

Nigella sativa źródłem związków bioaktywnych

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. farm. Renata J. Ochocka

NIGELLA SATIVA SOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS

SUMMARY

Nigella sativa L. (family Ranunculaceae) is an annual, flowering and herbaceous plant native to South-West Asia, cultivated and naturalized in North Africa and in Europe. The seeds of *Nigella sativa*, commonly known as black cumin or black seed, are widely used in cuisine by diverse cultures. Moreover in herbal (folk) medicine seeds are believed to have stimulatory, carminative, choleric, cholagogue, diuretic and diaphoretic properties. Furthermore, seeds are meant to be the treatment and prevention of numerous diseases such as dyslipidaemia, asthma or eczema. *Nigella sativa* seeds contain both fixed and volatile oils, alkaloids, proteins and saponins. The major component of the essential oil, thymoquinone, states for much of the biological activity of this plant.

Pharmacological investigations reveal a wide spectrum of biological activities including mainly antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antiparasitic, anticarcinogenic and antidiabetic actions. The beneficial effects of the seeds, which possess a very low degree of toxicity, might be associated with their antioxidant and cytoprotective actions and with their impact on some mediators of inflammation. Still, many issues concerning especially the mechanisms of those activities remain unsolved.

KEYWORDS: NIGELLA SATIVA – SYSTEMATIC – CHEMICAL CONTENTS – BIOLOGICAL ACTIVITY

Wstęp

Występowanie, znaczenie i zastosowanie

Nigella sativa, czarnuszka siewna, gatunek rośliny z rodziny Ranunculaceae, pochodzi z południowej Europy i z Azji Zachodniej. W Polsce jest uprawiana i czasami miejscowo dziczejąca, spotykana na siedliskach ruderalnych, wśród zbóż (1).

Czarnuszka siewna znana i ceniona była już w starożytnej Asyrii, w Biblii występuje jako „leczniczy czarny kminek”. Jej właściwości lecznicze wykorzystywał także Hipokrates, a po raz pierwszy opisał grecki lekarz Dioskurides (2). W ówczesnej medycynie nasiona czarnuszki stanowiły środek do leczenia nieżytu żołądka i jelit. W dawnej Polsce biedna ludność stosowała je jako przyprawę zastępującą drogą przyprawę ze wschodu.

Obecnie jest popularnym dodatkiem kulinarnym w Bułgarii i na Dalekim Wschodzie. Czarne nasiona – same lub w połączeniu z miodem – używane są jako dodatek do posypywania chleba, do aromatyzowania wina, do przetworów warzywnych, a także na małą skalę do produkcji olejku eterycznego wykorzystywanego w cukiernictwie. Zmielone nasiona czarnuszki są dobrą alternatywą pieprzu dla osób z problemami gastrycznymi, gdyż nie podrażniają błony śluzowej żołądka.

Jako roślina ozdobna, uprawiana jest na ogrodowych rabatach oraz stosowana w postaci ciętych kwiatów do bukietów. Dekoracyjne są także jej owoce. Olejek czarnuszki wykorzystywany jest przez przemysł drogowy, do produkcji perfum.

Jako roślina lecznicza, czarnuszka znana jest z wielokierunkowego działania. W medycynie tradycyjnej wykorzystuje się jej właściwości w Indiach (3), Europie (4) oraz w krajach arabskich (5), gdzie ma status panaceum, lekarstwa na wszystkie choroby poza starzeniem się i uchronieniem od śmierci.

Surowcem leczniczym jest nasienie i olej z czarnuszki – *Semen et Oleum Nigellae sativae*. Surowiec wykazuje działanie hipoglikemiczne, przeciwbólowe, przeciwzapalne – także w reumatyzmie, silne działanie antybiotyczne, przeciwbacze, żółciotwórcze i żółciopędne, moczopędne, wiatropędne, a także poprawiające trawienie. Zewnętrznie napary używane są w trądziku i atopowym zapaleniu skóry (6).

Wiele właściwości leczniczych czarnuszki wywodzących się z medycyny ludowej zostało zbadanych i potwierdzonych naukowo. Doniesienia piśmiennictwa dotyczą głównie jej działania przeciwutleniającego, przeciwnowotworowego, przeciwbakteryjnego, przeciwzapalnego oraz przeciwcukrzycowego.

Systematyka

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| Domena: | <i>Eukaryota</i> (Jądrowe) |
| Królestwo: | <i>Plantae</i> (Rośliny) |
| Podkrólestwo: | <i>Tracheobionta</i> (Naczyniowe) |
| Nadgromada: | <i>Spermatophyta</i> (Nasienne) |
| Gromada: | <i>Magnoliophyta</i> (Okrytonasienne) |
| Klasa: | <i>Magnoliopsida</i> (Dwuliścienne) |

Podklasa: *Magnoliidae* (Magnoliowe)
Rząd: *Ranunculales* (Jaskrowce)
Rodzina: *Ranunculaceae* (Jaskrowate)
Rodzaj: *Nigella* (Czarnuszka)
Gatunek: *Nigella sativa* (Czarnuszka siewna)

Rząd Jaskrowce jest blisko spokrewniony z rzędem Magnoliowców, z którym jeszcze do niedawna był łączony w jeden rząd Wielooowców (*Polycarpiaceae*) – jak podaje np. Mowszowicz w „Pospolitych roślinach naczyniowych Polski” (7). Bez wątplenia wywodzi się on z Magnoliowców na skutek ich przekształcania się w rośliny głównie zielne, zawsze wytwarzające naczynia (8). Magnoliowce skupiają rośliny drzewiaste występujące w tropikach i subtropikach. Jaskrowce natomiast, jako wyżej wyspecjalizowane, zdolne są do zasiedlenia różnorodnych terenów – stanowiska o klimacie chłodnym i umiarkowanym, wysokie siedliska w górach, jak i siedliska wodne. W związku z tym charakteryzują się one wysoką i różnorodną specjalizacją sposobów zapylania. Obserwowane jest częste przystosowanie do konkretnych gatunków owadów zapylających (9).

