

**Agnieszka Maria Bazylko**

# **Autoreferat**

*Załącznik nr 2*



**Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny**

Warszawa 2015

## 1. Agnieszka Maria Bazylko

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

**Dyplom magistra farmacji** uzyskany 7 września 1995 roku na podstawie obronionej pracy magisterskiej pt.: „Badania pięciu gatunków z rodzaju *Rumex* dostarczających surowca *Radix Lapathi acuti*” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Akademii Medycznej w Warszawie. Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Halina Strzelecka, opiekun: mgr Katarzyna Miłkowska.

**Stopień doktora nauk farmaceutycznych** w specjalności farmakognozja nadany 3 grudnia 2003 uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. „Opracowanie metod standaryzacji preparatów zawierających ziele bądź wyciągi z ziela tymianku” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji. Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Halina Strzelecka, recenzenci: Prof. dr hab. n. farm. Maria Wolbiś, dr hab. n. farm. Olga Olszowska. Praca doktorska wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

W Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie: Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego) pracuję od 01.09.1995, początkowo na stanowisku inżynierjno-technicznym, od 01.02.1997 na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego, a od 01.03.2004 do chwili obecnej na stanowisku adiunkta.

### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

#### a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Wykorzystanie metod chromatograficznych w analizie fitochemicznej, oraz badanie aktywności przeciwutleniającej, przeciwzapalnej i fotoprotekcyjnej wybranych substancji roślinnych.**

**b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa**

**H1.** Bazylko A.\*, Kiss A.K., Kowalski J., Densitometric determination of flavonoids in methanolic and aqueous extracts of *Epilobii angustifolii herba* by use of HPTLC. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2007, 20(1), 53-56 (IF<sub>2007</sub> - **0,683**; MNiSW - **20**)

**H2.** Bazylko A.\*, Kiss A.K., Kowalski J., High-performance thin-layer chromatography method for quantitative determination of oenothein B and quercetin glucuronide in aqueous extract of *Epilobii angustifolii herba*. Journal of Chromatography A, 2007, 1173(1-2), 146-150 (IF<sub>2007</sub> - **3,641**; MNiSW - **32**)

**H3.** Bazylko A., Tomczyk M., Flazińska A., Lęgas A., Chemical fingerprint of *Potentilla* species by using HPTLC method. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2011, 24 (5), 441-444 (IF<sub>2011</sub> - **0,767**; MNiSW - **20pkt**)

**H4.** Bazylko A.\*, Stolarczyk M., Derwińska M., Kiss A.K., Determination of antioxidant activity of extracts and fractions obtained from *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga quadriradiata* herb, and qualitative study of the most active fractions using TLC and HPLC method. Natural Product Research, 2012, 26 (17), 1584-1593 (IF<sub>2012</sub> - **1,031**; MNiSW - **20pkt**)

**H5.** Bazylko A.\*, Piwowarski J.P., Filipek A., Bonarewicz J., Tomczyk M., *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta* and its main ellagitannin, agrimoniin. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 149(1), 222-227 (IF<sub>2013</sub> - **2,939**; MNiSW - **40pkt**)

**H6.** Bazylko A.\*, Granica S., Filipek A., Piwowarski J., Stefańska J., Osińska E., Kiss A.K., Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. Industrial Crops and Products, 2013, 50, 88-94 (IF<sub>2013</sub> - **3,208**; MNiSW - **40pkt**)

**H7.** Bazylko A.\*, Parzonko A., Jeż W., Osińska E., Kiss A.K., Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. Industrial Crops and Products, 2014, 55, 19-24 (IF<sub>2014</sub> - **2,837**; MNiSW - **40pkt**)

**H8.** Bazylko A.\*, Boruc K., Borzym J., Kiss A.K., Aqueous and ethanolic extracts of *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga ciliata*. Investigations of caffeic acid derivatives and flavonoids by HPTLC and HPLC-DAD-MS methods. Phytochemistry Letters, 2015, 11, 394-398 (IF<sub>2014</sub> - **1,450**; MNiSW - **20pkt**)

**H9.** Bazylko A.\*, Borzym J., Parzonko A., Determination of in vitro antioxidant and UV-protecting activity of aqueous and ethanolic extracts from *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga quadriradiata* herb; Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology, 2015, 149, 189-195 (IF<sub>2014</sub> - **2,960**; MNiSW - **25**).

\* - prace w których byłam autorem korespondencyjnym

Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) publikacji wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi 19,516, punkty MNiSW - 257

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Na rynku farmaceutycznym jest obecnie znaczna liczba preparatów zawierająca surowce roślinne (wg. nomenklatury w Ustawie z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne. Art.2 p.33a, substancje roślinne, której to nazwy dla ujednoczenia będę używała w moim autoreferacie) lub wyciągi z nich otrzymane. Obserwowany od kilkunastu lat powrót zainteresowania lekiem roślinnym związany jest przede wszystkim z przekonaniem o jego całkowitym bezpieczeństwie. Przeżywające renesans leki roślinne cieszą się ogromną popularnością wśród pacjentów, także ze względu na ich łatwą dostępność. W dużej części sceptyczne w stosunku do leku naturalnego jest natomiast środowisko lekarskie. Główną przyczyną takiego stanu jest wciąż zbyt mała wiedza poparta badaniami, pomimo ogromnej pracy wielu ośrodków. Nadal wiele substancji roślinnych istnieje na rynku na zasadzie tradycyjnego zastosowania.

Lek roślinny według dzisiejszych wymagań powinien posiadać dobrze poznany skład chemiczny, udokumentowane: zwalidowanymi metodami zawartość składników czynnych oraz działanie farmakologiczne.

Złożony skład chemiczny roślin, ciągle izolowane związki o nowej strukturze, powodują problemy natury badawczej, zwłaszcza z ustaleniem zależności działanie-skład. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, iż w przypadku większości substancji roślinnych ich efekt terapeutyczny jest wypadkową aktywności kilku związków, lub grup związków.

Wydaję się, więc mieć uzasadnienie jak najgłębsze poszerzenie wiedzy na temat substancji roślinnych, co pomoże w dokładniejszym ustaleniu wskazań do stosowania, dawkowania, a także formy leku.

Istnieje wiele metod, które pozwalają na oznaczenie zawartości grup substancji chemicznych (sumy związków) obecnych w roślinach, są to głównie metody spektrofotometryczne lub kolorymetryczne. Metody te są do tej pory wykorzystywane do standaryzowania substancji roślinnych, między innymi wg wymagań Farmakopei Polskiej IX. Pomimo tego uważane są one za metody obarczone błędami, dające zaniżone, a częściej zawyżone wyniki.

Drugą grupą metod są metody separacyjne, głównie chromatografia. Metody te wykorzystywane są do oceny składu, tworzenia tzw. profili chromatograficznych (fingerprint) oraz oznaczania ilościowego pojedynczych substancji chemicznych zawartych w roślinach. Metody chromatograficzne takie jak chromatografia gazowa czy wysokosprawna chromatografia cieczowa są metodami cenionymi i szeroko stosowanymi w badaniach analitycznych, także substancji roślinnych. Szczególnie po wprowadzeniu detektorów masowych, które pozwalają na jeszcze szerszą analizę składu badanych

mieszanin. Jednak nowoczesna chromatografia cienkwarstwowa nie odbiega od ww. metod, zastosowana zwłaszcza do profilowania chemicznego, wyjątkowo ważnego dla skomplikowanych mieszanin jakimi są substancje roślinne. Przy obecnej dostępności płytkek pokrytych adsorbentami o różnej polarności oraz udoskonaleniu aparatury badawczej, rozdzielczość, precyzja (powtarzalność i odtwarzalność), dokładność i odporność metody bardzo wzrosły.

