

*Paweł Kubica¹, Agnieszka Szopa¹, Jakub Dominiak², Maria Łuczkiwicz², Halina Ekiert¹

Werbena lekarska (*Verbena officinalis* L.) – charakterystyka botaniczna, skład chemiczny, znaczenie lecznicze, badania aktywności biologicznej oraz badania biotechnologiczne

Common vervain (*Verbena officinalis* L.) – botanical characteristics, chemical composition, therapeutic significance, studies on the biological activity and biotechnology researches

¹Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków

Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Halina Ekiert

²Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska

SUMMARY

Common vervain (*Verbena officinalis* L.) is a relatively new pharmacopoeial species in official European and also in Polish therapy. "Verbena herb" monograph has been included in the European Pharmacopoeia from 2008 i.e. from Ph. Eur. 6th, and in national translations of this document in EU member countries, including Polish Pharmacopoeia VIII. The current paper presents botanical characteristics of this species. It reviews current knowledge on chemical composition of common verbena herb, which is a rich source mostly of iridoids, phenylpropanoids glucosides, flavonoids and terpenes. A large part of the article summarizes medicinal uses of the plant and professional pharmacological studies which showed antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer actions of verbena herb compounds. Those studies confirmed its medicinal uses long known in European folk medicine and in Chinese medicine. In addition, it was emphasized that the common vervain plays an important role in food and cosmetic industries, especially due to its antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory properties and the presence of essential oil with an attractive fragrance composition. This paper presents also state of biotechnological studies of this species. The studies in this field are carried out by two cooperating research teams in Poland: Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum, Jagiellonian University and Department of Pharmacognosy, Medical University of Gdańsk.

Keywords: common vervain, botanical characteristics, chemical composition, therapeutic significance, biological activity, biotechnology researches

STRESZCZENIE

Werbena lekarska (*Verbena officinalis* L.) jest stosunkowo nowym farmakopealnym gatunkiem w oficjalnym leczeniu europejskim, w tym w leczeniu polskim. Monografia *Verbena herb* figuruje w Farmakopei Europejskiej (wyd. 6) od roku 2008, także w tłumaczeniach tego dokumentu na języki narodowe państw członkowskich Unii Europejskiej, w tym w Farmakopei Polskiej (wyd. VIII). W pracy przedstawiono charakterystykę botaniczną omawianego gatunku. Zaprezentowano aktualny stan badań naukowych dotyczących składu chemicznego ziela. Surowiec ten jest bogatym źródłem głównie irydoidów, glikozydów fenylopropanoidowych, flawonoidów i terpenów. Znaczną część artykułu poświęcono zastosowaniom leczniczym rośliny oraz przeglądowi badań aktywności biologicznej, które wykazały działanie przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Badania te potwierdzają znane od dawna w tradycyjnej medycynie europejskiej i chińskiej możliwe zastosowania lecznicze surowca. Zwrócono ponadto uwagę na ważną pozycję werbeny lekarskiej w przemyśle spożywczym oraz kosmetycznym, ze względu na właściwości przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne oraz obecność w roślinie olejku eterycznego o atrakcyjnej kompozycji zapachowej. Przedstawiono również stan badań biotechnologicznych tego gatunku. Badania w tym zakresie prowadzone są głównie przez dwa współpracujące zespoły badawcze w Polsce – Zakład Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Zakład Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Słowa kluczowe: werbena lekarska, charakterystyka botaniczna, skład chemiczny, działanie lecznicze, aktywność biologiczna, badania biotechnologiczne

Wstęp

Verbena officinalis L. (*Verbenaceae*) (ryc. 1) to znana roślina lecznicza o ugruntowanej pozycji w lecznictwie europejskim, azjatyckim i północnoamerykańskim. Surowcem wykorzystywanym zarówno w tradycyjnej medycynie, jak i we współczesnej fitoterapii jest ziele werbeny – *Verbenae herba* (2-4).

V. officinalis herba – ziele werbeny lekarskiej, mimo że jest od dawna znanym, tradycyjnym surowcem leczniczym, to w oficjalnej medycynie europejskiej pojawiło się stosunkowo niedawno. Od 2008 roku monografia *Verbena herb* obecna jest w Farmakopei Europejskiej (wyd. 6) oraz w tłumaczeniach tego dokumentu na języki narodowe państw członkowskich Unii Europejskiej, w tym w Farmakopei Polskiej (wyd. VIII). Ponadto monografia *Verbenae herba* widnieje również w Farmakopei Chińskiej, m.in. w wydaniu VIII z 2005 roku. W Farmakopei Brytyjskiej oraz Farmakopei Niemieckiej monografie ziela werbeny były obecne już wcześniej (5-9). W Stanach Zjednoczonych werbena lekarska jest od dawna znaną rośliną leczniczą; jej opis znajduje się m.in. w Farmakopei Amerykańskiego Instytutu Homeopatii z 1897 roku.

W Farmakopei Polskiej nazwa łacińska surowca – *Verbenae herba* – określana jest jako ziele witułki lekarskiej (7). W niniejszym artykule zdecydowano określać omawiany gatunek jako werbenę lekarską, pomimo tego, że najczęściej roślina nazywana jest w starszych opracowaniach jako werbena pospolita.



Ryc. 1. Makroskopowy wygląd *V. officinalis* (1)

Nazwa „werbena lekarska” jest bowiem wiernym tłumaczeniem łacińskiej nazwy opisywanego gatunku. Z kolei preferowana aktualnie farmakopealna nazwa – „witułka lekarska” – zupełnie nie występuje lub sporadycznie występuje w starszych polskojęzycznych opracowaniach dotyczących roślin leczniczych.

W dostępnym piśmiennictwie naukowym można znaleźć tylko jedną publikację przeglądową z 2016 roku opisującą *V. officinalis* (10). Praca ta dotyczy tylko opisu wybranych aktywności biologicznych ekstraktów z werbeny lekarskiej i nie porusza wszystkich aspektów ważnych z punktu widzenia charakterystyki i możliwości wykorzystania tego gatunku.

Charakterystyka rodzaju *Verbena*

Verbena officinalis jest głównym gatunkiem należącym do rodzaju *Verbena* z rodziny *Verbenaceae* – Werbenowate (podrodzina *Verbeneae*) (6, 11, 12). W piśmiennictwie naukowym istnieją sprzeczne informacje dotyczące liczby rodzajów oraz gatunków należących do rodziny *Verbenaceae*. Szacuje się, że obejmuje ona około 30 rodzajów, m.in. *Aloysia*, *Citharexylum*, *Lantana*, *Lippia*, *Phyla* i *Verbena*. Cała rodzina *Verbenaceae* liczy około 1100 gatunków. Są to zarówno drzewa, krzewy, jak i rośliny zielne (13, 14). Do rodzaju *Verbena*, według różnych źródeł, należy od 44 do 250 gatunków. Gatunki rodzaju *Verbena* występują głównie na terenie obu Ameryk. Dwa gatunki: *V. officinalis* L. i *V. supina* L. spotykane są na wszystkich kontynentach (15, 16). W Polsce oprócz *V. officinalis* popularne są gatunki uprawiane jako rośliny ozdobne: *V. hastata* L. (werbena krzaczasta), *V. bonariensis* L. (werbena patagońska) oraz *V. × hybrida* Groenl. & Rumphel (werbena ogrodowa). Jest to mieszaniec następujących gatunków: *V. incisa* Hook., *V. peruviana* (L.) Britto, *V. phlogiflora* Cham. i *V. teuroides* (16).

W Farmakopei Europejskiej oraz w Farmakopei Polskiej figuruje również monografia *Verbenae citriodora folium* – liść witułki cytrynowej. Witułka cytrynowa jest gatunkiem charakteryzującym się innym składem chemicznym niż werbena lekarska (to typowy surowiec olejkowy) i innym, ograniczonym rozmieszczeniem stanowisk naturalnych. Według najnowszych opracowań systematycznych witułka cytrynowa – *Aloysia citrodora* Palau (*Aloysia triphylla* (L’Her.) Kuntze; *Verbena triphylla* L’Her.; *Lippia citriodora* Kunth), w przeciwieństwie do werbeny lekarskiej, która reprezentuje podrodzinę *Verbeneae*, należy do innej podrodziny z rodziny *Verbenaceae* – *Lantanae* (12).