Najlicniejszą rodziną, reprezentowaną przez około 2000 gatunków, są Jaskrowate (*Ranunculaceae*). Stanowią one istotny element krajowej flory. Ich charakterystyczną cechą jest przekształcanie się niektórych pręcików w twory o różnych kształtach wydzielających nektar, zwanych miodnikami, obecne np. w czarnuszce damasceńskiej (*Nigella damascena*). Wiele jaskrowatych wykazuje właściwości silnie trujące (np. tojad mocny, *Aconitum firmum*) oraz lecznicze (miłek wiosenny, *Adonis vernalis*) ze względu na obecność alkaloidów i glikozydów. W naszej florzce omawiana rodzina liczy 70 gatunków, wśród których wyróżnić można 23 rodzaje.

Flora Europaea w rodzaju *Nigella* podaje 12 gatunków wraz z przypisanymi podgatunkami (10):

1. *Nigella arvensis*:
 - *N. arvensis* subsp. *arvensis*,
 - *N. arvensis* subsp. *aristata*,
 - *N. arvensis* subsp. *rechingeri*.
2. *Nigella hispanica*:
 - *N. hispanica* subsp. *hispanica*,
 - *N. hispanica* subsp. *atlantica*.
3. *Nigella galica*.
4. *Nigella segetalis*.
5. *Nigella degenii*.
6. *Nigella cretica*.
7. *Nigella fumariifolia*.
8. *Nigella doerfleri*.
9. *Nigella sativa*.
10. *Nigella elata*.

11. *Nigella damascena*.

12. *Nigella orientalis*.

Morfologia

Łodyga czarnuszki jest wzniesiona i rozgałęziona, osiąga od 10 do 40 cm wysokości. Liście są podwójnie pierzastosieczne o równowąskich odcinkach. Kwiaty dość duże, o średnicy około 3 cm, wyrastają pojedynczo na szczycie pędów. Działki kielicha są koloru białego lub bladobłękitnego z błękitnym unerwieniem i o seledynowych szczytach. Płatki korony są szeroko-jajowate, zwężone w krótki paznokiec i zakończone dzióbkiem. Między nimi znajdują się pręciki oraz pięć słupków w środku, które następnie zrastają się w wielomieszek przypominający torebkę (1). Tak powstały owoc zawiera w środku czarne, trójgraniaste nasiona o silnym, korzennym, muszkatolowym zapachu i smaku gorzkiej kawy. Czarnuszka siewna jest rośliną jednoroczną, kwitnie od maja do września. Zbioru nasion dokonuje się we wrześniu. Ogólny widok omawianej rośliny przedstawiony został na rycinie 1.