Istotną grupą substancji roślinnych są substancje, które mają wskazania do stosowania w stanach zapalnych różnego pochodzenia. Na rynku dostępnych jest dużo preparatów zawierających substancje o takiej aktywności, dobrze przebadane, które poza badaniami składu, standaryzacją na składniki aktywne, mają również szereg badań, w tym badania kliniczne, udowadniające ich działanie (Dell'aghi i in., 2013; Di Lorenzo i in., 2013; Gautam i Jachak, 2009; Vogl i in., 2013; Wang i in., 2013). Jednakże istnieje spora grupa roślin, z których pozyskiwane substancje są niedostatecznie przebadane. Wiele z nich jest dostępnych na rynku, raczej jako ludowe remedia, często uprawiane w domowych ogródkach i polecane przez sąsiadkę, zielarza lub na stronach internetowych. Ważne jest, więc poznanie ich składu, opracowanie metod pozwalających na ich standaryzację, a także badania aktywności w celu próby odpowiedzi na pytanie czy tradycyjne stosowanie jest uzasadnione z naukowego punktu widzenia.

Stan zapalny jest to patologiczny stan, w którego rozwoju jedną z głównych ról odgrywają reaktywne formy tlenu (RFT). W odpowiedzi na egzogenne czynniki, przenikające do organizmu ludzkiego, stymulowane są neutrofile i makrofagi, które migrują do miejsca stanu zapalnego. Oksydaza NADPH usytuowana w błonie komórkowej neutrofilii (w warunkach fizjologicznych nieaktywna), jest aktywowana pod wpływem czynników prozapalnych. Flawoproteina ta jest enzymem katalizującym wytwarzanie dużych ilości anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ), który jest przekształcany w nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) przez dysmutazę ponadtlenkową. Nadtlenek wodoru, z kolei, stanowi substrat w reakcji Fentona tworzenia rodnika hydroksylowego ( $HO\cdot$ ). Z nadtlenku wodoru pod wpływem mieloperoksydazy powstaje również kwas chlorowy (I) ( $HClO$ ). Z tych rodników powstaje wiele wysoce reaktywnych cząsteczek, znanych jako reaktywne formy tlenu (RFT) i reaktywne formy azotu (RNS). RFT i RNS są naturalną bronią przeciw szkodliwym czynnikom zewnętrznym dostającym się do organizmu (Darley-Usmar i Halliwell, 1996; Halliwell, 1987; Pacher i in., 2007). Z drugiej jednak strony atakują i uszkadzają również zdrowe komórki organizmu powodując rozprzestrzenianie się reakcji zapalnej (Babior i in., 2000., Demiryürek i Wadsworth, 1999; Miller, 1996; Nath i in., 2000). Reaktywne formy tlenu (RFT) wchodzą łatwo i w sposób nieprzewidywalny w reakcje ze związkami wewnątrz komórek: tłuszczami, białkami czy kwasami nukleinowymi. Powoduje to ich utlenianie, przekształcanie a nawet rozpad, prowadzący do tworzenia się szkodliwych metabolitów i zaburzeń ich aktywności biologicznej. Zmiany te powodują zapoczątkowanie patologicznych procesów w komórkach, mogących skutkować rozwojem

schorzeń takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, choroby układu krwionośnego, choroby przewodu pokarmowego, choroby neurodegeneracyjne, choroby układu oddechowego, zapalenie kłębuszków nerkowych, cukrzyca, odgrywają również rolę w procesie nowotworowym, a ponadto mogą powodować uszkodzenia i choroby skóry (Bartosz 2000; Demiryürek 1999; Turan 2000).

Należy zauważyć, że RFT mogą również powodować degradację kwasu hialuronowego o dużej masie cząsteczkowej, przeciwzapalnego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej. Pośród czynników odpowiedzialnych za degradację hialuronianu wymieniane są hialuronidazy (Stern i in., 2006).

W procesie zapalnym poza RFT neutrofile uwalniają także inne związki prozapalne, które są dla nich czynnikami chemotaktycznymi m.in.: interleukinę IL8 oraz leukotrien LTB<sub>4</sub>, eikozanoid powstający z kwasów tłuszczowych pod wpływem aktywności lipooksygenaz (LOX). W procesie zapalnym aktywacji ulega również cyklooksygenaza-2 (COX2), której działanie obok cyklooksygenazy-1 (COX1), aktywnej w warunkach fizjologicznych, prowadzi do powstawania prostanoidów: prostaglandyn (PG), prostacyklin (PC) i tromboksanów (TXA). Spośród prostanoidów m.in. PGE<sub>2</sub> i PGE<sub>3</sub> są czynnikami prozapalnymi.

Jednym z czynników powodujących wytwarzanie wolnych rodników w organizmie człowieka jest światło słoneczne. Dociera ono do różnych warstw skóry, i one są najbardziej narażone na negatywne skutki nadmiernego przebywania na słońcu. Światło słoneczne składa się z fal od promieniowania ultrafioletowego (UVR) przez podczerwień do światła widzialnego. Najbardziej szkodliwe dla skóry jest promieniowanie ultrafioletowe, które jest podzielone na trzy kategorie, zależne od długości fali: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) i UVC (100-280 nm). Podczas gdy UVC jest absorbowane w większości przez warstwę ozonową i prawie nie dociera do Ziemi, UVA i UVB, oprócz pozytywnych oddziaływań może również działać niekorzystnie na organizmy żywe. UVA wnika w głąb naskórka i skóry właściwej, a odpowiedzią na endogenny czynnik w postaci światła są, inicjowane w komórkach, procesy utleniania. Po wystawieniu na działanie promieniowania UVA, wytwarzane są reaktywne formy tlenu (RFT), które mogą powodować uszkodzenie w komórkach białek, lipidów i węglowodanów. UVB działa głównie w naskórkowej warstwie skóry, ale jest bardziej genotoksyczne i około 1000 razy bardziej zdolne do powodowania oparzeń słonecznych niż UVA. Prowokuje produkcję wolnych rodników i wywołuje znaczący spadek przeciwutleniaczy w skórze, co jest przyczyną zmniejszenia zdolności skóry do ochrony przed działaniem wolnych rodników generowanych po ekspozycji na światło słoneczne. Poza innymi rodnikami, głównie wytwarzany jest tlen singletowy, wzbudzona forma tlenu, która jest bardzo silnym utleniaczem ze stosunkowo długim okresem trwania. Jednakże, w mniejszych ilościach wytwarzany jest anionorodnik ponadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), a następnie w reakcji dysmutacji - nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Długotrwałe narażenie na UVR prowadzi do fotostarzenia skóry,

immunosupresji, powstawania zmian nowotworowych czy zaostrzenia fotodermatoz (Halliwell, 1987; Maverakis i in., 2010; Svobodova i in., 2006).

Wśród czynników, które chronią skórę przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego wymieniane są przeciwutleniacze, również substancje pochodzenia naturalnego oraz związki polifenolowe izolowane z roślin (Afaq, 2011; Jansen i in., 2013; Nichols i Katiyar, 2010; Saewan i Jimtaisong, 2013; Stevanato i in., 2014; Svobodova i in., 2003; Terra i in., 2015).

Głównymi założeniami badawczymi mojej pracy były:

- poznanie składu, opracowanie metod pozwalających na potwierdzanie tożsamości wybranych substancji roślinnych, oraz zwalidowanych metod oznaczania zawartości substancji chemicznych w nich obecnych. Badania moje ukierunkowane były głównie na związki polifenolowe takie jak flawonoidy, kwasy fenolowe i ich pochodne oraz garbniki,
- zbadanie aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej wybranych substancji roślinnych, mających wskazania do stosowania w stanach zapalnych,
- zbadanie zdolności fotoprotekcyjnych wyciągów z ziela nasturcji większej i ziela żółticy, poprzez zbadanie hamowania wytwarzania reaktywnych form tlenu w fibroblastach skóry ludzkiej po naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym.

#### **Wybrane do badań substancje roślinne**

Wszystkie badane substancje roślinne są stosowane w medycynie tradycyjnej, nie mają/miały jednak dostatecznie poznanego składu, a jeśli nawet, brakowało metod analitycznych do ich standaryzacji. Ponadto pomimo wymienianych w literaturze zastosowań w stanach zapalnych o różnej etiologii, badania potwierdzające takie działanie przez wybrane substancje roślinne były szczątkowe, albo nie było ich wcale.

