The beneficial effect of *Radix Dipsaci* total saponins on bone metabolism in vitro and in vivo and the possible mechanisms of action. Osteopor Inter 2012. 31. Liu M, Xiao GG, Rong P i wsp. Therapeutic effects of radix *Dipsaci*, *Pyrola* herb, and *Cynomorium songaricum* on bone metabolism of ovariectomized rats. BMC Complement Alternat Med 2012; 12:67.

otrzymano/received: 03.09.2014
zaakceptowano/accepted: 18.09.2014

Adres/address:
*dr Ewa Witkowska-Banaszczak
Katedra i Zakład Farmakognozji
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań
tel.: +48 (61) 854-67-08, fax: +48 (61) 854-67-01
e-mail: banaszcz@ump.edu.pl