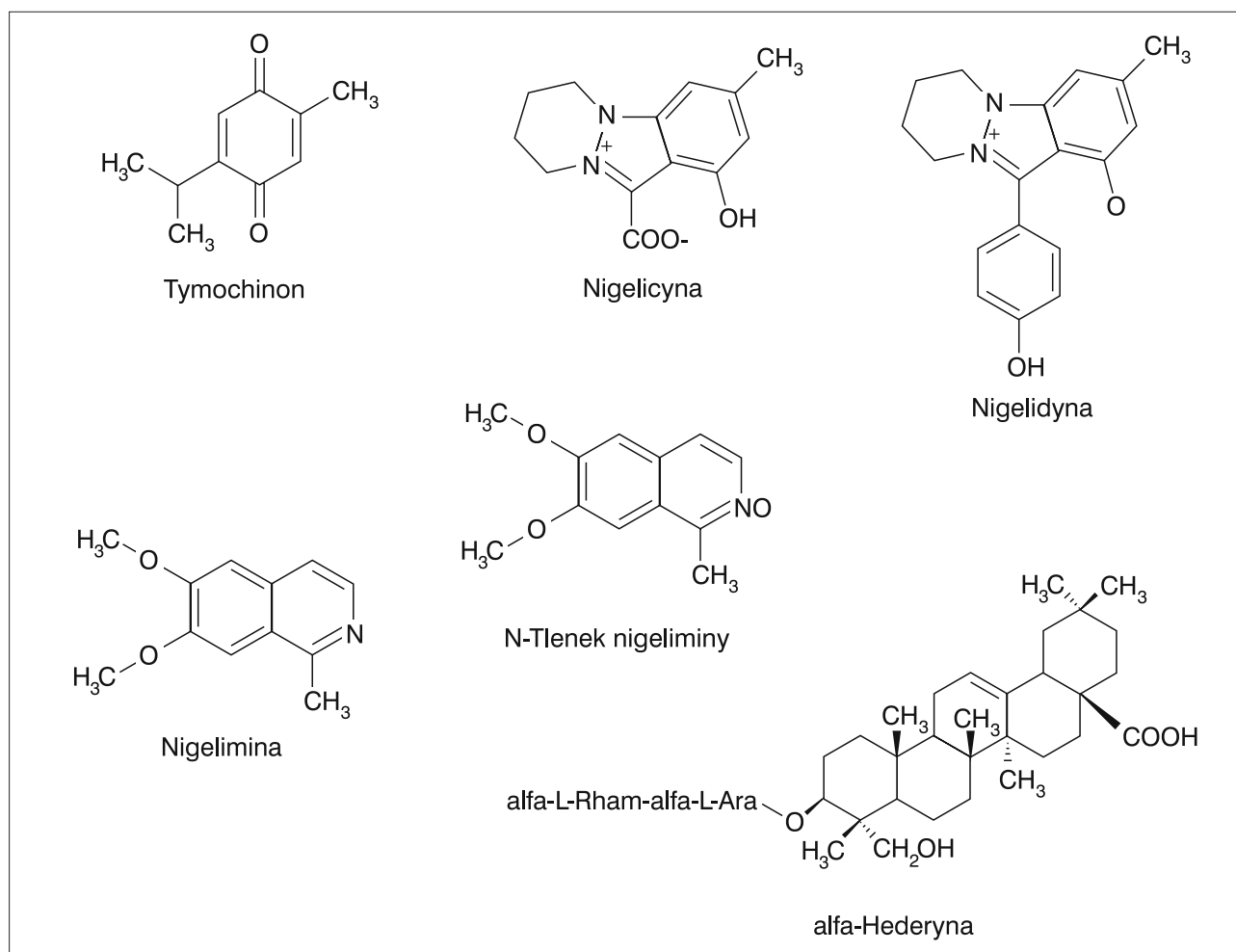
Skład chemiczny

Nasiona czarnuszki siewnej zawierają w swoim składzie: 36-38% oleju, białko, alkaloidy, saponiny oraz 0,4-2,5% olejku eterycznego (11-14).

W skład oleju wchodzi głównie nienasycone kwasy tłuszczowe, w tym przede wszystkim kwas linolenowy, arachidonowy oraz kwas eikozadienowy (15). Olejek eteryczny był analizowany metodą chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią mas (GC-MS) (16). Wykryto wiele składników, z których najważniejszym jest tymochinon (27,8-57,0%) (ryc. 2). Poza tym występuje w nim w większych ilościach:



Ryc. 1. Czarnuszka siewna (*Nigella sativa*) (fot. Anna Adamska)



Ryc. 2. Wzory chemiczne najważniejszych związków wchodzących w skład nasion czarnuszki siewnej

p-cymen (7,1-15,5%), karwakrol (5,8-11,6%), t-anetol (0,25-2,3%), 4-terpineol (2,0-6,6%) oraz longifolen (1,0-8,0%). Tymochinon łatwo ulega dimeryzacji do ditymochinonu (17).

Spośród alkaloidów wyróżniono cztery, z których dwa – nigelicyna (18) i nigelidyna (19) – zawierają w swej strukturze pierścień indazolowy, podczas gdy nigelimina (20) i jej N-tlenek (21) są pochodnymi izochinolinyl (ryc. 2). Rozpoznana triterpenowa saponina to monodesmzyd – alfa-hederyna (ryc. 2) (22), obecna także w liściach bluszczu *Hedera helix*.

Aktywność biologiczna

Aktywność antyoksydacyjna

Dowiedziano, że zarówno oleje pochodzące z nasion czarnuszki, jak i tymochinon (główny składnik olejku eterycznego czarnuszki) wykazują aktywność antyoksydacyjną. Wymienione związki hamują cyklooksygenazę i 5-lipooksygenazę w kaskadzie szlaku kwasu arachidonowego. Doświadczenie przeprowadzono na

leukocytach pochodzących z otrzewnej szczurów stymulowanych jonoforem wapniowym. Zaobserwowano spadek leukotrienu B4 i tromboksanu B2 (15). Ten sam zespół badawczy zaobserwował także hamowanie nieenzymatycznej peroksydacji tłuszczów w liposomach mózgu szczura dla wspomnianych związków, przy czym tymochinon wykazywał 10 razy mocniejszą inhibicję w porównaniu z olejem. Aktywność antyoksydacyjna badanego oleju była silniejsza niż oczekiwana. Tłumaczy się ten fakt prawdopodobnie obecnością nienasyconych kwasów tłuszczowych we frakcji olejowej.

Właściwości antyoksydacyjne zostały również potwierdzone przez egipskich naukowców (23). Zaobserwowano zdolność przeciwutleniającą wyciągu roślinnego za pomocą redukcji wolnych rodników takich jak DPPH (silniejszą dla nasion czarnuszki niż dla witaminy C) oraz tlenku azotu. Potwierdzono także aktywność przeciwko nieenzymatycznej peroksydacji tłuszczów w mikrosomach szczurzej wątroby, do której dochodzi po dodaniu chlorku żelaza(III) i kwasu askorbowego do materiału biologicznego.

Przy użyciu chromatografii cienkowsarstwowej oraz związku DPPH wykazano, że związki wyizolowane z nasion czarnuszki (takie jak tymochinon, karwakrol, t-anetol i 4-terpineol) wykazują cenne działanie przeciwutleniające (24) o charakterze synergistycznym, stąd istotne jest, aby stosować cały olejek eteryczny w badaniach naukowych.

Jako przyczynę wielu chorób podaje się powstawanie wolnych rodników w organizmie. Być może dlatego nasiona czarnuszki siewnej są tak powszechnie stosowane w medycynie ludowej od wielu lat. Wytłumaczalne wydaje się także stosowanie w medycynie tradycyjnej oleju z czarnuszki w chorobach reumatycznych oraz innych chorobach o charakterze zapalnym.

Właściwości przeciwutleniające nasion czarnuszki prawdopodobnie uzasadniają ochronę wątroby przed działaniem hepatotoksycznym tetrachloru węgla (25), przed zwłóknieniem oraz przed marskością tego narządu (26).

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Działanie przeciwbakteryjne

Właściwości przeciwbakteryjne, zarówno ekstraktów, jak i olejku eterycznego z nasion czarnuszki zostały wielokrotnie potwierdzone przez zespoły badawcze pochodzące z różnych części świata, m.in. z Europy, Egiptu i Turcji.

Istnieją doniesienia z 1979 roku na temat szerokiego spektrum działania przeciwbakteryjnego *in vitro* olejku eterycznego czarnuszki siewnej, przeciwko *Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* i *Vibrio cholera* (27). W 1998 roku zaobserwowano, że najsilniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową tego olejku obserwuje się w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* (28). W roku 2000 wykazano, że wodne ekstrakty z nasion oraz surowe ekstrakty alkaloidowe były aktywne wobec drobnoustrojów wyizolowanych od pacjentów cierpiących na septyczne zapalenie stawów, opornych na działanie antybiotyków. Zauważono wówczas, że bakterie Gram-ujemne były bardziej wrażliwe niż Gram-dodatnie, jak również to, że mniej stężone ekstrakty wykazywały silniejszy efekt przeciwbakteryjny, co tłumaczy się prawdopodobnie właściwościami fizykochemicznymi (jak rozpuszczalność, dyfuzja) (29).