#### ***Epilobium angustifolium* L. (*Chamerion angustifolium* (L.) Scop.), Onagraceae – wierzbownica koprzyca (wierzbówka koprzyca)**

Opisane w literaturze substancje chemiczne występujące w badanym gatunku to: aglikony flawonoidowe (kemferol, kwercetyna, 8-*O*-metoksykemferol, mirycetyna), glikozydy flawonoidowe (glikozydy kemferolu, tylirozyd (3-*O*-(6''-*p*-kumaroilo)-glukozyd kemferolu), glikozydy kwercetyny, 6''-galoilo-3-*O*-galaktozyd kwercetyny, glikozydy mirycetyny, 3-*O*-(6''-galoilo)-galaktozyd mirycetyny), kwasy fenolowe i ich pochodne (kwasy – kawowy, ferulowy, elagowy, *p*-kumarowy, cynamonowy, wanilinowy, gentyzynowy, syryngowy, protokatechowy, galusowy, izowaloneikowy, kawoilochinowe, *p*-kumaroilochinowe, feruilochinowe, galusan metylu, ester metylowy kwasu *p*-metoksygalusowego, galusan oktylu, dilakton kwasu waloneikowego, apilobamid A, dilakton kwasu monodekarboksylwaloneikowego, ( $\alpha,\beta$ )-<sup>4</sup>C<sub>1</sub>-glukozyd dilaktonu 2-*O*-galoilo-3-*O*-waloneilowego), garbniki i ich pochodne (oenoteina B, oenoteina A, 6-*O*-galoiloglukoza, 1,6-di-*O*-galoiloglukoza, 2,3-di-*O*-galoiloglukoza, 1,2,6-tri-*O*-

galoiloglukoza, 1,2,3,6-tetra-*O*-galoiloglukoza, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoiloglukoza, 1,2,3-tri-*O*-galoilo-4,6-HHDP-glukoza, 2,3-di-*O*-galoilo-4,6-HHDP-glukoza), sterole (cholesterol, kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol i jego estry), kwasy tłuszczowe, triterpeny (kwas oleanolowy, kwas ursolowy), tokoferole, aminokwasy, kwas askorbowy, cholina.

Przetwory z *Epilobium* tradycyjnie polecane są w dolegliwościach związanych z przerostem i stanami zapalnymi gruczołu krokowego. Mają działanie przeciwzapalne i przeciwobrzękowe, oraz potwierdzone badaniami *in vitro* działanie antyproliferacyjne (Granica i in., 2014).

### ***Potentilla* sp., Rosaceae – pięciornik**

Badania obejmowały następujące gatunki z rodzaju pięciornik: *Potentilla anserina* L., *Potentilla argentea* L., *Potentilla erecta* (L.) Raeusch., *Potentilla fruticosa* L. (*Dasiphora fruticosa* (L.) RYDB.), *Potentilla grandiflora* L., *Potentilla nepalensis* Hook var. Miss Willmott, *Potentilla recta* L., *Potentilla rupestris* L. (*Drymocallis rupestris* (L.) Soják), *Potentilla thuringiaca* Bernh. ex Link.

Opisane w literaturze substancje chemiczne występujące w badanych gatunkach to: aglikony flawonoidowe (kemferol, kwercetyna, mirycetyna, 7,3',4'-trimetoksykwercetyna), glikozydy flawonoidowe (7-*O*- $\beta$ -glukozyd apigeniny, ternifloryna (7-*O*-(*p*-kumaroilo)-*O*- $\beta$ -D-glukozyd apigeniny), 7-*O*- $\beta$ -glukozyd luteoliny, glikozydy kemferolu, tylirozyd, 8-metoksy-3-*O*- $\beta$ -D-soforozyd herbacetyny (3-*O*- $\beta$ -D-soforozyd 8-metoksykemferolu), glikozydy kwercetyny, 6"-galoilo-3-*O*- $\beta$ -D-galaktozyd kwercetyny, glikozydy mirycetyny, 7-*O*- $\beta$ -D-glukozyd naryngeniny, glikozydy ramnetyny, glikozydy izoramnetyny, izosalipurpozyd (2'-*O*- $\beta$ -D-glukozyd 2',4',6',4-tetrahydroksychalkonu), antocyjany i flawan-3,4-diole (cyanidyna, leukodelfinidyna, glikozydy cyjanidyny, (+)-katechinę, (+)-galokatechinę, (-)-epigalokatechinę, galusan (-)-epigalokatechiny), kwasy fenolowe i ich pochodne kwasy - benzoesowy, *p*-hydroksybenzoesowy, protokatechowy, galusowy, wanilinowy, gentyzynowy, *p*-hydrokifynylooctowy, *p*-kumarowy, kawowy, ferulowy, synapinowy, chlorogenowy, elagowy, 4-*O*- $\beta$ -D-ksylozyd kwasu 3,3'-di-*O*-metoksyelagowego, ester metylowy kwasu brewifolinokarboksyłowego), kumaryny (kumaryna, psolaren, umbelliferon, skopoletyna), karotenoidy ( $\alpha$ - i  $\beta$ - karoten), sterole ( $\beta$ -sitosterol), triterpeny, poliprenole, glikozyd neolignanu (Şöhretoğlu i Kırmızıbekmez, 2011; Tomczyk i Laté, 2009; Tomczyk, 2011).

W Europie, substancje roślinne pozyskiwane z roślin z rodzaju *Potentilla* sp. stosuje się m.in. doustnie w leczeniu stanów zapalnych przewodu pokarmowego, takich jak biegunka. Miejscowo, można je stosować do leczenia stanów zapalnych skóry, oraz jako środki gojące rany (Tomczyk i Laté, 2009). W tradycyjnej medycynie pięciornik wyprostowany służy jako lek ściągający, poprawiający trawienie, działający przeciwzapalnie, przeciwgorączkowo oraz jako środek oczyszczający i tonizujący (Tosun i in., 2006; Popović i in., 2012). Amerykański zielarz Matthew Wood (2008), przedstawia informacje na temat



*P. recta* jako środka przeciwbólowego i gojącego rany. Współczesne badania farmakologiczne rośliny koncentrowały się dotychczas na działaniu przeciwdrobnoustrojowym, oraz działaniu hamującym aktywność ludzkiej reduktazy aldozowej, i aktywność hematologiczną, w tym nie tylko działanie przeciw agregacji płytek lub antykoagulacyjne, ale również właściwości przeciwpróchnicogenne i androgenne (Komar i in., 1981; Enomoto i in.; 2004; Tosun i in., 2006; Tomczyk i in., 2008; Tomczyk i in., 2011).

### ***Tropaeolum majus* L., Tropaeolaceae – nasturcja większa**

Badania fitochemiczne nasturcji większej pozwoliły stwierdzić występowanie w tej roślinie: glukozydnatów (glukotropeolina, która pod wpływem działania enzymu mirozynary rozpada się do izosiarkocyjanianu benzylu), flawonoidów (glikozydy kemferolu i kwercetyny - izokwercytryna), antocyjanów (glikozydy delfinidyny, cyjanidyny i pelargonidyny; w kwiatach pomarańczowych dominuje 3-soforozyd pelargonidyny), karotenoidów (luteina, zeaksantyna,  $\beta$ -karoten), kwasów fenolowych (kwas chlorogenowy), kukurbitacyn i witaminy C (Bruneton, 1999; Garzon i Wrolstad, 2009; Gasparotto Jr. i in., 2009; Niizu i Rodriguez-Amaya, 2005; Strzelecka i Kowalski, 2000; Wojciechowska i Wizner, 1983).

Ziele nasturcji większej wymieniane jest w podręcznikach farmakognozji czy fitoterapii (Bruneton, 1999; Fournier, 1947; Strzelecka i Kowalski, 2000) jako lek na schorzenia dróg oddechowych (angina, bronchit), oraz dróg moczowych. Stosowane jest także zewnętrznie w dermatologii i kosmetologii, do leczenia schorzeń skóry, paznokci i włosów, a także oparzeń m.in. słonecznych oraz pieluszkowego zapalenia skóry (Bruneton, 1999). Jako jeden z głównych kierunków działania ziela wymieniana jest aktywność przeciwdrobnoustrojowa, tłumaczona obecnością izosiarkocyjanianu benzylu (Virtanen, 1969).