Charakterystyka botaniczna *V. officinalis*

Verbena officinalis L. jest gatunkiem mającym liczne nazwy synonimowe. W języku łacińskim: *Verbena sororia* D. Don, *V. spuria* L. (11, 18); w języku polskim: werbena lekarska, witułka lekarska, werbena pospolita, werbena włoska; w języku angielskim: common vervain, European vervain; w języku francuskim: Verveine officinale, Verveine sauvage, a w języku niemieckim: Eisenkraut, Katzenblutkraut, Sagenkraut i Wunschkraut.

Identyfikacja *V. officinalis* najczęściej oparta jest na cechach morfologicznych oraz analizie fitochemicznej. Szczególnie w przypadku rozdrobnionego surowca farmaceutycznego rozpoznanie gatunku na podstawie cech morfologicznych wymaga specjalistycznej wiedzy. Analiza fitochemiczna jest utrudniona ze względu na dużą zmienność składu chemicznego surowca w zależności od jego pochodzenia. Obecnie istnieją nowoczesne sposoby jednoznacznej identyfikacji gatunku przy pomocy markerów genetycznych (19).

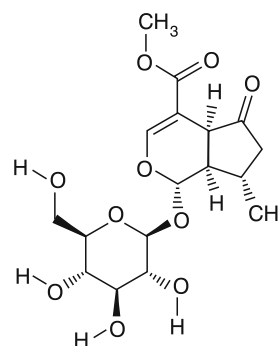
Naturalne stanowiska występowania *V. officinalis* (20) są szeroko rozpowszechnione na całym świecie: na terenie Europy, obu Ameryk, Afryki Północnej i Środkowej, Azji i Australii. Gatunek ten rośnie głównie w strefie klimatu umiarkowanego. W Europie występuje pospolicie w basenie Morza Śródziemnego. W Polsce stanowiska naturalne skupione są głównie na Pogórzu Karpackim i w niższych partiach gór (21). Rozproszone stanowiska werbeny lekarskiej można znaleźć na nizinach w południowej części Polski (13, 18, 22-24).

Werbena lekarska preferuje gleby suche, ale dobrze utrzymujące wilgoć oraz nasłonecznione stanowiska. Jest gatunkiem ruderalnym (11, 22, 25). Występuje na polach, kamieńcach, przydrożach oraz nieużytkach, często w pobliżu zbiorników wodnych (11, 26).

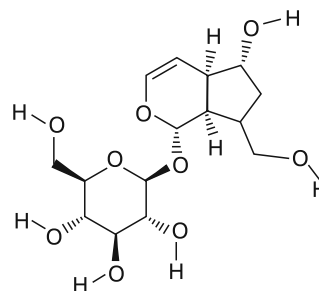
V. officinalis (ryc. 1) jest dorastającą od 75 cm do 1 m wieloletnią rośliną zielną. Wzniesione, rozgałęziające się u góry, zdrewniałe łodygi, w przekroju czterokanciaste, pokryte są szorstkimi włoskami (11). Górne liście są siedzące, wcinanokarbowane, ułożone naprzeciwlegle; środkowe są trójdzielne, dolne z kolei ogonkowe, pierzastodzielne. Od czerwca do września gatunek ten wytwarza drobne, bladoliliowe kwiaty zebrane w kłosokształtne, luźne kwiatostany szczytowe zlokalizowane w kątach liści. Pojedynczy kwiat ma drobną, prawie dwuwargową koronę, z krótką, nieco zgiętą rurką rozszerzającą się w wianek. Wewnątrz wyposażonego w 4 lub 5 ostrych ząbków kielicha, znajduje się słupek górny z podzieloną na komory zalążnią. Przyrośnięte do wnętrza komory pręciki występują w liczbie 2, 4 lub 5. Owocem jest podłużna, żeberkowana rozłupnia (10, 11, 18, 20, 21, 27).

Skład chemiczny

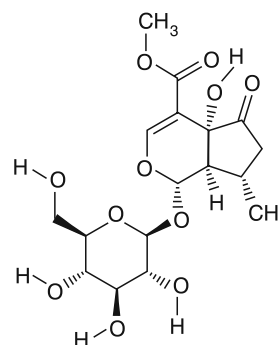
Verbenae officinalis herba charakteryzuje się bogatym składem chemicznym (tab. 1). Głównymi grupami metabolitów wtórnych, determinującymi profile aktywności biologicznej surowca są: glikozydy irydoidowe, m.in. werbenalina (werbenalozyd) (ryc. 2), aukubina (werbenina) (ryc. 3) i hastatozyd (ryc. 4), a także glikozydy fenylopropanoidowe (pochodne kwasu kawowego), m.in. werbaskozyd (akteozyd) (ryc. 5), izowerbaskozyd (izoakteozyd) (ryc. 6) i eukowozyd (28).



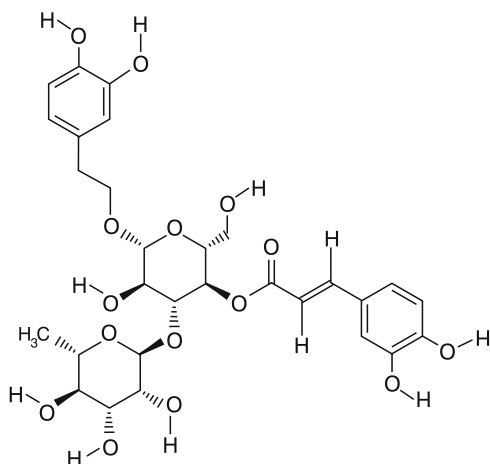
Ryc. 2. Struktura chemiczna werbenaliny (werbenalozyd)



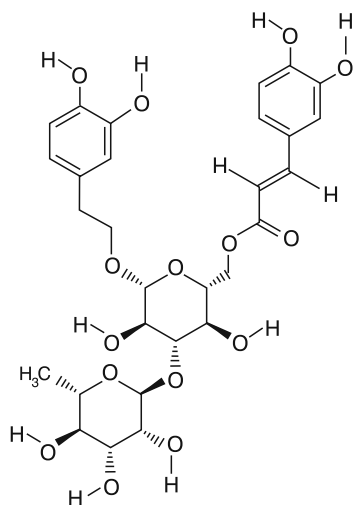
Ryc. 3. Struktura chemiczna aukubiny (werbenina)



Ryc. 4. Struktura chemiczna hastatozydu



Ryc. 5. Struktura chemiczna werbaskozydu (akteozyd)



Ryc. 6. Struktura chemiczna izowerbaskozydu (izoakteozyd)

Według aktualnie obowiązującej Farmakopei Polskiej X surowiec powinien być standaryzowany na zawartość werbenaliny (ryc. 2). Minimalna zawartość tego związku nie powinna być niższa niż 1,5% w przeliczeniu na suchą masę (7, 29).

Ponadto w ekstraktach z ziela werbeny zidentyfikowano liczne flawonoidy, m.in. popularne w świecie roślin związki, takie jak: kemferol, luteolina, apigenina, jak również rzadziej spotykane flawonoidy, takie jak: skutelareina i pedalityna. Na uwagę zasługuje także obecność kwasów fenolowych: chlorogenowego, ferulowego, protokatechowego, rozmarynowego i pochodnych kwasu dikawoilochinowego (tab. 1).

Ziele *V. officinalis* charakteryzuje się również obecnością olejku eterycznego, w skład którego wchodzi około 40 związków, głównie monoterpenu

(m.in. limonen, cytral, cyneol, karwon) (30). Inne grupy związków terpenowych charakterystyczne dla olejku to diterpeny (karnozol, kwas karnozolowy, rozmanol, izorozmanol) oraz triterpeny (kwas ursolowy i jego pochodne) (26, 31-36).

Analizy fitochemiczne wykazały, że ekstrakty metanolowe z łądy werbeny zawierają sterole, takie jak: α -sitosterol, β -sitosterol i daukosterol (26, 37).