W Turcji przeprowadzono badanie z wykorzystaniem pięciu szczepów bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus* sp. oraz *Micrococcus luteus*. Aktywność określona była metodą dyfuzji na podłożu agarowym, w której mierzono strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów. Zastosowano dwa różne ekstrakty z nasion czarnuszki

– eterowy i etanolowy. Aktywność wykazał tylko ekstrakt eterowy w stosunku do bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* oraz *Micrococcus luteus* (30).

Działanie przeciwwirusowe

Znane są próby stosowania nasion czarnuszki siewnej jako środka przeciwwirusowego. Badania naukowe w tym kierunku dokonane zostały m.in. w Egipcie w 2008 roku (23). Eksperyment potwierdzający tezę przeciwwirusowego działania ekstraktów roślinnych przeprowadzono metodą CPE (ang. *Cytopathic Effect Method*) odnoszącą się do obserwowania destrukcyjnych zmian w komórkach (głównie w hodowlach komórkowych) związanych z rozmnażaniem się wirusa. Wykorzystano komórki zarodków kurcząt (CER) zakażonych wirusem *Laryngotracheitis* (ILTV, wirus zapalenia krtani i tchawicy). W doświadczeniu użyto nasion czarnuszki siewnej (*Nigella sativa*) oraz liści zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) o maksymalnych stężeniach, niewykazujących jeszcze działania cytotoksycznego, a także ich rozcieńczenia (równoległe prowadzone były kontrole komórek i wirusa). Po trzech dniach od zakażenia komórek wyznaczone zostały wartości IC_{50} tych ekstraktów, tj. stężenia próbek niezbędne do zahamowania wzrostu wirusa w 50%.

Aktywność przeciwwirusową wykazały ekstrakty, zarówno z nasion czarnuszki, jak i z liści zielonej herbaty, z IC_{50} odpowiednio 35,0 i 4,22 μ M (23).

W innych badaniach prowadzonych w Egipcie (31) podawano dootrzewnowo olejek z nasion czarnuszki myszom zakażonym cytomegalowirusem (CMV). Obserwowano rozwój wirusa oraz wzrost poziomu makrofagów, komórek NK i interferonu IFN- γ w surowicy. Po 3. dniu od zakażenia miano wirusa mierzone w wątrobie i w śledzionie znacznie spadło, przy jednoczesnym wzroście IFN- γ , makrofagów i komórek T CD4⁺. W 10. dniu zakażenia poziom wirusa stał się niewykrywalny, w przeciwieństwie do myszy kontrolnych. Badania te dowiodły jednoznacznej aktywności olejku z nasion czarnuszki siewnej wobec wirusa CMV, która prawdopodobnie związana jest ze wzrostem wrodzonej odporności oraz wzmocnieniem funkcji makrofagów i wytwarzaniem interferonu IFN- γ (31).

Działanie przeciwpasożytnicze

W 1979 roku dowiedziono, że nasiona czarnuszki siewnej wykazują także aktywność przeciwpasożytniczą porównywalną do piperazyny (27).

Zespół Mahmoud i wsp. (32) wykazał, że olejek z nasion czarnuszki (2,5 i 5,0 ml/kg) podawany doustnie przez dwa tygodnie skutecznie zmniejszał liczbę *Schistosoma mansoni* w wątrobie oraz ogólną liczbę jaj tego pasożyta złożonych w wątrobie i w jelicie, przy

jednoczesnym wroście martwych jaj w ścianie jelita. Ponadto zaobserwowano, że jednoczesne podawanie olejku z czarnuszki wraz z preparatem przeciw pasożytniczym – prazikwantelem, powoduje wzrost martwych jaj pasożytów w porównaniu z efektem działania samego leku.

Aktywność cytotoksyczna

Aktywność przeciwnowotworowa nasion czarnuszki budziła zainteresowanie wielu ośrodków badawczych już w poprzednim stuleciu. Na przestrzeni lat badaną roślinę poddawano analizie w różnej postaci – całe nasiona podawano doustnie testowanym myszom, uzyskane z tej rośliny ekstrakty, m.in. wodne i alkoholowe, a także poszczególne wyizolowane związki testowano *in vitro* oraz *in vivo*.

Dwa zespoły badawcze (34, 35) przeprowadziły badania *in vitro* nad etanolem ekstraktem z nasion czarnuszki, który poddany został podziałowi między następujące rozpuszczalniki: woda, n-heksan, n-butanol i octan etylu, z czego aktywność cytotoksyczną zaobserwowano w przypadku frakcji octanu etylu (EAF). Frakcję tę następnie poddano oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej i oznaczono jako CC-5. Badanie przeprowadzono z użyciem linii kontrolnej (komórki śródbłonna) oraz nowotworowych – dwóch linii komórek białaczki: P388 (mysiej białaczki limfatycznej) i Molt4 (ludzkiej komórki białaczki), a także pięciu linii pochodzących z guzów litych: Wehi 164 (włókniako-mięsaka, komórki mysie), Hep G2 (raka wątroby, komórki ludzkie), SW-620 (gruczolakoraka jelita grubego, przerzuty węzłów chłonnych, komórki ludzkie), J82 (raka pęcherza, komórki ludzkie) oraz LL/2 (mysiego raka płuc).

Do oceny cytotoksyczności posłużono się testem MTT. Frakcja EAF wykazała istotne zahamowanie wzrostu wszystkich komórek pochodzenia nowotworowego z wartościami ED₅₀ przedstawionymi w tabeli 1. Natomiast frakcja CC-5 wykazała silne właściwości cytotoksyczne ujęte w tabeli 2.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że stężenie 50 µg/ml nie hamowało wzrostu zdrowych ludzkich komórek śródbłonna, co pozwala na przypuszczenie, że frakcja czarnuszki nie wchodzi w interakcję ze zdrowymi komórkami organizmu.