Aktywność przeciwko *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella setubal* stwierdzono dla frakcji heksanowej i chloroformowej otrzymanych z 70% etanolowego wyciągu z części nadziemnych nasturcji. Autorzy zbadali także, że 70% wyciąg etanolowy, u myszy albinosów po podaniu doustnym, nie wykazuje działań toksycznych do dawki 5g/kg masy ciała (Zanetti i in., 2003).

Dla izosiarkocyjanianu benzylu stwierdzono również działanie przeciwnowotworowe (Pinato i in., 1995).

Kwiaty nasturcji barwy pomarańczowej wykazały znaczącą aktywność przeciwutleniającą, wobec syntetycznych rodników (ABTS, DPPH) (Garzón i Wrolstad, 2009).

Działanie natriuretyczne i diuretyczne liści nasturcji większej wykazali Gasparotto Jr. i in. (2009). W następnych pracach ten sam zespół stwierdził działanie diuretyczne izolowanej z liści nasturcji izokwercytryny, oraz wykazał również działanie przeciwnadciśnieniowe tych samych wyciągów oraz izokwercytryny. Ponadto, zespół

wykazał brak toksyczności podprzewlekłej, oraz brak (anty)estrogennego lub (anty)androgennego działania, nie stwierdził natomiast wpływu na kurczliwość macicy u szczurów po podaniu wodnoetanolowego wyciągu z ziela nasturcji (Gasparotto Jr. i in., 2011a, 2011b; Gomes i in., 2012.; Lourenço i in., 2012).

Dla izosiarkocyjanianu benzylu oraz substancji roślinnych pozyskiwanych z nasturcji stwierdzono ponadto aktywność przeciwkrzepliwą (Santo i in., 2007; De Medeiros i in., 2000).

### ***Galinsoga* sp., Asteraceae - żółtlca**

Badania obejmowały gatunki: *Galinsoga parviflora* Cav. i *Galinsoga quadriradiata* Ruiz et Pav. (*Galinsoga ciliata* Raf. Blake).

Na podstawie analizy fitochemicznej, wśród związków obecnych w ziele żółtlcy wymieniane są - flawonoidy (patulytryna (7-*O*- $\beta$ -D-glukozyd patuletyny), kwercymerytryna (7-*O*- $\beta$ -D-glukozyd kwercetyny), kwercetagetryna (7-*O*- $\beta$ -D-glukozyd kwercetagetryny), 7- $\beta$ -D-glukozyd luteoliny, 7- $\beta$ -D-glukozyd apigeniny, galinsozyd A (2'-*O*- $\beta$ -D-glukozyd 5'-hydroksy-7-metoksyflawanonu), galinsozyd B (5-*O*- $\beta$ -D-glukozyd 3',4'-dihydroksy-7-metoksyflawanonu), 7,3',4'-trihydroksyflawanon i 3,5,7,3',4'-penta-hydroksyflawanon), kwasy fenolowe i pochodne (kwasy - wanilinowy, izowanilinowy, p-kumarowy, protokatechowy, fumarowy, 3,4-dimetoksy cynamonowy, p-hydroksybenzoesowy, 3,4-dihydroksybenzoesowy, o-hydroksyfenylooctowy, kawowy i kwas chlorogenowy) sterole ( $\beta$ -sitosterol, 7-hydroksy- $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, 7-hydroksy-stigmasterol,  $\alpha$ -spinasterol, 3-*O*- $\beta$ -D-glukozyd  $\beta$ -sitosterolu), alkohole tłuszczowe, alkohole diterpenowe (fitol), aromatyczne estry galinosoaty A-C i galaktoglikolipidy (parwisidy) (Afza i in., 2012; Afza i in., 2014; Chanaj i in., 2007; Ferheen i in., 2009; Mostafa i in., 2013; Plekhanova i in., 1978; Ranilla i in., 2010; Szepczyńska i Wolbiś, 1984; Tariq i in., 2008). Ponadto w olejku eterycznym z liści żółtlcy drobnokwiatowej rosnącej w Kolumbii jako główne składniki zidentyfikowano (*Z*)-3-heksen-1-ol,  $\beta$ -kariofilen i 6-demetoksyageratochrom (Pino i in., 2010), natomiast w olejku ziela egipskiego głównym, dominującym składnikiem był (*Z*)- $\gamma$ -bisabolen (Mostafa i in., 2013).

Ziele żółtlcy stosowane jest jako przeciwzapalne. Wyciągi z tej rośliny są polecane w problemach skórnych, chorobach dermatologicznych, egzemach, liszajach i trudno gojących się ranach (Sarwa, 2001, Strzelecka i Kowalski, 2000). W tradycyjnej medycynie Ugandy, żółtlca drobnokwiatowa służy do leczenia krwawień (Hamill i in., 2000), podczas gdy w Brazylii ekstrakty wodne są stosowane w leczeniu grypy i przeziębień (Agra i in., 2007). Również w medycynie ludowej Kenii, wyciągi z łodyg i liści są używane w leczeniu przeziębień, ale także owrzodzeń. Takie zastosowania zostały częściowo wyjaśnione w badaniach *in vitro* - wyciągi z łodyg i liści *G. parviflora* hamowały aktywność cyklooksygenazy 1 (COX1) i wykazały aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (Matu i Van Staden,

2003). Natomiast badania nad brazylijskimi roślinami leczniczymi wykazały, że wyciąg z liści *G. parviflora* przyspiesza gojenie się ran. Badacze wykazali to, między innymi, za pomocą testu „scratch assay”. Ponadto, badane wyciągi charakteryzowały się bardzo niską cytotoksycznością (Schmidt i in., 2009). Natomiast liście żółtlicy owłosionej stosowane są w medycynie ludowej Etiopii jako remedium po ukąszeniach węży (Giday i in., 2009).

### **Analiza fitochemiczna**

Analiza fitochemiczna stanowiła znaczą część badań opisanych w publikacjach wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym, albo była głównym zagadnieniem ww. prac. Wśród substancji roślinnych, dla których przeprowadziłam badania, a ich wyniki znajdują się w wytypowanych pracach, są: ziele wierzbownicy kiprzycy, kwiaty, liście lub zioła pozyskane z różnych gatunków pięciorników, ziele, liście i kwiaty oraz sok z nasturcji większej, a także zioła pozyskane z żółtlicy drobnokwiatowej i żółtlicy owłosionej.

Metody wykorzystywane przez mnie w badaniach to:

- metody spektrofotometryczne lub kolorymetryczne, do zgrubnej oceny badanych substancji roślinnych,

- metody chromatograficzne: chromatografia cienkowarstwowa, także wysokosprawna (TLC – ang. thin layer chromatography, HPTLC- ang. high performance thin layer chromatography), gazowa (GC – ang. gas chromatography) z detektorem płomieniowo jonizacyjnym (FID - ang. flame ionization detector), oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC - ang. high-performance liquid chromatography), z detektorami: spektrofotometrycznym (UV-Vis), z matrycą diodową (DAD - diode array detector), oraz sprzężoną ze spektrometrią mas (MS – mass spectrometry), ze spektrometrem wyposażonym w analizator typu pułapka jonowa.

Walidację opracowanych metod oznaczania zawartości przeprowadziłam według wymagań International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Geneva (2005); Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).

### ***Epilobium angustifolium* L. (*Chamerion angustifolium* (L.) Scop) – wierzbownica kiprzyca (wierzbówka kiprzyca)**

Materiał do badań został zebrany na terenie północno-wschodniej Polski.