Ziele werbeny zawiera węglowodany, w tym: kwas galakturonowy, arabinozę, galaktozę, ramnozę, ksylozę, mannozę czy glukozę oraz duże ilości biopierwiastków, głównie: potasu, fosforu, wapnia, magnezu, cynku, żelaza, manganu i miedzi (9, 13, 23).

Zastosowanie w lecznictwie

Ekstrakty z ziela werbeny lekarskiej od dawna stosowane są w lecznictwie tradycyjnym, m.in. europejskim i północnoamerykańskim, jak również w tradycyjnej chińskiej medycynie (TCM). Możliwe zastosowanie terapeutyczne znajduje potwierdzenie we współczesnych badaniach naukowych dotyczących składu chemicznego i działania związków biologicznie aktywnych (4, 9).

Ziele werbeny lekarskiej wykorzystywane jest jako surowiec przeciwdrobnoustrojowy, sekretolityczny oraz wykrztuśny. Stosowane jest w leczeniu chorób górnych dróg oddechowych, głównie w stanach zapalnych gardła i zatok (22, 29). W chorobach skórnych ziele werbeny stosuje się jako środek zmięczający oraz przeciwzapalny i przeciwbakteryjny w leczeniu trudno gojących się ran, a także w zapaleniu dziąseł (4, 20, 20, 26, 28, 48). Znane jest też działanie moczopędne ekstraktów z ziela tego surowca mające zastosowanie w chorobach nerek i pęcherza moczowego. U kobiet surowiec stosowany jest w zaburzeniach menstruacyjnych, a u matek karmiących w celu pobudzenia laktacji (20, 22, 26, 28). Tradycyjne zastosowanie werbeny lekarskiej w zaburzeniach funkcji układu nerwowego to leczenie depresji, bezsenności i dolegliwości lękowych (26). Ponadto z piśmiennictwa wynika, że werbena stosowana jest też w leczeniu chorób wątroby oraz w żółtaczkę i zapaleniu pęcherzyka żółciowego (22). Ekstrakty z ziela werbeny lekarskiej stosowane są w zwalczaniu gorączki towarzyszącej przebiegniom, mają też właściwości wspomagające w leczeniu malarii oraz reumatyzmu (26, 32, 49).

Surowiec zazwyczaj stosuje się jako napar (20). Na polskim rynku dostępne są preparaty zawierające w składzie ekstrakt z ziela werbeny lekarskiej w formie tabletek, drażetek, syropów, kropli i płynów. Są to głównie suplementy diety, takie jak: Asinus Zatoki (tabletki), Cosinus (tabletki), Nasirus Sinus (tabletki powlekane, płyn doustny), Pneumolan (płyn

Tab. 1. Skład chemiczny ziela *V. officinalis*

Grupy związków	Poszczególne związki
Irydoidy	werbenalina (20, 29) i jej pochodna 3,4-dihydrowerbenalina (26, 32); hastatozyd (20) i jego pochodna 7-hydroksydehydrohastatozyd (26, 32); aukubina (26), werbeoflina (32), werbenozyd A oraz B (3), kornina (38)
Glikozydy fenylopropanoidowe	werbaskozyd (20, 26, 29, 39) oraz jego pochodne (6-acetylo-O-werbaskozyd, 4-acetylo-O-werbaskozyd, 2,4-diacetylo-O-werbaskozyd (39), β -hydroksywerbaskozyd (40)); izowerbaskozyd (37, 39) oraz jego pochodne (4-acetylo-O-izowerbaskozyd, 3,4-diacetylo-O-izowerbaskozyd (39), β -hydroksyizowerbaskozyd (40)); kampenozyd II (39); izokampenozyd II (39); betonyozyd A oraz jego pochodne (4,6-diacetylo-O-betonyozyd A, 3,4-diacetylo-O-betonyozyd A) (39)
Flawonoidy	kemferol (26), luteolina (26, 33, 37) oraz jej połączenia glikozydowe (7-O-diglukuronid, 7-O-galaktozyd, 7-O-glukozyd (9), glikozyd 6-hydroksyluteoliny (41)) i luteolino-7-O-rutynozyd (42); apigenina (26, 33, 37) oraz jej połączenia glikozydowe (7-O-diglukuronid, 7-O-galaktozyd, 7-O-glukozyd (9), glikozyd 6-hydroksyapigeniny (41)); izoramnetyna (34); kwercetol (34), pedalitina oraz jej połączenia glikozydowe (7-O-(2-O-feruloilo)-diglukuronid, 7-O-diglukuronid, 7-O-glukuronid, 7-O-glukozyd (9)); skutelareina (26) oraz jej połączenia glikozydowe (7-O-(2-O-feruloilo)-diglukuronid, 7-O-diglukuronid, 7-O-glukuronid, 7-O-glukozyd (9))
Kwasy fenolowe	kwas chlorogenowy (43); kwas ferulowy (44); kwas protokatechowy (44); kwas 4,5-O-dikawoilochoinowy (9); kwas 1,5-dikawoilochoinowy (9); kwas rozmarynowy (42)
Terpeny	monoterpeny: cytral (30); cyneol (26); geranial (45); limonen (26, 30); linalool (45); karwon (46); mrówczan izobornylu (30); werbenon (45) diterpeny: karnozol (42); kwas karnozolowy (42); rozmanol (42); izorozmanol (42) triterpeny: kwas ursolowy (26, 35, 47) oraz jego pochodne (kwas 3 α ,19,23-trihydroksyurs-12-en-28-olowy, kwas 2 α ,3 β -dihydroksyurs-12-en-28-olowy, kwas 3 α ,24-dihydroksyurs-12-en-28-olowy, 3-epiursolowy) (35, 36)
Węglowodany	kwas galakturonowy, arabinoza, galaktoza, ramnoza, ksyloza, mannoza, glukoza (23)
Sterole	α -sitosterol (26); β -sitosterol (37); daukosterol (37)
Kwasy tłuszczowe	kwas oleinowy (26); kwas 3-epioleanolowy (36); kwas 3 α ,24-dihydroksy-olean-12-en-28-owy (37)
Biopierwiastki	potas, sód, żelazo, magnez, wapń, fosfor, miedź, cynk, mangan (13)

doustny), RenoPuren Zatoki (tabletki), Sinucol (tabletki powlekane), Sinudafen (kapsułki, syrop), Sinufast (kapsułki), Sinulan (tabletki powlekane, płyn doustny), Zatocan Forte (kapsułki), Zatogrip kids (syrop). Jedynym preparatem zarejestrowanym jako lek jest Sinupret (drażetki, krople) firmy Bionorica®. Wymienione liczne suplementy diety i Sinupret stosowane są wspomagająco w ostrych oraz przewlekłych stanach zapalnych zatok.

Zastosowanie w produkcji żywności

W 2010 roku Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority – EFSA) w opinii naukowej – „Uzasadnienia oświadczeń zdrowotnych dotyczących różnych produktów żywnościowych/składników żywności dotyczących aktywności przeciwutleniającej, ochrony komórek przed przedczesnym starzeniem, zawartości przeciwutleniaczy, właściwości przeciwutleniających oraz ochrony DNA” – uwzględnił ziele werbeny lekarskiej. W opinii tej znajdują się informacje wskazujące, że ziele werbeny może chronić komórki i tkanki przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym oraz iż zwiększa fizjologiczną odporność organizmu (50).

Zastosowanie w kosmetologii

Produkty z werbeny lekarskiej stosowane są w kosmetologii głównie ze względu na obecność olejku eterycznego o charakterystycznym zapachu. W prowadzonej przez Komisję Europejską bazie surowców kosmetycznych (Cosmetic Ingredient Database – CosIng) (51) możemy znaleźć następujące produkty z werbeny do wykorzystania w produkcji kosmetyków:

- ekstrakt z ziela oraz ekstrakt z ziela i kwiatów – dopuszczone do stosowania jako emolienty oraz jako środki kondycjonujące skórę,
- ekstrakt z kwiatów oraz woda kwiatowa – zastosowanie w kondycjonowaniu skóry,
- woda z kwiatów i liści – zastosowanie jako środki aromatyzujące oraz do kondycjonowania skóry,
- olejek oraz absolut (czyli olejek zawierający wyłącznie lotne związki wonne) z liści – zatwierdzone jako składnik perfum.