Tab. 1. Wartości ED₅₀ frakcji octanu etylu (EAF), otrzymanej z etanolem ekstraktem z nasion czarnuszki siewnej, w odniesieniu do wybranych linii komórkowych

| Linie komórkowe | Molt4 | P388 | J82 | Wehi 164 | LL/2 | SW-620 | Hep G2 |
|-----------------------------------|-------|------|-----|----------|------|--------|--------|
| Wartości ED ₅₀ (µg/ml) | 12 | 17 | 22 | 14 | 16 | 18 | 11 |

Frakcja CC-5 wykazała także wyjątkowe właściwości immunoregulujące. Doświadczenie przeprowadzono w obecności miogenów ConA i LPS, selektywnie wpływających na limfocyty T i B (33). W obecności optymalnej dawki ConA (3 µg/ml) zarówno frakcja CC-5, jak i frakcja wodna wzmocniły aktywność proliferacyjną limfocytów T, określoną za pomocą testu MTT (34-36). Obecność mutagenu LPS nie spowodowała istotnej zmiany właściwości immunologicznych. Nie zaobserwowano także właściwości immunosupresyjnych pod wpływem ekstraktów z nasion czarnuszki (37).

Ten sam zespół badawczy (35) wykonał doświadczenia *in vivo* na myszach, wykorzystując frakcję CC-5 ekstraktu etanolowego. Do doświadczenia wykorzystano dwie linie komórek nowotworowych: białaczki P388 oraz raka płuc LL/2. Testy, w których oceniano: wzrost guza, przedłużenie czasu życia myszy oraz wzrost masy ciała zwierząt, przeprowadzono w czterech badaniach: (A) traktowanie komórek zaczęto 24 godz. po wszczepieniu nowotworu; (B) doświadczenie rozpoczęto 10 dni po wszczepieniu nowotworu; (C i D) zwierzętom podawano frakcję czarnuszki na 7 i 21 dni przed wszczepieniem guza. Pomiarzy rozrostu guza przeprowadzono także po podaniu alfa-hederyny (saponiny triterpenowej) wyizolowanej z frakcji CC-5.

W badaniu A stwierdzono, że frakcja CC-5 w stężeniu 200 i 400 mg/kg m.c. przedłuża życie doświadczalnym myszom o 153%, w porównaniu do 5-fluorouracylu (5-FU), który czas życia wydłużał do 184%, przy czym największy przyrost masy ciała obserwowano dla CC-5 w dawce 200 mg/kg. Badania B nie przyniosły znaczących rezultatów, zaś badania C i D wykazały zależne od dawki zahamowanie wzrostu guza, co świadczy o zahamowaniu rozwoju nowotworu. Poza tym badania nad alfa-hederyną wykazały hamowanie rozwoju guza w dawce 10 mg/kg m.c., niższej od czynnika alkilującego CP.

Tab. 2. Wartości IC₅₀ oczyszczonej frakcji octanu etylu (CC-5), otrzymanej z etanolem ekstraktem z nasion czarnuszki siewnej, w odniesieniu do wybranych linii komórkowych

| Linie komórkowe | Hep G2 | Molt4 | LL/2 |
|-----------------------------------|--------|-------|------|
| Wartości IC ₅₀ (µg/ml) | 8 | 10 | 11 |

Wcześniejsze doniesienia na temat alfa-hederyny wyizolowanej z *Hedera helix* (38) wskazywały na apoptozę jako główny mechanizm jej działania (39).

Badania aktywności cytotoksycznej ekstraktu z nasion czarnuszki zostały przeprowadzone także przez hinduski zespół badawczy (40). W tym celu użyto metanolowego ekstraktu otrzymanego metodą maceracji na zimno. Doświadczenia obejmowały ocenę zahamowania proliferacji komórek za pomocą testu MTT. Użyto dwóch linii komórek nowotworowych: U-937 (ludzka linia komórek chłoniaka szpiku) oraz HL-60 (linia komórek białaczki ludzkiej) oraz kontrolnej HEK-293T (ludzkie krwinki czerwone wyizolowane z nerki). Wyniki prezentuje tabela 3.

Najsilniejszy efekt cytotoksyczny dla metanolowego ekstraktu nasion czarnuszki zaobserwowano dla linii HL-60, silniejszy niż dla związku kontrolnego – cyklofosfamidu. Jednocześnie ekstrakt okazał się mało toksyczny dla zdrowych komórek ludzkich HEK-293T (40).

Badania metanolowego ekstraktu przeprowadził już wcześniej Salomi i wsp. (41), którzy wykazali silne właściwości cytotoksyczne w stosunku do nowotworu Ehrlicha, chłoniaka i mięsaków, przy jednoczesnym minimalnym efekcie toksycznym względem zdrowych limfocytów. Ten sam autor potwierdził właściwości cytotoksyczne ekstraktu z nasion czarnuszki badaniami *in vivo*. Zauważył zahamowanie wzrostu nowotworu Ehrlicha u myszy otrzymujących 2 mg ekstraktu/mysz/dzień przez 10 dni (42).