Jednym z moich celów było stworzenie szybkiej, prostej i selektywnej metody rozdzielania glikozydów kwercetyny obecnych w wodnym i metanolowym wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium*, a także porównanie, przy użyciu opracowanej i zwalidowanej metody, ilości ww. związków w badanych ekstraktach. Wybrałam metodę HPTLC jako metodę tanią, szybką a jednocześnie precyzyjną i dokładną. Wzorcowe pochodne kwercetny, przy użyciu których optymalizowałam rozdział to: 3-O-glukuronid kwercetyny,

6"-galoilo-3-O-galaktozyd kwercetyny, hiperozyd, izokwercytryna i kwercytryna. Fazą stacjonarną stosowaną przeze mnie z wyboru jest żel krzemionkowy, i on też był zastosowany w tej analizie jako pierwszy. Jest to adsorbent najpopularniejszy, a co za tym idzie najtańszy, co było jednym z moich założeń. Okazało się, że użycie tego adsorbenta dało dobre rezultaty. Do rozwijania chromatogramów używałam komory poziomej Teflon DS-chamber (Chromdes, Lublin, Poland), która daje dobre wyniki przy rozdziale mieszanin związków flawonoidowych. Po kilku modyfikacjach najlepszy rozdział uzyskałam przy użyciu mieszaniny: octan etylu-kwas mrówkowy-woda (65-2.5-3 v/v/v) jako fazy ruchomej. Powyższy układ faz w połączeniu z odczytem densytometrycznym zastosowałam do oznaczenia zawartości 3-glukuronidu kwercetyny, hiperozydu, izokwercytryny i kwercytryny w badanych wyciągach, gdyż stwierdziłam brak galoilogalaktozydu kwercetyny w wyciągu wodnym. Dominującym związkiem w zespole flawonoidów okazał się 3-glukuronid kwercetyny.

Kontynuacją moich badań nad *Epilobium angustifolium* było opracowanie i zwalidowanie metody oznaczania 3-glukuronidu kwercetyny i oenoteiny B w wyciągu wodnym z ziela wierzbówki kiprzyicy. Jak wykazały moje poprzednie badania, 3-glukuronid kwercetyny jest dominującym flawonoidem w ziele, natomiast oenoteina B jest głównym związkiem odpowiedzialnym za aktywność tej substancji roślinnej. Utrudnieniem był fakt, że związki należą do różnych grup chemicznych (flawonoid i elagotanoid). W przypadku tej analizy także stosowałam metodę HPTLC w połączeniu z densytometrią. Bardziej wymagający okazał się związek garbnikowy, którego plama po rozwijaniu na żelu krzemionkowym była rozmyta i ogonująca, podobnie zachowywał się w czasie rozdziału w komorze poziomej. Dlatego zastosowałam układ faz odwróconych, z żelem modyfikowanym grupami oktadecylowymi (RP18) jako fazą stacjonarną oraz komorę pionową. Mimo wielu prób nie udało mi się rozdzielić związków przy użyciu jednej fazy ruchomej. Oenoteina B dobrze oddzielała się od innych składników wyciągu w fazie 25% acetonitryl w wodzie (+50mM kwasu fosforowego), przy długości drogi rozwijania 8 cm, niestety 3-glukuronid kwercetyny w tych warunkach nie dzielił się i migrował razem z hiperozydem i izokwercytryną. Natomiast ponowne rozwinięcie chromatogramu w 100% acetonitrylu na drodze 4 cm rozdzieliło trzy ww. flawonoidy. W związku z powyższym do oznaczeń ilościowych oenoteiny B i 3-glukuronidu kwercetyny w wyciągu wodnym z ziela *Epilobium angustifolium* użyłam obu faz ruchomych. Oenoteinę B oznaczyłam po zastosowaniu pierwszej opisanej fazy ruchomej, natomiast 3-glukuronid kwercetyny po ponownym rozwinięciu w drugiej opisanej fazie. Opracowaną metodę zwalidowałam wg wymagań ICH. Tę metodę oznaczania oenoteiny B w układzie faz: żel krzemionkowy RP18 i 25% acetonitryl w wodzie (+50mM kwasu fosforowego), zastosowałam także do zbadania jej zawartości w wyciągach z innych gatunków wierzbownic: *E. hirsutum* i *E. parviflorum*. Wyniki tego oznaczenia zamieszczone są w publikacji **11D** (spis zamieszczony na str. 35).

Szczegółowe informacje dotyczące zbioru i identyfikacji materiału roślinnego, przygotowania wyciągów, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacjach **H1** i **H2**. Wyniki prezentowałam także w postaci plakatów na konferencjach naukowych (**13P, 14P, 16P, 17P**) (spis zamieszczony na str. 36).

### ***Potentilla* sp. – pięciornik**

Skład chemiczny rodzaju *Potentilla* jest stosunkowo dobrze poznany, nie było jednak dobrych metod do zastosowania w badaniach tożsamościowych. W moich badaniach podjęłam się opracowania takiej metody/metod dla kilku ww. gatunków pięciorników. Następnie bardziej szczegółowo zajęłam się badaniem jakościowym ziela pięciornika wyprostowanego, gatunku o mniej poznanym składzie.

Materiał do badań uzyskałam dzięki współpracy z dr. hab. Michałem Tomczykiem z Zakładu Farmakognozi, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Współpraca nasza zaowocowała czterema publikacjami, z czego w badaniach opisanych w dwóch z nich pełniłam kluczową funkcję, i te publikacje są włączone do cyklu w moim postępowaniu habilitacyjnym.

Celem pierwszej części moich badań było znalezienie układu faz, który mógłby być stosowany do wykonania profilu chromatograficznego do badań chemotaksonomicznych rodzaju *Potentilla* L.. Do badań wykorzystałam metodę TLC/HPTLC, nacisk położyłam na zastosowanie rozdziału izokratycznego, ponieważ są one zazwyczaj mniej czasochłonne i charakteryzują się lepszą powtarzalnością. Związki użyte do analiz chromatograficznych, wybrałam na podstawie analizy występowania poszczególnych grup związków w nadziemnych częściach roślin z rodzaju *Potentilla* L. na podstawie wcześniej opublikowanych danych literaturowych. Dlatego profil chromatograficzny oparłam głównie o związki flawonoidowe, występujące licznie w tym rodzaju. Z 17. (aglikony i glikozydy flawonoidowe, kwas elagowy i jego pochodne) substancji chemicznych przy użyciu których optymalizowałam rozdziały najciekawszy profil chromatograficzny uzyskałam stosując 10 z nich, w tym 8. glikozydów flawonoidowych. Wstępną zastosowaną fazą stacjonarną był żel krzemionkowy, jednak nie uzyskałam zadowolającego rozdziału pomimo wypróbowania wielu faz. Ciekawy rezultat natomiast otrzymałam przy użyciu żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami diolowymi. Najtrudniejszy okazał się rozdział par związków: izokwercytryna – 7-glukozyd luteoliny, oraz 3-glukuronid kwercetyny - astragalina, który udało mi się uzyskać, po wielu modyfikacjach, w fazie ruchomej: octan etylu-keton metylowoetylowy-eter diizopropylowy-kwas mrówkowy (3-10-4-1 v/v/v/v). Ten układ faz może być wykorzystany jako tzw. fingerprint dla rodzaju *Potentilla* L.

Natomiast badania gatunku *P. recta*, który był do tej pory mało poznany, kontynuowałam przy użyciu metody HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>. Skupiłam się na analizie składu frakcji octanu etylu i eteru etylowego otrzymanych z wyciągu metanolowego, które we wstępnych badaniach aktywności przeciwutleniającej wykazały najsilniejsze działanie.