Na światowym rynku kosmetycznym dostępnych jest wiele różnych kosmetyków zawierających w swoim składzie produkty z werbeny lekarskiej. Są to: mydła, szampony do włosów, balsamy do ciała, olejki do

masażu oraz peelingi do ciała produkowane przez takie firmy, jak: Oriflame, Avon, Dr. W. Gruber's, O'Herbal, Baylis & Harding, Green Pharmacy i Lavera Naturkosmetik.

Aktywność biologiczna składników ziela werbeny lekarskiej

Wykorzystanie ziela werbeny lekarskiej we współczesnej fitoterapii jest ugruntowane jego zastosowaniem w medycynie tradycyjnej. Badania naukowe potwierdzają zasadność dotychczasowych zastosowań oraz donoszą o coraz to nowych wskazaniach dla tego surowca. Wyciąg z ziela werbeny wykazuje udowodnione badaniami *in vitro* oraz *in vivo* działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwdrgawkowe, przeciwłękowe, uspokajające, przeciwnowotworowe, moczopędne, przeciwkaszlowe i sekretolityczne (10, 20, 26, 52).

Za działania biologiczne (wymienione i opisane dokładniej w dalszej części artykułu) odpowiadają wytwarzane przez roślinę metabolity wtórne, a także obecne w znacznych ilościach makro- i mikroelementy (9, 13).

Poniżej przedstawiono przykłady badań z lat 2000-2017 dokumentujące główne kierunki aktywności biologicznej omawianego surowca.

Działanie przeciwutleniające

Liczne badania naukowe potwierdzają działanie przeciwutleniające ekstraktów z ziela werbeny lekarskiej, istotne w zapobieganiu chorobom nowotworowym i chorobom serca (9).

Badania Rehecho i wsp. (9) nad działaniem przeciwutleniającym 50% ekstraktu etanolowego oraz ekstraktu wodnego z ziela werbeny potwierdziły ich korzystne efekty w usuwaniu wolnych rodników. W badaniach tych oba ekstrakty zostały rozfrakcjonowane z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej. W uzyskanych frakcjach oznaczono też zawartość związków biologicznie aktywnych. Najsilniejszym działaniem przeciwutleniającym charakteryzowała się frakcja zawierająca głównie werbaskozyd (który najprawdopodobniej był odpowiedzialny za badane właściwości), a także 7-glukozyd luteoliny, kwasy 1,5- oraz 4,5-dikawoilochinowe oraz izowerbaskozyd (9).

Wyniki badań Abebe i wsp. (22), w których porównywano aktywność różnych rodzajów ekstraktów (ekstrakcja z użyciem 80, 90 i 100% metanolu oraz ekstrakty chloroformowe) z korzeni oraz liści, potwierdziły wysoką aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z werbeny lekarskiej. Prowadzone

z wykorzystaniem metod FRAP i DPPH oznaczenia wykazały, że spośród badanych rozpuszczalników 90% metanol najlepiej sprzyjał ekstrakcji związków o działaniu przeciwutleniającym. Stwierdzono również, że ekstrakty z korzeni wykazały wyższą aktywność niż ekstrakty z liści (22).

Działanie przeciwbakteryjne

Ahmed i wsp. (13) przeprowadzili badania nad działaniem przeciwbakteryjnym etanolowych ekstraktów z łodyg, liści oraz korzeni *V. officinalis* z użyciem 13 szczepów bakterii wywołujących groźne zakażenia (w tym cztery metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* oraz cztery wielooporne szczepy *Salmonella typhi*). Wszystkie badane ekstrakty wykazały wyraźne działanie przeciwbakteryjne w stosunku do badanych szczepów. Ekstrakty z pędów wykazały silniejsze działanie niż ekstrakty z liści i korzeni. Najbardziej wrażliwy okazał się szczep *Acinetobacter baumannii*. Metycylinooporne szczepy *S. aureus* oraz wielooporne szczepy *S. typhi* również były wrażliwe na działanie ekstraktów z łodyg werbeny. Najmniej wrażliwe na działanie badanych ekstraktów okazały się bakterie *Escherichia coli* (13).

Także badania przeprowadzone przez Abebe i wsp. (22) potwierdziły działanie przeciwbakteryjne metanolowych ekstraktów z ziela werbeny lekarskiej na różne szczepy bakterii. Aktywność ta była bardziej zaznaczona w stosunku do bakterii Gram-dodatnich: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*. Minimalne stężenie hamujące wynosiło odpowiednio 4,8 oraz 8,0 mg/ml.

Badania Zhanga i Pana (43) prowadzone na szczepach bakterii *E. coli*, *Proteus vulgaris* oraz *Bacillus subtilis* również wykazały silne działanie przeciwbakteryjne ekstraktów etanolowych z ziela w stosunku do badanych bakterii Gram-ujemnych. Na siłę działania wpływ miało stężenie rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji – wyższe stężenia alkoholu pozwalały na uzyskiwanie silniejszego działania ekstraktu (43).

Działanie przeciwgrzybicze

Casanova i wsp. (53) opublikowali wyniki doświadczeń dotyczących właściwości przeciwgrzybiczych ekstraktów z liści werbeny lekarskiej. Badano ekstrakty chloroformowe, metanolowe oraz octanoetylowe. Ponadto badano frakcje zawierające główne grupy związków charakterystycznych dla werbeny lekarskiej oraz wyizolowane z ekstraktów związki (7-glukozyd luteoliny, 7-diglukuronid luteoliny, 7-diglukuronid apigeniny, kwas chlorogenowy oraz werbaskozyd). Działanie przeciwgrzybicze testowano na grzybach: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium*

expansum oraz *Rhizopus stolonifer*. Okazało się, że żaden z badanych ekstraktów nie wykazywał znaczącego działania w stosunku do *A. alternata* i *B. cinerea*, natomiast 50% ekstrakt metanolowy z omawianego surowca wykazywał działanie przeciwgrzybicze w stosunku do *P. expansum* i *R. stolonifer*. Było ono jednak słabsze niż działanie frakcji zawierającej kwas chlorogenowy i werbaskozyd (53).

Działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe

Mohammed i wsp. (48) opublikowali wyniki badań klinicznych dotyczących zastosowania odwaru z zieleń *V. officinalis* w leczeniu chronicznego zapalenia dziąseł. W podwójnie ślepej próbie przeprowadzonej na 230 pacjentach analizowali wpływ codziennego płukania jamy ustnej odwarem z zieleń werbeny. Stan dziąseł pacjentów był porównywany po 14 i 28 dniach stosowania odwaru. Eksperyment potwierdził korzystny wpływ odwaru na stan dziąseł przy jednoczesnym braku widocznych działań niepożądanych (48).

Działanie przeciwzapalne ekstraktu z zieleń werbeny lekarskiej potwierdzili również Speroni i wsp. (54). Badania przeprowadzone na szczurach miały na celu sprawdzenie wpływu różnych typów ekstraktów z zieleń werbeny lekarskiej (ekstrakt metanolowy, ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym i ekstrakt o dużej zawartości flawonoidów) na stan zapalny wywołany karageniną. Wszystkie badane ekstrakty wykazały działanie przeciwzapalne. Największą aktywnością charakteryzował się ekstrakt otrzymany z użyciem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym (54).

Z kolei Calvo (52) zbadał działanie maści z dodatkiem od 1 do 3% suchego ekstraktu z liści werbeny. Właściwości przeciwzapalne określano, analizując obrzęk łapy szczura wywołany karageniną, a właściwości przeciwbólowe obserwowano na podstawie zachowania się szczurów po wstrzyknięciu formaliny. Maści zawierające 2,5 oraz 3% suchego ekstraktu wykazywały działanie przeciwzapalne, porównywalne do żelu zawierającego 0,5% piroksykamu. Działanie przeciwbólowe było wyraźne w porównaniu z grupą kontrolną, jednak słabsze niż maści zawierającej 30% salicylanu metylu.