Interesującego zestawienia dokonano w National Research Centre w Egipcie na temat działania przeciwwirusowego, przeciwnowotworowego i przeciwutleniającego nasion czarnuszki siewnej (*Nigella sativa*) i liści zielonej herbaty (*Camelia sinensis*) (23). W przypadku aktywności przeciwnowotworowej w badaniach *in vivo* ocenie poddano 6 grup szczurów. Części z nich (grupom 1, 2 i 3) wszczepiono czynnik inicjujący raka wątroby – DEN (dietylonitrozaminę w dawce 200 mg/kg mc.) (43). Następnie przez trzy miesiące karmiono szczury otrzymujące DEN (grupa 2) i nieotrzymujące DEN (grupa 4) zmiażdżonymi nasionami czarnuszki oraz zmielonymi liśćmi zielonej

herbaty (grupy 3 i 5). Grupa 6 stanowiła kontrolę negatywną. Po zakończonym eksperymencie wątroby szczurów zostały poddane ocenie histologicznej według procedury Alan i Ian (44). Stwierdzono, że grupa 1 zawierała szczurze wątroby powiększone, przeośnięte, z licznymi zrostami oraz gruczolakami wątrobowymi, a także powiększonymi i zdegenerowanymi komórkami. Wątroby pozostałych grup nie wykazały żadnych zmian patologicznych (23).

Również badania *in vitro* tego zespołu, oceniające aktywność przeciwnowotworową za pomocą odczynnika trypan blue (45) wykazały, że wodny ekstrakt otrzymany przez gotowanie zmielonych nasion, a następnie ich liofilizację, hamuje proliferację i żywotność komórek HeLa (raka szyjki macicy) i Vero (linii komórkowej z tkanki nabłonkowej z nerki afrykańskiego koczokodana zielonego).

Zespół dokonał także badań aktywności antyangiogennej, posługując się hodowlą tkankową złożoną z tkanek aorty szczurów, którą traktowano m.in. ekstraktem z nasion czarnuszki. W porównaniu do tkanek nietraktowanych zauważono wyraźny spadek namnażania komórek śródbłonna. Autorzy przypuszczają, że badany ekstrakt pochodzenia naturalnego wykazuje zdolność zmniejszania stanu zapalnego oraz zmniejszania przepuszczalności naczyń, hamowania wytwarzania szkodliwych eikozanoidów lub innych czynników angiogennych (46).

Badania właściwości cytotoksycznych skupione zostały także wokół głównego składnika olejku eterycznego nasion czarnuszki, a mianowicie tymochinonu. Istnieją liczne prace dotyczące wpływu tego składnika na wiele nowotworowych linii komórkowych (47-50).

Doniesienie z 2011 roku pochodzące z Malezji (51) dowodzi działania przeciwnowotworowego tymochinonu na komórki SiHa (płaskonabłonkowy rak szyjki macicy). Analiza z wykorzystaniem zarówno testu MTT, jak i trypanu blue dostarczyła wyników IC_{50} o wartościach 10,7 i 9,3 $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio dla wymienionych metod, po 72-godzinnej inkubacji. Efekt działania tymochinonu w porównaniu z cisplatyną okazał się silniejszy, a także jednocześnie selektywny wobec komórek nowotworowych (w odniesieniu do kontrolnych linii 3T3-L1 i Vero).

Dokonano także analizy cyklu komórkowego linii SiHa poddanej działaniu tymochinonu, w której stwierdzono nagromadzenie populacji komórek w fazie Sub-G1, co może wskazywać na uszkodzenie struktury DNA, co z kolei ma wpływ na proces apoptozy komórki. Następnie dowiedziono, że szlak apoptozy powstały pod wpływem działania tymochinonu ma związek ze zwiększoną ekspresją białka p-53 oraz

Tab. 3. Wartości IC_{50} metanolowego ekstraktu z nasion czarnuszki siewnej i cyklofosfamidu dla różnych linii komórkowych (wg 40)

| IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | HL-60 | U-397 | HEK-293T |
|---|-------|-------|----------|
| Nasiona czarnuszki, ekstrakt metanolowy | 13,79 | 28,31 | > 100 |
| Cyklofosfamid (μmol) | 41,54 | 11,86 | 27,06 |

obniżeniem stężenia białka przeciwapoptycznego Bcl-2 (przy jednoczesnym braku oddziaływania na białko proapoptyczne Bax) (51).

Powyższe doniesienia wskazują na istotną aktywność cytotoksyczną nasion czarnuszki siewnej, zarówno ekstraktów, jak i poszczególnych wyizolowanych związków, przy jednoczesnej niskiej toksyczności wobec komórek zdrowych. Być może *Nigella sativa* ma charakter surowca o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Zagadnienie to wymaga jednak jeszcze wielu prac badawczych.

Aktywność przeciwcukrzycowa

Aktywność przeciwcukrzycowa *Nigella sativa* także budzi zainteresowanie wielu ośrodków badawczych. Między innymi w roku 1993 zaobserwowano spadek poziomu glukozy we krwi królika zdrowego i chorego na cukrzycę o około 15-23% po dootrzewnowym podaniu olejku eterycznego z nasion czarnuszki (50 mg/kg m.c.) w czasie od 4 do 6 godz. po podaniu (52).

W 1998 roku El-Zawahrawy i Al-Zahraa (53) sugerowali, że ekstrakt czarnuszki odbudowuje strukturalną integralność trzustki u królików z cukrzycą doświadczalną. W Egipcie przeprowadzono także badania na szczurach z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą. W tym celu posłużono się streptozotocyną, substancją o działaniu cytostatycznym, pozyskiwaną ze *Streptomyces griseus* (54, 55), wykazującą szczególne powinowactwo i zdolność uszkodzenia komórek β trzustki, jak również zwiększenia wewnątrzkomórkowej reakcji metylacji (56), degradowania matrycy DNA, wytwarzania tlenku azotu (NO) oraz wolnych rodników nadtlenkowych (57). W doświadczeniu badano wpływ 5% ekstraktu wodnego z nasion czarnuszki, olejku z czarnuszki oraz tymochinonu na poziom glukozy i insuliny we krwi chorych szczurów. Badania prowadzone były na poziomie biochemicznym i histopatologicznym.