Do rozdziału wykorzystałam układ faz, który daje dobre rezultaty w separacji związków polifenolowych, szczególnie flawonoidów pochodnych flawonoli. Zastosowałam kolumnę Zorbax SB, 150 mm x 2.1 mm, 1.9 µm (Agilent, CA, USA), która była termostatowana, i utrzymywana w temperaturze 25°C. Fazą ruchomą A była mieszanina: woda-acetonitryl-kwas mrówkowy (95-5-0.1 v/v/v), a fazą B: acetonitryl-kwas mrówkowy (100-0.1 v/v). Do rozdziału zastosowałam gradient: 0-60 min, 1-26% B, przy prędkości przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min. Widma UV-Vis były rejestrowane w zakresie 200-450 nm, a chromatogramy wykreślane przy: 254, 280 i 350 nm. Eluent był bezpośrednio wprowadzany do nebulizatora spektrometru mas wyposażonego w analizator typu pułapka jonowa (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Związki były jonizowane metodą elektrorozpylania i analizowane w trybie jonów ujemnych. Widma fragmentacyjne otrzymywano dla dwóch najbardziej intensywnych jonów w rejestrowanym widmie. Rejestrowano charakterystyczne utraty masy odpowiadające oderwaniu reszt cukrowych (162, 132, 176). W przypadku wykrycia utraty charakterystycznej masy przez związek, rejestrowano widmo fragmentacyjne powstałego aglikonu. Ciśnienie azotu w nebulizatorze było 40 psi; szybkość przepływu gazu 9 L/min; temperatura 300°C; napięcie na kapilarze 4.5 kV. Zakres skanowania stosunku masy do ładunku (m/z) od 200 do 2200.

Podczas gdy we frakcji eteru etylu zidentyfikowałam kwasy fenolowe i ich pochodne, tylirozyd i pochodną katechiny, we frakcji octanu etylu występowały głównie pochodne heksahydroksydifenylu (HHDP) (zidentyfikowane na podstawie porównania z danymi literaturowymi – Hanhineva i in., 2008), obok pochodnych kwercetyny, kemferolu, apigeniny i luteoliny. Szczególnie ciekawą substancją chemiczną okazał się dominujący związek frakcji octanu etylu, który został wyizolowany, a jego struktura potwierdzona badaniami metodą NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C). Zidentyfikowanym związkiem była agrymonina, której obecność opisano już wcześniej w innych gatunkach pięciorników, ale po raz pierwszy w badanym gatunku. Natomiast po raz pierwszy w rodzaju *Potentilla* L. stwierdziłam występowanie pochodnych HHDP.

Izolację i badania struktury agrymoniny przeprowadziłam we współpracy z mgr. Jakubem Piwowarskim z Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM.

Szczegółowe informacje dotyczące zbioru i identyfikacji materiału roślinnego, przygotowania wyciągów i frakcji, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacjach **H3** i **H5**. Wyniki prezentowałam także w postaci plakatów na konferencjach naukowych (**19P**, **23P**) (spis zamieszczony na str. 36).

### ***Tropeolum majus* L. – nasturcja większa**

Materiał do badań uzyskałam z upraw na polach SGGW.

Badania nad nasturcją większą rozpoczęłam od analizy składu i aktywności wyciągów wodnych i wodnoetanolowych otrzymanych z ziela, a następnie zajęłam się sokiem

ze świeżego ziela i wyciągami z, oddzielonej od łodyg, mieszanki liści i kwiatów. Łodygi w przypadku nasturcji zajmują znaczną masę części nadziemnych rośliny, wydało mi się, więc ciekawe porównanie składu i aktywności całego ziela oraz mieszanki liści i kwiatów. W obu substancjach roślinnych oznaczyłam zawartość witaminy C metodą spektrofotometryczną (nasturcja wymieniana jest jako źródło tej witaminy), oraz izosiarkocyanianu benzylu, głównego metabolitu glukotropeoliny, metodą GC-FID. Zawartość kwasu askorbinowego w wyciągach z ziela wynosi: w wyciągach wodnych  $18.77 \pm 0.42$  –  $33.76 \pm 0.54$  mg/g liofilizatu, w wyciągach wodnoetanolowych  $18.96 \pm 0.32$  –  $33.38 \pm 0.59$  mg/g liofilizatu, w zależności od sposobu przygotowania substancji roślinnej (suszenie czy liofilizowanie) i sporządzenia wyciągu (na zimno czy na ciepło), w soku:  $18.1 \pm 0.9$  mg/g liofilizatu, natomiast w wyciągach z liści i kwiatów: w wodnym  $10.3 \pm 0.1$  mg/g liofilizatu, a w wodnoetanolowym  $10.7 \pm 0.2$  mg/g liofilizatu. Bardzo duże różnice w zawartości stwierdziłam dla izosiarkocyanianu benzylu w wyciągach z ziela, w wyciągach z ziela suszonego mieściła się ona w granicach  $7.4 \pm 2.2$  –  $18.4 \pm 0.5$   $\mu\text{g/g}$  liofilizatu, podczas gdy w wyciągach z ziela liofilizowanego  $170.6 \pm 25.1$  –  $277.6 \pm 57.0$   $\mu\text{g/g}$  liofilizatu.

Poza powyższymi oznaczeniami, dla wyciągów z liści i kwiatów oraz soku przeprowadziłam, metodami kolorymetrycznymi, standaryzację na: zawartość flawonoidów oraz całkowitą zawartość polifenoli metodą Folina-Ciocalteu.

Wstępną analizę składu przeprowadziłam przy użyciu metody TLC/HPTLC. Po wypróbowaniu kilku faz stwierdziłam, że interesujący rozdział związków obecnych w wyciągach z ziela otrzymałam przy zastosowaniu układu faz: żel krzemionkowy i octan etylu-kwas octowy-kwas mrówkowy-woda (100-11-11-26  $v/v/v/v$ ) (Wagner i Bladt, 1996). Analiza ta pozwoliła na potwierdzenie, przy zastosowaniu substancji wzorcowych, w badanych wyciągach obecności: kwasu chlorogenowego, izokwercytryny i astragaliny.

Do bliższej analizy składu wyciągów i soku użyłam metody HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>, w warunkach jak przy badaniach frakcji z wyciągu metanolowego z ziela pięciornika wyprostowanego. W testach przeprowadzonych tą metodą, w wyciągach wodnoetanolowych z ziela nasturcji stwierdziłam obecność kwasów kawoilochinowych (m.in. kwasu chlorogenowego), kwasów p-kumaroilochinowych (zidentyfikowane na podstawie porównania z danymi literaturowymi – Clifford i in., 2003). Natomiast flawonoidy (pochodne kwercetyny) były obecne w małej ilości. Dla odmiany w wyciągach wodnych dominowały związki flawonoidowe: pochodne kwercetyny i kemferolu. Obecność kwasów p-kumaroilochinowych w badanym gatunku opisałam po raz pierwszy.

Ponadto przeprowadzone analizy wykazały brak glukotropeoliny w większości badanych ekstraktów, i tylko śladowe jej ilości zaobserwowałam w wyciągu wodnoetanolowym otrzymanym na ciepło z ziela suszonego.

Szczegółowe informacje dotyczące materiału roślinnego, przygotowania wyciągów i soku, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam

w publikacjach **H6** i **H7**. Wyniki prezentowałam także w postaci plakatu na konferencji naukowej (**22P**) (spis zamieszczony na str. 36).

### **Galinsoga sp. - żółtlica**

Materiał do badań został zebrany niedaleko Góry Kalwarii (woj. mazowieckie, Polska).

Do analizy składu zastosowałam metody HPLC-DAD oraz HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>. W obu badaniach optymalizowałam rozdział zawartych w mieszaninach związków. Ostatecznie w metodzie HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> zastosowałam kolumnę Zorbax SB, 150 mm x 2.1 mm, 1.9 μm column (Agilent, CA, USA), która była termostatowana, i utrzymywana w temperaturze 25°C. Fazą ruchomą A była mieszanina: woda-acetonitryl-kwas mrówkowy (95-5-0.1 v/v/v), a fazą B: acetonitryl-kwas mrówkowy (100-0.1 v/v). Do rozdziału zastosowałam gradient: 0-30 min, 1-30% B, przy prędkości przepływu 0,2 mL/min. Parametry detekcji zastosowałam takie jak przy badaniach frakcji z wyciągu metanolowego z ziela pięciornika wyprostowanego.