Działanie przeciwdrgawkowe, przeciwłękowe i uspokajające

Stosowanie werbeny lekarskiej w tradycyjnej medycynie w leczeniu chorób układu nerwowego skłoniło Khana i wsp. (26) do badań nad działaniem przeciwdrgawkowym, przeciwłękowym oraz uspokajającym omawianego surowca. Badaniom na myszach

poddany został wodno-metanolowy ekstrakt z zieleń *V. officinalis*. Do oceny wpływu ekstraktu na badane zwierzęta wykorzystano następujące metody: wywołanie drgawek indukowane pentetrazolem (PTZ), test labiryntu krzyżowego, test jasnego i ciemnego pola, test otwartego pola, test snu wywołany tiopentalem oraz test ostrej toksyczności. Badania potwierdziły przeciwdrgawkowe, przeciwłękowe oraz uspokajające działanie *V. officinalis* (25).

Badania Rashidiana i wsp. (55) również potwierdziły działanie przeciwdrgawkowe etanolowego ekstraktu z zieleń werbeny. Prowadzono je na myszach, u których wywoływano drgawki dwoma metodami: z użyciem prądu elektrycznego oraz z wykorzystaniem PTZ. Lekiem referencyjnym był diazepam. W pierwszej metodzie wykazano, że suchy ekstrakt w dawce 100 i 200 mg/kg masy ciała wykazywał efekt przeciwdrgawkowy, a dawka 400 mg/kg m.c. była równie efektywna jak podanie 1 mg/kg m.c. diazepam. W metodzie z zastosowaniem PTZ tylko dawka 400 mg/kg m.c. opóźniła wystąpienie i skracała czas trwania drgawek. W badaniu wykazano również znikomą toksyczność zastosowanego ekstraktu (55).

Działanie nasenne

Tradycyjne zastosowanie naparu z zieleń werbeny w leczeniu bezsenności również zostało zweryfikowane badaniami naukowymi. Makino i wsp. (56) badali w warunkach *in vivo* działanie nasenne składników wodnego ekstraktu z zieleń werbeny. Z otrzymanego ekstraktu wyizolowano hastatozyd, werbenalinę oraz werbaskozyd. Zarówno aktywność ekstraktu, jak i samych związków zbadano, monitorując czas trwania fazy snu NREM (ang. *non-rapid eye movement*), tzw. snu głębokiego, analizując aktywność fal delta przy pomocy EEG. Ekstrakt oraz roztwory związków były podawane szczurom do żołądka przez 30 min (między godziną 20:00 a 20:30) z szybkością 200 μ l/min. Podawane dawki wynosiły od 0,32 do 1,28 mmol/kg masy ciała. Analizując czas snu między godziną 23:00 a 8:00 rano, zaobserwowano, że hastatozyd wykazywał istotne działanie farmakologiczne w dawce 0,64 mmol/kg (wydłużenie fazy NREM o 81%), werbenalina w dawce 1,28 mmol/kg (wydłużenie fazy NREM o 42%). Natomiast werbaskozyd nie wykazał takiego działania nawet w najwyższej badanej dawce. Niekorzystnymi efektami były pobudzenie oraz biegunka do 2 godzin po podaniu roztworów. Hastatozyd i werbenalina działały podobnie do benzodiazepin, wydłużając czas trwania fazy NREM, jednak w przeciwieństwie do tych leków nie wywoływały niekorzystnego wpływu na aktywność fal delta w mózгах badanych szczurów (56).

Działanie neuroochronne

Lai i wsp. (23) udowodnili w badaniach *in vitro* neuroochronne działanie ekstraktu wodnego z ziela werbeny lekarskiej. Badania przeprowadzono na neuronach kory mózgowej szczurów. Neurony poddawano działaniu ekstraktu wodnego z ziela werbeny w różnych dawkach (od 25-150 $\mu\text{g/ml}$), a następnie działaniu różnych toksyn, takich jak: β -amyloid, tunikamycyna, ditiotreitol, nadtlenuk wodoru oraz działaniu promieniowania UV. Działanie cytotoksyczne określano na podstawie poziomu aktywności dehydrogenazy mleczanowej. Stwierdzono, że ekstrakt wodny z ziela werbeny chronił komórki nerwowe przed toksycznym działaniem ditiotreitolu oraz β -amyloidu, nie chronił ich natomiast przed działaniem tunikamycyny oraz promieniowania UV, co może świadczyć o słabszym działaniu ekstraktu w stosunku do czynników bezpośrednio uszkadzających DNA. Uzyskane wyniki dowodzą, że ekstrakt wodny z werbeny może mieć potencjalne zastosowanie w zapobieganiu chorobom neurodegeneracyjnym, ze szczególnym uwzględnieniem choroby Alzheimera (23).

Działanie przeciwdepresyjne

Działanie przeciwdepresyjne metanolowych ekstraktów z liści werbeny lekarskiej oceniane było przez Jawaid i wsp. (57). Testowano wpływ ekstraktów w dawkach 100 i 200 mg/kg m.c. na zachowanie myszy. Próbę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podawano sól fizjologiczną, zaś grupie referencyjnej podawano 15 mg/kg m.c. imipraminy. Myszy przyjmowały preparaty przez 7 dni. Zachowanie depresyjne oceniano na podstawie trzech rodzajów testów: zawieszenia za ogon (TST), wymuszonego pływania (FST) oraz spontanicznej aktywności motorycznej (SLMA). W testach TST i FST stwierdzono istotne, zależne od dawki, skrócenie czasu biernej postawy w porównaniu z próbą kontrolną, jednak słabsze w porównaniu z próbą referencyjną. Mechanizm działania przeciwdepresyjnego ekstraktów z werbeny nie jest jednak znany i jego poznanie wymaga dalszych badań (57).

Wpływ na układ krążenia

Ziele werbeny zawiera duże ilości biopierwiastków, takich jak: potas, fosfor, wapń i magnez. Jednocześnie zawartość sodu jest stosunkowo niska, szczególnie w porównaniu z potasem. Niski stosunek sodu do potasu jest korzystny w przypadku stosowania preparatów z werbeny u osób z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu układu krążenia (9).

Działanie przeciwnowotworowe

De Martino i wsp. (30) przeprowadzili badania nad cytotoksycznym działaniem olejku eterycznego z ziela

werbeny oraz cytralu (głównego składnika olejku) w stosunku do komórek nowotworowych w warunkach przewlekłej białaczki limfocytarnej. Badania przeprowadzono w warunkach *in vitro*, określając liczbę ulegających apoptozie limfocytów CD19 w próbkach pobranych od pacjentów z nieleczoną białaczką limfocytarną. Próbkę analizowano po 4, 8 oraz 24 godzinach od dodania olejku. Wyniki wykazały wysoką aktywność cytotoksyczną zarówno olejku, jak i cytralu w stosunku do komórek nowotworowych. Niezbędne są jednak dalsze badania, które pozwolą na dokładne wyjaśnienie mechanizmu działania tych substancji (30).

Działanie cytotoksyczne ziela werbeny lekarskiej na komórki nowotworowe zostało potwierdzone badaniami przeprowadzonymi przez Kou i wsp. (49). W eksperymencie wykorzystano myszy zakażone komórkami nowotworowymi linii H22, którym podano suchy ekstrakt z ziela werbeny. Wykazano związek pomiędzy zmniejszeniem masy guza nowotworowego a ilością podawanego ekstraktu. Stwierdzono również, że ekstrakt w zastosowanych dawkach nie zaburzał funkcji układu odpornościowego (49).

W poszukiwaniu nowych leków możliwych do zastosowania w leczeniu raka jelita grubego Encalada i wsp. (39) zbadali działanie antyproliferacyjne ekstraktu z ziela werbeny lekarskiej oraz wyizolowanych z niego glikozydów fenylopropanoidowych. Efekt przeciwnowotworowy został potwierdzony w stosunku do dwóch linii komórkowych DHD/K12/PROb (szczura) oraz HCT-116 (ludzkiej). Szczególnie silne działanie spośród wyizolowanych związków wykazywały: 3,4-diacetylo-O-izowerbaskozyd oraz 3,4-diacetylo-O-betonyozyd. Na podstawie badań stwierdzono, że diacetylofenylopropanoidy mogą być cennymi związkami o działaniu chemoochronnym (39).