W wyniku przewlekłej hiperglikemii dochodzi do wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego oraz spadku zdolności usuwania wolnych rodników (58), co prowadzi do dysfunkcji komórkowej (59). Obserwuje się istotny wzrost poziomu glukozy we krwi oraz spadek poziomu insuliny. Dodatkowo rośnie poziom dialdehydu malonowego (MDA), wraz ze spadkiem aktywności enzymu przeciwutleniającego, a mianowicie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Zaobserwowano, że zarówno olejek z nasion czarnuszki siewnej, jak i sam tymochinon w sposób istotny zmniejszyły podwyższony poziom MDA i glukozy we krwi oraz znacząco zwiększyły poziom insuliny i SOD.

W ocenie histopatologicznej komórek β trzustki podawanie tymochinonu znacznie poprawiło ich stan,

usuując efekty toksyczne wywołane przez streptozotocynę, która powoduje uszkodzenie jądra komórkowego, agregację heterochromatyny (wskazującą na uszkodzenie DNA) oraz wakuolizację i fragmentację mitochondrium. Również wodny ekstrakt, lecz w mniejszym stopniu, odwracał szkodliwe skutki działania streptozotocyny. Natomiast olejek czarnuszki przywracał prawidłowy poziom insuliny, przy czym nie miał wpływu na normalizację poziomu glukozy we krwi.

Doniesienia te sugerują, że zarówno ekstrakt wodny z czarnuszki siewnej, jak i tymochinon wykazują właściwości terapeutyczne i ochronne wobec cukrzycy streptozotocynowej na drodze zmniejszenia poziomu stresu oksydacyjnego, co przyczynia się do ochrony i naprawy komórek β trzustki, prowadząc w efekcie do zmniejszenia poziomu glukozy we krwi. Tak więc efekt przeciwcukrzycowy nie jest w tym przypadku związany bezpośrednio z wpływem na poziom insuliny, lecz prawdopodobnie częściowo dotyczy hamowania procesu glukoneogenezy (60).

Teza ta była uprzednio badana przez zespół Fararha i wsp. (61), według którego tymochinon odpowiedzialny jest za spadek podwyższonego procesu glukoneogenezy na skutek blokady enzymów biorących w niej udział. Badania te, poddające ocenie wspomniane enzymy, czyli glukozo-6-fosfatazę i fruktozo-1,6-bisfosfatazę, potwierdzili także Pari i Sankaranarayanan (62).

Nasiona czarnuszki siewnej oraz tymochinon mogą znaleźć zastosowanie kliniczne w leczeniu cukrzycy, a także jako środek ochraniający komórki β trzustki przed stresem oksydacyjnym.

Toksyczność nasion

Toksyczność nasion jest niska. LD₅₀ oleju z nasion czarnuszki dla myszy wynosi 28,8 ml/kg. Przewlekłe stosowanie oleju u szczurów nie powoduje wzrostu poziomu AspAT i AlAT. Wzrost poziomu tych enzymów powodują wyciągi wodne i etanolowe, nie obserwuje się jednak uszkodzenia hepatocytów (63-65).

Podsumowanie

Nasiona czarnuszki siewnej, obok swoich walorów cenionych w sztuce kulinarnej, wykazują udowodnioną, szeroką aktywność biologiczną. Inspiracją dla prowadzonych badań była często medycyna ludowa, wykorzystująca właściwości „czarnego kminku”. Dowiedzione zostały m.in. właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwcukrzycowe.

Aktualnie w wielu ośrodkach prowadzone są badania składników nasion czarnuszki siewnej w kierunku działania przeciwnowotworowego.