Badając wyciągi z ziela żółtlicy już we wstępnych analizach HPLC-DAD stwierdziłam, że pomimo iż w literaturze pośród polifenoli wymieniane są głównie flawonoidy (patulytryna, kwercytagetryna i kwercymerytryna) oraz wolne kwasy fenolowe, w badanych przeze mnie frakcjach otrzymanych z wyciągu metanolowego, obok flawonoidów, w dużej ilości obecne były połączenia kwasu kawowego. Dopiero dzięki możliwości zastosowania detektora masowego, już w trakcie badań wyciągów wodnych i etanolowych, udało się stwierdzić, że są to połączenia kwasu kawowego z kwasem glukarowym, do tej pory rzadko opisywane w literaturze. Zidentyfikowałam cztery mono-, pięć di- i trzy trikawoiloglukarowe pochodne, na podstawie porównania z danymi literaturowymi (Maas i in., 2009; Ruiz i in., 2014; Schwaiger i in., 2005). Badania te ujawniły także brak różnic w składzie jakościowym pomiędzy badanymi gatunkami.

W drugiej części moich badań zajęłam się opracowaniem metody, która mogłaby być wykorzystana do profilowania chemicznego badanych gatunków żółtlicy. Ponieważ w moich badaniach stwierdziłam, że główną grupą związków tych substancji roślinnych są pochodne kwasu kawowego, na nich oparłam rozdziały. Jako wzorce użyłam kwasów: kawowego i chlorogenowego, substancji obecnych w badanych wyciągach, a poza tym ogólnie dostępnych. Po wypróbowaniu kilku układów faz, oraz ich modyfikacjach najlepszy rozdział uzyskałam przy zastosowaniu układu: żel krzemionkowy oraz octan etylu-keton metylowoetylowy-kwas mrówkowy-woda (30-9-3-3 v/v/v/v). Układ ten może być wykorzystany jak fingerprint rodzaju *Galinsoga*.

W wyciągach wodnych i etanolowych z dwóch badanych gatunków, których analizą zajęłam się bardziej wnikliwie oznaczyłam zawartość flawonoidów oraz kwasu kawowego i jego pochodnych (kwasy kawoiloglukarowe i kawoilochinowe) przy użyciu metody HPLC-DAD w opisanych powyżej warunkach. Najwyższą zawartość flawonoidów stwierdziłam w wyciągu etanolowym z *G. parviflora* (685.4 ± 69.6 mg Q\*g<sup>-1</sup>), podczas gdy najwyższą zawartość sumy kwasu kawowego i jego pochodnych w wyciągu wodnym z *G.*



*parviflora* ( $44.3 \pm 2.7$  mg ChA\* $g^{-1}$ ). Wyciągi etanolowe z obu gatunków charakteryzowały się dużą zawartością flawonoidów (ponad 60%), a w ekstraktach wodnych zawartość flawonoidów i suma kwasu kawowego i jego pochodnych była podobna (około 4%).

Szczegółowe informacje dotyczące zbioru i identyfikacji materiału roślinnego, przygotowania wyciągów i frakcji, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacjach **H4**, **H8** i **H9**. Wyniki prezentowałam także w postaci plakatów na konferencjach naukowych (**15P**, **25P**, **27P**) (spis zamieszczony na str. 36).

**Badania aktywności przewutleniającej i przeciwzapalnej substancji roślinnych pozyskanych z gatunków: *Tropaeolum majus* L. (ziele, liście i kwiaty oraz sok), *Potentilla recta* L. (ziele) oraz *Galinsoga parviflora* Cav. (ziele) i *Galinsoga quadriradiata* Ruiz et Pav (ziele)**

Drugim kierunkiem moich zainteresowań było zbadanie aktywności przeciwzapalnej substancji roślinnych, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwutleniającej jako jednego ze składników odpowiedzi w stanach zapalnych.

W świetle przedstawionych danych w celu zdobycia jak największej wiedzy w tym temacie przeprowadziłam badania aktywności przeciwutleniającej zarówno na modelach bezkomórkowych, jak i komórkowych, na ludzkich neutrofilach.

W badaniach bezkomórkowych wykorzystałam następujące testy:

- zdolność wymiatania syntetycznego, stabilnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrozylowego (DPPH•) oznaczałam metodą Choi i in. (2002),
- zdolność wymiatania anionorodnika nadadtlenkowego  $O_2^{\cdot-}$ , generowanego bezkomórkowo w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa, oznaczałam metodą Choi i in. (2002), zmodyfikowaną przez Kiss i in. (2010). Aby ocenić stopień inhibicji oksydazy ksantynowej, aktywność enzymu oznaczano przez monitorowanie wytwarzania kwasu moczowego (Schepetkin i in., 2009),
- zdolność wymiatania kwasu chlorowego (I) (HClO) oznaczałam metodą Ching i in. (1994), zmodyfikowaną do warunków bezkomórkowych przez Czerwińska i in. (2012),
- zdolność wymiatania nadttlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) oznaczałam metodą O'Dowd i in. (2004), zmodyfikowaną przez Kiss i in. (2010),
- zdolność wymiatania tlenku azotu ( $NO^*$ ) oznaczałam metodą Chung i in. (2001), zmodyfikowaną przez Czerwińska i in. (2012),
- zdolność wymiatania nadttlenoazotynu ( $ONOO^*$ ) oznaczałam metodą Van Dyke i in. (2000), zmodyfikowaną przez Czerwińska i in. (2012),
- zdolność hamowania utleniania kwasu linolowego oznaczałam metodą Choi i in. (2002).

Na neutrofilach, izolowanych z krwi obwodowej zdrowych ochotników (stacja krwiodawstwa), oznaczany był stopień hamowania wytwarzania RFT czyli hamowanie stresu oksydacyjnego po stymulacji neutrofilii f-MLP (N-formylowany peptyd - Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine), metodą chemiluminescencji zależnej od luminolu (Kiss

i in., 2010).

Ponadto zbadałam wpływ na aktywność enzymów takich jak hialuronidaza, metodą wg Farmakopei Amerykańskiej zmodyfikowaną przez Piwowarski i in. (2011), oraz lipooksygenaza, metodą opracowaną przeze mnie na podstawie Sigma Enzymatic Assay of Lipoxidase (EC 1.13.11.12). Obie metody zostały dostosowane do oznaczeń w małych, do 200  $\mu$ L, objętościach. Wpływ na aktywność cyklooksygenaz oznaczałam natomiast przy użyciu testu COX Inhibitor Screening Assay firmy Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) wg przepisu producenta.

Substancjami dla których przeprowadziłam badania aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej są: ziele pięciornika wyprostowanego, ziele oraz liście i kwiaty nasturcji większej oraz zioła pozyskane z żółtlicy drobnokwiatowej i żółtlicy owłosionej.

### ***Potentilla recta* L. – pięciornik wyprostowany**

Gatunek pięciornik wyprostowany jest substancją roślinną stosowaną w lecznictwie ludowym, jednak miał słabo poznany skład, a także brak było doniesień, które uzasadniałyby zastosowanie go m.in. w stanach zapalnych. Dlatego poza badaniami składu, opisanymi w poprzedniej części, przeprowadziłam badania właściwości przeciwutleniających i przeciwzapalnych wyciągów i frakcji otrzymanych z ziela *P. recta*. Przetestowałam zdolność wymiatania rodników: DPPH,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  i HClO, oraz wpływ na aktywność hialuronidazy i lipooksygenazy. We wszystkich przeprowadzonych testach aktywność wyciągów i frakcji była zależna wprost proporcjonalnie od zastosowanego stężenia.