Przyspieszenie gojenia ran

Badania Speroni i wsp. (54) dotyczyły wpływu na zabliznianie się ran u szczurów żelu z dodatkiem jednego z trzech ekstraktów z ziela werbeny lekarskiej: ekstraktu metanolowego (VoME), ekstraktu o dużej zawartości flawonoidów (VoFE) oraz ekstraktu przygotowanego przez ekstrakcję dwutlenkiem węgla w warunkach nadkrytycznych (VoCO₂). Miejsce zranienia było pokrywane 0,5 ml żelu zawierającego 20 mg ekstraktu i przykrywane opatrunkiem okluzyjnym. Po 24 godzinach określano stan powierzchni rany. Udowodniono, że zastosowane miejscowo ekstrakty z ziela werbeny znacząco wpływają na przyspieszenie gojenia ran (54).

Właściwości gastroochronne

Speroni i wsp. (54) prowadzili także badania nad działaniem gastroochronnym ekstraktów VoFE oraz

VoCO₂ w dawkach 100 i 200 mg/kg m.c. Jako próbę referencyjną zastosowano mizoprostol w dawce 100 µg/kg. Jako czynnik uszkodzający zastosowano etanol 96%. Po 2 godzinach porównywano wskaźnik uszkodzenia śluzówki żołądka. Wszystkie ekstrakty wykazywały działanie gastroochronne, z czego najbardziej widoczne było działanie VoCO₂ (54).

Działanie insektobójcze

Komary są źródłem przenoszenia groźnych chorób zakaźnych, takich jak: malaria, gorączka denga czy filarioza. Aby zapobiec szerzeniu się zakażeń istotne jest zmniejszanie populacji owadów. W tym celu stosuje się toksyczne pestycydy szkodliwe dla zdrowia ludzi i zwierząt. W poszukiwaniu nowych, bezpieczniejszych insektycydów Zoubiri i wsp. (46) dowiedli, że olejek z ziela werbeny lekarskiej zabija znajdujące się w wodzie larwy komara brzęczącego (*Culex pipiens*). Wyniki tych badań mogą być istotne przy projektowaniu i zastosowaniu nowych, skutecznych insektycydów (46).

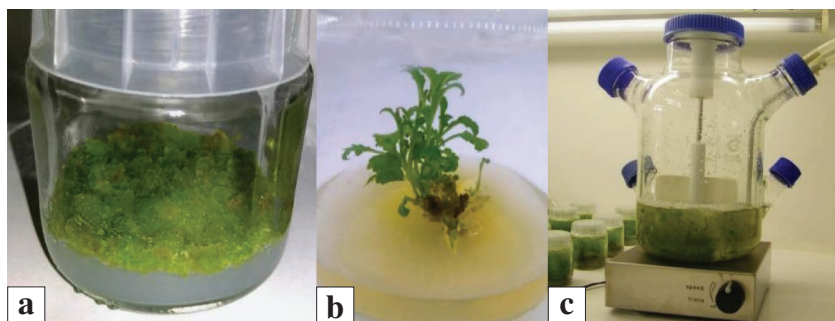
Badania biotechnologiczne

Celem badań z zakresu biotechnologii roślin jest wykorzystanie potencjału biochemicznego i morfotycznego komórek roślinnych. Podstawowym obiektem badawczym są prowadzone na specjalnych pożywkach hodowle *in vitro* protoplastów, komórek, tkanek, organów, całych roślin lub ich fragmentów. Do głównych kierunków badań zalicza się: endogenną akumulację metabolitów wtórnych, procesy biotransformacyjne, mikrorozmnażanie roślin oraz inżynierię genetyczną (58).

Doniesienia na temat badań biotechnologicznych nad werbeną lekarską są nieliczne i dotyczą głównie mikrorozmnażania tego gatunku. Przykładem mogą być badania Türker i wsp. (2), w których opisano efektywny system odnowy roślin z międzywęźli, blaszek liściowych oraz ogonków liściowych werbeny. Eksplantaty

pozyskano z pięcioletnich siewek otrzymanych z odkażonych nasion (poddanych wcześniej stratyfikacji), wysianych na pożywce MSMO (Murashige and Skoog Minimal Organics) (59). Fragmenty siewek umieszczono na pożywce z dodatkiem różnych rodzajów oraz stężeń regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (6-benzyladenina – BA, tidiazuron – TDZ, kwas indolilo-3-octowy – IAA). Po 3-tygodniowym cyklu hodowlanym wyrosłe rośliny w celu elongacji pędów przełożono na takie same podłoża na kolejne 2 tygodnie. Kolejnym etapem była 3-tygodniowa hodowla na podłożu MSMO z dodatkiem różnych stężeń IAA, kwasu indolilo-3-masłowego (IBA), kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) oraz kwasu nafylo-1-octowego (NAA) w celu uzyskania korzeni. Następnie rośliny zostały przeniesione na wyjałowioną ziemię. Po 2 tygodniach policzono ilość wytworzonych pędów oraz procent eksplantatów, które wytworzyły pędy. Najlepsze wyniki odnowy uzyskano w przypadku eksplantatów pozyskanych z międzywęźli. W przypadku eksplantatów z liści nie uzyskano odnowy pędów. Największą ilość eksplantatów wytwarzających nowe pędy stwierdzono na podłożu z dodatkiem 13,32 µmol BA w połączeniu z 5,71 µmol IAA. Wzrostowi korzeni najbardziej sprzyjał dodatek 4,92 µmol IBA. Opracowane metody mikrorozmnażania mogą być źródłem dużej liczby jednorodnych sadzonek, wolnych od drobnoustrojów chorobotwórczych, dostępnych przez cały rok (1).

W Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego we współpracy z zespołem z Zakładu Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego prowadzone są intensywne badania nad zainicjowanymi w 2014 roku kulturami *in vitro* werbeny lekarskiej (kultury kalusowe) (ryc. 7a). Prace biotechnologiczne skupione są na zwiększeniu akumulacji związków bioaktywnych w biomasie kultur na drodze



Ryc. 7a-c. Kultury *in vitro* werbeny lekarskiej: kultury kalusowe (a) oraz mikropędowe (b) prowadzone w laboratorium biotechnologicznym Zakładu Botaniki Farmaceutycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego i kultury zawieszinowe w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym (c) prowadzone w laboratorium biotechnologicznym Zakładu Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

optymalizacji warunków hodowli (44). Testowane są następujące warunki hodowli: podstawowy skład podłoża hodowlanego, dodatek różnych kombinacji regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (BA, IBA, NAA, kinetyna – KIN, TDZ), dodatek prekursorów (fenyloalanina, tyrozyna, kwas kawowy), warunki świetlne (światło monochromatyczne, brak światła oraz światło białe), typ kultur (kultury kalusowe i pędowe prowadzone na podłożach agarowych i płynnych) oraz kultury prowadzone w bioreaktorach.

W ramach przeprowadzonych badań z agarowymi kulturami kalusowymi werbeny lekarskiej został opracowany optymalny skład podłoża hodowlanego – podłoże MS zawierające 1 mg/l BA i 1 mg/l IBA (44). Ten skład regulatorów wzrostu sprzyjał wysokim przyrostom biomasy oraz wytwarzaniu związków bioaktywnych, szczególnie werbaskozydu (maksymalnie 2454,12 mg/100 g suchej masy). Zawartość kwasów fenolowych była innego rzędu (maksymalnie 46,02 mg/100 g s.m. – wolne kwasy fenolowe, 141,05 mg/100 g s.m. – związane kwasy fenolowe). Warto podkreślić, że w kulturach *in vitro* oprócz kwasu ferulowego i protokatechowego stwierdzono obecność trzech innych kwasów fenolowych, których obecności nie potwierdzono w ziele rośliny macierzystej: kwasu rozmarynowego, m-kumarowego oraz o-kumarowego (43). W kulturach *in vitro* zawartość werbaskozydu, wolnych i związanych kwasów fenolowych była odpowiednio 3,28; 3,42 oraz 2,12 raza wyższa niż w ziele rośliny macierzystej.