Piśmiennictwo

1. Szafer W, Kulczyński S, Pawłowski B. Rośliny polskie. Część I. PWN, Warszawa 1988: 165.
2. Worthen DR, Ghosh OA, Crooks PA. The *in vitro* anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res* 1998; 18:1527-32.
3. Nadkarni AK. *Indian Materia Medica*. Popular Parkishan, Bombay 1976: 854.
4. Lautenbacher LM. Schwarzkümmelöl. *Dtsch-Apoth Ztg* 1997; 137:68-9.
5. Sayed MD. Traditional medicine in health care. *J Ethnopharmacol* 1980; 2:19-22.
6. Wielgosz T. Wielka księga ziół polskich. Publicat SA, Poznań 2008.
7. Mowszowicz J. *Pospolite rośliny naczyniowe Polski*. Wyd. VII. PWN, Warszawa 1986: 85.
8. Pałczyński A, Podbielkowski Z, Polakowski B. *Botanika*. PWN, Warszawa 1991: 330.
9. Szweykowska A, Szweykowski J. *Botanika – Systematyka*. Tom II. PWN, Warszawa 1993: 369.
10. *Flora Europaea* on CD-ROM, University Press Cambridge 2001.
11. Ansari AA, Hassan S, Kenne L i wsp. Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa*. *Phytochem* 1988; 27(12): 3977-9.
12. Taskin MK, Alankus-Caliskan O, Anil H i wsp. Triterpene saponins from *Nigella sativa* L. *Turk J Chem* 2005; 29:561-9.
13. Ghosh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19:757-62.
14. Riaz M, Syed M, Chaudhary FM. Chemistry of the medicinal plants of the genus *Nigella*. *Hamdard Medicus* 1996; 39:40-5.
15. Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B i wsp. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med* 1995; 61:33-6.
16. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000; 14:323-8.
17. Ali BH, Blunden G. *Pharmacological and Toxicological Properties of Nigella sativa*. *Phytotherapy Research* 2003; 17:299-305.
18. Atta-ur-Rahman, Malik S, Cun-heng H i wsp. Isolation and structure determination of nigellidine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett* 1985; 23:2759-62.
19. Atta-ur-Rahman, Malik S, Hasan SS i wsp. Nigellidine, a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett* 1995; 36:1993-6.
20. Atta-ur-Rahman, Malik S, Zaman K. Nigellimine, a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Nat Prod* 1992; 55:676-8.
21. Atta-ur-Rahman, Malik S, Ahmed S i wsp. Nigellimine-N-oxide – a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Heterocycles* 1985; 23:953-5.
22. Swamy SMK, Tan BKH. Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, α -hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Med* 2001; 67:29-32.
23. Zaher KS, Ahmed WM, Zerizer SN. Observations on the biological effects of black cumin seed (*Nigella sativa*) and green tea (*Camellia sinensis*). *Global Veterinaria* 2008; 2(4):198-204.
24. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* Aug 2000; 14(5):323-8.
25. Nagi MN, Alam K, Badary OA. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47:143-59.
26. Turkdogan MK, Agaglu Z, Yener Z i wsp. The role of antioxidant vitamins (C and E), selenium and *Nigella sativa* in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits: new hops. *Dtsch Tierarzt Wschr* 2000; 108:71-3.
27. Agrawal R, Kharya MD, Shrivastava R. Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol* 1979; 17:1264-5.
28. El-Kamali HH, Ahmed AH, Mohammed AS i wsp. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoter* 1998; 34:77-8.
29. Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol Pol* 2000; 49:63-74.
30. Ozmen A, Basbulbul G, Aydin T. Antimitotic and antibacterial effects of the *Nigella sativa* L. Seed *Caryologia* 2007; 60:270-2.
31. Salem ML, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Inter J Immunopharmacol* 2000; 22:729-40.
32. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effects of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* in mice. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:1-11.
33. Nakamura A, Nagai K, Suzuki S i wsp. A novel method of screening for immunomodulating substances, establishment of an assay system and its application to culture broths of microorganisms. *J Antibiot* 1986; 39:1148-54.
34. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Meth* 1986; 94:57-63.
35. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65:55-63.
36. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD i wsp. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:4827-33.
37. Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *J Ethnopharmacol* 2000; 70:1-7.
38. Hostettmann K. Saponins with molluscicidal activity from *Hedera helix* L. *Helv Chim Acta* 1980; 63:606-8.
39. Danloy S, Quetin-Leclercq J, Coucke P i wsp. Effects of alpha-hederin, a saponin extracted from *Hedera helix*, on cells cultured *in vitro*. *Planta Med* 1994; 60:45-9.
40. Bhuvan PR, Taxal GS, Jignesh DP i wsp. Potent anticancer activity of *Nigella sativa* seeds. *Scholars Res Libr* 2010; 2(1):52-6.
41. Salomi MJ, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer* 1991; 16:67-72.
42. Salomi NJ, Nair SC, Jayawardhanan KK i wsp. Antitumor principles from *Nigella sativa* seeds. *Cancer Lett* 1992; 63:41-6.
43. Ito N, Tsuda H, Hasagawa R i wsp. Sequential observation of pathomorphologic alterations in preneoplastic lesions during the promoting stage of hepatocarcinogenesis and the development of short-term system for hepatopromoters and hepatocarcinogens. *Toxicol Pathol* 1982; 10:37-49.
44. Alan S, Ian W. The haematoxylin and eosin. [In:] John DB, Alan S (eds.). *The Theory and Practice of Histological Techniques*. Whitehall Books Ltd, Wellington 1996:212.
45. Cotter TG, Martin SJ. Technique in apoptosis. A user Guide. Portland Press, London 1996.
46. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS i wsp. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical studies. *Anticancer Res* 2004; 24:2783-840.
47. Schoieb AM, Dudrick PS, Bell JD i wsp. *In vitro* inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol* 2003; 22:107-13.
48. Latifah SY, Ng WK, Al-Naqeeb G i wsp. Cytotoxicity of thymoquinone (TQ) from *Nigella sativa* towards human cervical carcinoma cells (HeLa). *J Pharmacy Res* 2009; 2(4):585-9.
49. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J Ethnopharmacol* 1999; 67:135-42.
50. Badary OA, Gamal AM. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detect Prev* 2001; 25:362-8.
51. Ng WK, Yazan LS, Ismail M. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. *Toxicol In Vitro* 2011; 25:1392-8.
52. Al-Hader A, Aql M, Hasan Z. Hypoglycemic effect of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacogn* 1993; 31:96-100.
53. El-Zawahrawy B, Al-Zahraa FAH. Effect of *Nigella sativa* on blood level and structure of liver and pancreas in adult male albino rats. *Al-Azhar Med J* 1998; 27:479-83.
54. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the antidiabetic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* 1963; 29:91-6.
55. Gu D, Arnush M, Sarvetnick N. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin-treated Ins-IFN-c transgenic mice.

Pancreas 1997; 15:246-50. **56.** Wilson GL, Patton NJ, McCord JM i wsp. Mechanisms of streptozotocin and alloxan-induced damage in rat beta-cells. Diabetol 1984; 27:587-96. **57.** Gandy SE, Buse MG, Crouch RK. Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. J Clin Invest 1982; 70:650-9. **58.** Hammers HD, Martin S, Federslin K. Aminoguanidine treatment inhibit the development of experimental diabetic retinopathy. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:11. **59.** Albers DS, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. J Neural Transm 2000; 59:133-54. **60.** Abdelmeguid N, Fakhoury R, Kamal S i wsp. Effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of

streptozotocin-induced diabetic rats. J Diabetes 2010; 2:256-66. **61.** Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T i wsp. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. Res Vet Sci 2005; 79:219-23. **62.** Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life Sci 2009; 85:830-4. **63.** Mańkowska D, Bylka W. *Nigella sativa* L. – związki czynne, aktywność biologiczna. Herba Pol 2009; 55:109-25. **64.** Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. Int Immunopharmacol 2005; 5:1749-70. **65.** Dollah MA, Parhizkar S, Latiff LA i wsp. Toxicity effect of *Nigella sativa* on the liver function of rats. Adv Pharm Bull 2013; 3:97-102.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 17.02.2015

zaakceptowano/accepted: 25.09.2015

Adres/address:

*mgr farm. Anna Adamska

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

ul. Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

tel.: +48 (58) 349-12-99

e-mail: anna.adamska@gumed.edu.pl