Testowanie warunków świetlnych, w których prowadzone są kultury *in vitro*, jest możliwe dzięki współpracy z zespołem z Zakładu Roślin Ozdobnych Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Badany jest wpływ fluorescencyjnego światła monochromatycznego (promieniowanie UV-A, światło niebieskie, światło czerwone, daleka czerwień, brak światła oraz światło białe – kontrola) oraz światła diod elektroluminescencyjnych (światło czerwone, światło niebieskie oraz ich połączenie w stosunku 70:30%) na przyrosty biomasy oraz akumulację związków bioaktywnych. Najlepsze wyniki uzyskano dla kultur prowadzonych w obecności światła niebieskiego (diody elektroluminescencyjne – LED) oraz połączenia światła czerwonego i niebieskiego w stosunku 70:30%. W tych warunkach w ekstraktach z kultur kalusowych stwierdzono wysoką zawartość werbaskozydu (odpowiednio: 6,72 i 6,02 g/100 g s.m. (publikacja w przygotowaniu)).

Dzięki współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakognozji GUMed prowadzone są badania nad kulturami zawieszinowymi werbeny lekarskiej namnażanymi w instalacjach półtechnicznych o charakterze bioreaktorów. Na obecnym etapie doświadczeń wykorzystywane są urządzenia komercyjne oraz

prototypowe, skonstruowane w ośrodku gdańskim. Dotychczas wykorzystano instalacje balonowe oraz mieszająco-napowietrzające (ryc. 7b). Przeprowadzone do tej pory badania pozwoliły na opracowanie metody prowadzącej do uzyskania wysokiej zawartości werbaskozydu w kulturach hodowanych w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym – ponad 9 g/100 g s.m. (ryc. 7c) (dane nieopublikowane).

W ramach badań przeprowadzonych we współpracy z zespołem Instytutu Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie zbadane zostały właściwości przeciwutleniające ekstraktów z biomasy kultur *in vitro* oraz rośliny macierzystej *V. officinalis*, z zastosowaniem nowoczesnych metod: CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity) oraz QUENCHER-CUPRAC (QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible treatment). Badania wykazały wyższy potencjał przeciwutleniający ekstraktów z kultur zawieszinowych w porównaniu z ekstraktami z ziela rośliny macierzystej (60).

We współpracy z Zakładem Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie przeprowadzono badania aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów metanolowych z biomasy kalusowych kultur agarowych oraz zawieszinowych werbeny lekarskiej w stosunku do 4 szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* i *Listeria monocytogenes*) oraz 8 szczepów bakterii Gram-ujemnych (*Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes* i *Escherichia coli*).

Wszystkie badane ekstrakty wykazywały silne działanie przeciwbakteryjne. Największą aktywność przeciwbakteryjną stwierdzono kolejno dla ekstraktów: z ziela werbeny, z hodowli zawieszinowej oraz z biomasy namnażanej na pożywce agarowej. Bakterie Gram-dodatnie okazały się bardziej wrażliwe na badane ekstrakty niż bakterie Gram-ujemne. Najbardziej oporny na badane ekstrakty był szczep *Escherichia coli* ATCC 25922.

We współpracy z zespołem z Uniwersytetu w Mesynie (Włochy) prowadzone są również badania nad działaniem przeciwgrzybiczym, przeciwapalnym i antyproliferacyjnym ekstraktów z biomasy kultur *in vitro* oraz ziela werbeny lekarskiej rosnącej w glebie.

W 2017 roku w Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej CM UJ założono kultury mikropędowe *V. officinalis*. Po wstępnej optymalizacji warunków prowadzenia kultur planowana jest analiza biomasy pod względem zawartości irydoidów, glikozydów

fenylopropanoidowych oraz kwasów fenolowych w kulturach mikropędowych. Prowadzone będą ponadto analizy olejku eterycznego. Badania te zaplanowano we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakognozji GUMed oraz Katedrą Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej.

Podsumowanie

Ziele werbeny lekarskiej (*Verbenae herba*) to stosunkowo nowy farmakopealny surowiec obecny w oficjalnym lecznictwie europejskim, w tym w lecznictwie polskim. Badania aktywności biologicznej ekstraktów z tego surowca prowadzone w ostatnich latach potwierdzają znane od dawna jego zastosowania w tradycyjnym lecznictwie. Badania takie prowadzone są w ośrodkach naukowych na całym świecie, m.in. w Niemczech, Austrii, Hiszpanii, Turcji, Egipcie, Etiopii, Pakistanie, Indiach, Japonii, Chinach oraz w Polsce.

Zainteresowanie werbeną lekarską wynika nie tylko z faktu występowania tego gatunku na wszystkich kontynentach, lecz przede wszystkim ze względu na jego walory lecznicze. Udowodniony, bardzo zróżnicowany skład chemiczny surowca (irydoidy, glikozydy fenylopropanoidowe, flawonoidy, terpeny, kwasy fenolowe, obecność olejku eterycznego) decyduje o jego cennych właściwościach biologicznych, m.in. przeciwutleniających, przeciwdrobnoustrojowych, przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych. Skład chemiczny werbeny warunkuje ponadto ważną pozycję tego gatunku w przemyśle spożywczym i kosmetycznym.

Prowadzone kultury *in vitro* werbeny lekarskiej mogą w przyszłości, po dalszej optymalizacji, stanowić alternatywne źródło pozyskiwania cennych w lecznictwie, a także w produkcji żywności i kosmetyków, biologicznie aktywnych związków.

Piśmiennictwo

1. Thomé OW, Migula W. Prof. Dr. Thomé's Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, in Wort und Bild, für Schule und Haus. F.E. Köhler, Gera-Untermhaus 1885.
2. Türker A, Yücesan B, Gürel E. Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Verbena officinalis* L., a medicinal plant. Turk J Biol 2010; 34:297-304.
3. Xu W, Xin F, Sha Y i wsp. Two new secoiridoid glycosides from *Verbena officinalis*. J Asian Nat Prod Res 2010; 12:649-53.
4. Liu Z, Xu Z, Zhou H i wsp. Simultaneous determination of four bioactive compounds in *Verbena officinalis* L. by using high-performance liquid chromatography. Pharmacogn Mag 2012; 4(8):162-5.
5. Pluhár Z, Tulok M, Németh É i wsp. Selection of *Verbena officinalis* lines with high polyphenol producing ability. Acta Hort 2010; 860:181-6.
6. Barnes J, Anderson LA. Herbal medicines. London 2007.
7. *Verbena herba*. W: Farmakopea Polska. Wyd X; Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych. Wyd. Pol Tow Farm, Warszawa 2014; 1643-5.
8. *Verbena herba*. W: European Pharmacopoeia 6.0. Wyd Eur Director Quality Med, Strasburg 2008; 3188-9.
9. Rehecho S, Hidalgo O, García-Iñiguez de Cirano M i wsp. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. LWT – Food Sci Technol 2011; 44(4):875-82.
10. Miraj S, Kiani S. Study of pharmacological effect of *Verbena officinalis* Linn: A review. Der Pharm Lett 2016; 8(9):321-5.
11. Anioł J, Kwiatkowski S, Berdowski W. Rośliny lecznicze. Wyd Arkady, Warszawa 1993.
12. Taxonomy Browser; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (dostęp z dnia: 29.12.2017).
13. Ahmed D, Chaudhary MA, Raza A i wsp. Comparative study of antibacterial activity and mineral contents of various parts of *Verbena officinalis* Linn. Asian J Chem 2012; 24(1):68-72.
14. Ghazanfar SA. Handbook of Arabian medicinal plants. CRC Press 1994.
15. O'Leary N, Múlgura M E, Morrone O. Revisión taxonómica de las especies del género *Verbena* (*Verbenaceae*). II: Serie *Verbena* 1. Ann Missouri Bot Gard 2010; 97(3):365-424.
16. Neson GL. Infrageneric classification of *Verbena* (*Verbenaceae*). Phytoneuron 2010; 2010(11):1-15.
17. Kanaya T, Saito H, Hayashi Y i wsp. Heavy-ion beam-induced sterile mutants of verbena (*Verbena hybrida*) with an improved flowering habit. Plant Biotechnol 2008; 25(1):91-6.
18. Strzelecka H, Kowalski J. Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wyd Nauk PWN, Warszawa 2000.
19. Ruzicka J, Lukas B, Merza L i wsp. Identification of *Verbena officinalis* based on ITS sequence analysis and RAPD-derived molecular markers. Planta Med 2009; 75(11):1271-6.
20. van Wyk BE, Wink M. Rośliny lecznicze świata. MedPharm Polska 2008.
21. Macku J, Krejca J. Atlas roślin leczniczych. Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Warszawa 1989.
22. Abebe M, Abebe A, Mekonnen A. Assessment of antioxidant and antibacterial activities of crude extracts of *Verbena officinalis* Linn root or atuch (Amharic). Chem Int 2017; 3(2):172-84.
23. Lai SW, Yu MS, Yuen WH i wsp. Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from *Verbena officinalis* Linn. Neuropharmacol 2006; 50(6):641-50.
24. Broda BJM. Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych trujących i użytkowych. Wyd Lek PZWL, Warszawa 1985.
25. Khan AM, Qureshi R, Qaseem MF i wsp. Floristic Checklist of District Kotli, Azad Jammu Kashmir. Pak J Bot 2015; 47(5):1957-68.
26. Khan AW, Khan AU, Ahmed T. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative activities of *Verbena officinalis*. Front Pharmacol 2016; 7:5.
27. Senderski ME. Prawie wszystko o ziołach. Wyd I. Podkowa Leśna 2004.
28. Podbielkowski Z, Sudnik-Wójcikowska B. Słownik Roślin Urzytkowych. Wyd VI. PWRiL, Warszawa.

29. Schönbichler SA, Bittner LKH, Pallua JD i wsp. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 84(January):97-102.
30. De Martino L, Arena GD, Minervini MM i wsp. Active caspase-3 detection to evaluate apoptosis induced by *Verbena officinalis* essential oil and citral in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Brazilian J Pharmacogn* 2011; 21(5):869-73.
31. De Martino L, D'Arena G, Minervini MM i wsp. *Verbena officinalis* essential oil and its component citral as apoptotic-inducing agent in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22(4):1097-104.
32. Shu J, Chou G, Wang Z. Two new iridoids from *Verbena officinalis* L. *Molecules* 2014; 19(7):10473-9.
33. Verma VK, Siddiqui NU. Bioactive chemical constituents from the plant *Verbena officinalis* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; 3(4):108-9.
34. Duan K, Yuan Z, Guo W i wsp. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract. *J Ethnopharmacol* 2011; 135(2):201-8.
35. Shu JC, Liu JQ, Chou GX. A new triterpenoid from *Verbena officinalis* L. *Nat Prod Res* 2013; 27(14):1293-7.
36. Deepak M, Handa SS. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother Res* 2000; 14(6):463-5.
37. Zhang Y, Jin H, Qin J i wsp. Chemical constituents from *Verbena officinalis*. *Chem Nat Compd* 2011; 47(2):319-20.
38. Jiang WL, Zhang SP, Zhu HB i wsp. Cornin ameliorates cerebral infarction in rats by antioxidant action and stabilization of mitochondrial function. *Phyther Res* 2010; 24(4):547-52.
39. Encalada MA, Rehecho S, Ansorena D i wsp. Antiproliferative effect of phenylethanoid glycosides from *Verbena officinalis* L. on colon cancer cell lines. *LWT – Food Sci Technol* 2015; 63(2):1016-22.
40. Bilia ARR, Giomi M, Innocenti M i wsp. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46(3):463-70.
41. Calvo MI, San Julian A, Fernández M. Identification of the major compounds in extracts of *Verbena officinalis* L. (*Verbenaceae*) by HPLC with post-column derivatization. *Chromatogr* 1997; 46(5-6):241-4.
42. Sun Y, Wang Y, Cai R i wsp. Identification of the chemical compositions of *Verbena officinalis* L. extract by high performance liquid chromatography-photodiode array-high resolution mass spectrometry. *Chinese J Chromatogr* 2017; 35:987-94.
43. Zhang Z, Pan T. HPLC determination of chlorogenic acid in *Verbena officinalis* L. extract and its *in-vitro* antibacterial activity. *Biomed Res* 2017; 28(9):3996-4001.
44. Kubica P, Szopa A, Ekiert H. Production of verbascoside and phenolic acids in biomass of *Verbena officinalis* L. (*Vervain*) cultured under different *in vitro* conditions. *Nat Prod Res* 2017; 31(14):1663-8.
45. Shamsardakani M, Mosaddegh M, Shafaati A. Volatile constituents from the aerial part of *Verbena officinalis* L. (*Vervain*). *Iran J Pharm Res* 2010; 2(1):39-42.
46. Zoubiri S, Baaliouamer A. Larvicidal activity of two Algerian *Verbenaceae* essential oils against *Culex pipiens*. *Vet Parasitol* 2011; 181(2-4):370-3.
47. Kaur J, Kumar D, Madaan R i wsp. Estimation of isolated triterpenoid – ursolic acid in *Verbena officinalis* L. aerial parts using TLC densitometry. *J Pharm Technol Res Manag* 2014; 2(2):121-35.
48. Mohammed E, Grawish ME, Anees MM. Short-term effects of *Verbena officinalis* Linn decoction on patients suffering from chronic generalized gingivitis: Double-blind randomized controlled multicenter clinical trial. *Quintessence Int (Berl)* 2016; 47(6):491-9.
49. Kou W, Yang J, Yang Q i wsp. Study on *in-vivo* anti-tumor activity of *Verbena officinalis* extract. *African J Tradit Complement Altern Med* 2013; 10:512-7.
50. EFSA. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. 2010; No. 8:1489.
51. CosIng - Cosmetics - GROWTH - European Commission. <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results> (dostęp z dnia: 27.12.2017).
52. Calvo MI. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(3):380-2.
53. Casanova E, García-Mina JM, Calvo MI. Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. leaves. *Plant Foods Hum Nutr* 2008; 63(3):93-7.
54. Speroni E, Cervellati R, Costa S i wsp. Effects of differential extraction of *Verbena officinalis* on rat models of inflammation, cicatrization and gastric damage. *Planta Med* 2007; 73(3):227-35.
55. Rashidian A, Kazemi F, Mehrzadi S i wsp. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Verbena officinalis* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. *J Evid Based Complement Altern Med* 2017; 22(4):632-6.
56. Makino Y, Kondo S, Nishimura Y i wsp. Hastatoside and verbenalin are sleep-promoting components in *Verbena officinalis*. *Sleep Biol Rhythms* 2009; 7(3):211-7.
57. Jawaid T, Imam SA, Kamal M. Antidepressant activity of methanolic extract of *Verbena officinalis* Linn. plant in mice. *Asian J Pharm Clin Res* 2015; 8(4):308-10.
58. Ekiert H. Farmaceutyczne aspekty biotechnologii roślin. Cz. I. Wprowadzenie – metodyka i główne kierunki badawcze *Biotechnol* 2009; 65:69-77.
59. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; 15(3):473-97.
60. Dziurka M, Szopa A, Kubica P i wsp. *In vitro* cultures of some medicinal plant species (*Cistus × incanus*, *Verbena officinalis*, *Scutellaria lateriflora*, *Scutellaria baicalensis*) as a rich potential source of antioxidants – evaluation by CUPRAC and QUENCHER-CUPRAC assays. *Acta Pharm under rev.*

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 27.07.2018

zaakceptowano/accepted: 09.08.2018

Adres/address:

*mgr Paweł Kubica

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej

Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

tel.: +48 660-411-207

e-mail: p.kubica@uj.edu.pl