Najwyższą aktywność wymiatającą DPPH,  $H_2O_2$  (statystycznie znamienne wyższą od innych badanych wyciągów i frakcji) oraz HClO zaobserwowałam dla frakcji octanu etylu ( $SC_{50} \pm SEM$  [ $\mu$ g/mL] =  $25.4 \pm 2.5$ ,  $1.8 \pm 0.2$  i  $8.5 \pm 1.2$ , odpowiednio). Jedynie w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa frakcja eteru dietylowego była aktywniejsza od frakcji octanu etylu ( $SC_{50} \pm SEM$  [ $\mu$ g/mL] =  $6.6 \pm 1.3$  i  $8.6 \pm 1.4$ , odpowiednio). Frakcje te miały również najsilniejsze działanie hamujące aktywność oksydazy ksantynowej, w zależności od stężenia (w zakresie 5-125  $\mu$ g/mL) procent produkcji kwasu moczowego wynosił od 93.77 do 18.22% dla frakcji octanu etylu oraz od 98.35 do 25.29% dla frakcji eteru dietylowego. Na podstawie tych wyników można wywnioskować, że frakcja eteru dietylowego ma silniejsze działanie wymiatające  $O_2^{\cdot-}$ , podczas gdy frakcja octanu etylu silniej hamuje aktywność oksydazy ksantynowej.

Interesujące wyniki aktywności przeciwutleniającej badanych frakcji skłoniły mnie do przeprowadzenia testu na płytce chromatograficznej przy zastosowaniu DPPH jako wywoływacza. Okazało się, że we frakcji octanu etylu za działanie odpowiada głównie jeden związek, po dokładniejszych badaniach i izolacji (opisane w cz. Analiza fitochemiczna) stwierdziłam, że związkiem tym jest agrymonina. Dla niej również przeprowadziłam analizy właściwości przeciwutleniających i przeciwzapalnych. Agrymonina, podobnie jak frakcja octanu etylu, wymiatiała najsilniej  $H_2O_2$  ( $SC_{50} \pm SEM$  =

0,20±0,01 µM), a w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa także wykazywała efekt hamowania aktywności enzymu.

Aktywność enzymów hialuronidazy i lipooksygenazy najsilniej hamowała frakcja octanu etylu (IC<sub>50</sub>±SEM [µg/mL] = 12.99±1.31 i 86.31±5.46, odpowiednio. Agrymonina również znacząco hamowała aktywność enzymatyczną lipooksygenazy (IC<sub>50</sub> = 36.47±1.29 µM), a zwłaszcza hialuronidazy (IC<sub>50</sub> = 2.65±0.40 µM).

Otrzymane wyniki częściowo tłumaczą skuteczność wyciągów z ziela pięciornika wyprostowanego w stanach zapalnych.

Szczegółowe informacje dotyczące zbioru i identyfikacji materiału roślinnego, przygotowania wyciągów i frakcji, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacji **H5**. Wyniki prezentowałam także w postaci plakatów na konferencjach naukowych (**23P, 24P**) (spis zamieszczony na str. 36).

### ***Tropaeolum majus* L. – nasturcja większa**

Ziele nasturcji jest stosowane ze względu na aktywność przeciwdrobnoustrojową izosiarkocyanianiu benzylu. W moich badaniach zajmowałam się wyciągami wodnymi oraz wodnoetanolowymi z ziela oraz liści i kwiatów, a także sokiem ze świeżego ziela. Wyciągi wodne z ziela, suszonego i liofilizowanego otrzymane na ciepło i zimno, zostały przebadane w kierunku działania mikrobiologicznego we współpracy z dr Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Żaden z badanych wyciągów nie wykazał takiej aktywności.

Ciekawsze było wskazanie do stosowania ziela nasturcji w stanach zapalnych skóry. Dlatego podjęłam się określenia aktywności przeciwutleniającej oraz przeciwzapalnej badanych wyciągów i soku. Wymiatanie stabilnego rodnika DPPH przez wszystkie badane wyciągi, a także sok było słabe, przy stężeniu 100µg/mL wyciągi z ziela wymiatały ten rodnik w około 13-20%, podczas gdy wyciągi z liści i kwiatów oraz sok w około 24-37%. Najsilniejszą aktywność wszystkie badane wyciągi wykazały wobec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jednakże wyciągi z ziela działały silniej, a ich SC<sub>50</sub>±SEM [µg/mL] mieściło się w granicach 14.9±3.1-38.6±9.3, podczas gdy SC<sub>50</sub>±SEM [µg/mL] wyciągu wodnego z liści i kwiatów wyniosło 87.6±24.7, a wyciągu wodnoetanolowego 68.5±16.3. Co ciekawe sok prawie wcale nie wykazywał aktywności wymiatającej H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wykazał natomiast znaczną aktywność wymiatającą O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (SC<sub>50</sub>±SEM = 60.4±2.0 µg/mL). Podobnie do soku działały wyciągi z liści i kwiatów, SC<sub>50</sub>±SEM [µg/mL] dla wyciągu wodnego i wodnoetanolowego wyniosło 57.6±4.7 i 51.2±5.8, odpowiednio. Przy czym stwierdziłam brak wpływu na oksydazę ksantynową wszystkich badanych wyciągów i soku. Wobec HClO wykazałam praktycznie brak aktywności w przypadku wszystkich badanych wyciągów, a także soku.

Dla wyciągów z ziela poza działaniem wymiatającym RFT badałam także stopień wymiatania RNS, tlenku azotu - NO<sup>•</sup> i nadtlenoazotynu – ONOO<sup>-</sup>. Wszystkie badane wyciągi wykazały silną aktywność wymiatającą RNS, ich SC<sub>50</sub>±SEM [µg/mL] mieściło się w granicach 4.54±0.26-10.90±1.39 (aktywność wymiatająca NO<sup>•</sup>) i 2.49±1.50-6.37±1.86

(aktywność wymiatająca ONOO<sup>-</sup>).

Ostatnim badaniem aktywności przeciwutleniającej była analiza wpływu na stres oksydacyjny w ludzkich neutrofilach. Zarówno wyciągi z ziela jak i liści i kwiatów oraz sok wykazały aktywność zmniejszająca stres oksydacyjny, jednak silniejsze okazały się wyciągi wodny i wodnoalkoholowy otrzymane z liści i kwiatów.

We wszystkich przeprowadzonych testach aktywność wyciągów była zależna wprost proporcjonalnie od zastosowanego stężenia, nie zaobserwowałam natomiast korelacji pomiędzy zawartością flawonoidów i polifenoli (opisane w Analiza fitochemiczna), a działaniem przeciwutleniającym dla wyciągów z liści i kwiatów oraz soku, korelacja taka była tylko w badaniu wpływu na stres oksydacyjny w neutrofilach.

Natomiast w przeprowadzonych testach badających wpływ na aktywność enzymów hialuronidazy i lipooksygenazy wykazałam brak działania badanych wyciągów z ziela, natomiast stwierdziłam hamowanie COX1 przez te wyciągi pomiędzy 29 a 68%, przy stężeniu 50 µg/mL.

Szczegółowe informacje dotyczące materiału roślinnego, przygotowania wyciągów i soku, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacjach **H6** i **H7**.

### ***Galinsoga* sp. - żółtlica**

Pomimo kilku doniesień, które mogą tłumaczyć zastosowanie wyciągów z ziela żółtlicy w stanach zapalnych, nie było badań aktywności przeciwutleniającej wyciągów otrzymywanych z ziela. W lecznictwie częściej stosowana jest żółtlica drobnowiatowa (*G. parviflora* Cav.), niż żółtlica owłosiona (*G. quadriradiata* Ruiz et Pav.) pomimo, że skład chemiczny, co potwierdziły moje badania, działanie i zastosowanie obu gatunków jest podobne.

W pierwszej części badałam aktywność przeciwutleniającą wyciągów metanolowych (Gp i Gq), oraz metanolowych oczyszczonych chloroformem (Gp2 i Gq2), a także frakcji otrzymanych z wyciągów metanolowych metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE - ang. solid-phase extraction) używając kolumnkę wypełnioną żelem krzemionkowym z grupami oktadecylowymi. Jako rozpuszczalniki zastosowałam wodę oraz metanol o coraz wyższych stężeniach (GpH<sub>2</sub>O, GqH<sub>2</sub>O, Gp20, Gq20, Gp50, Gq50, Gp70, Gq70, Gp100 i Gq100). Analizy te obejmowały badania działania wymiatającego DPPH i O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, oraz hamującego utlenianie kwasu linolowego. Wyniki pokazują, że ekstrakty z ziół *G. parviflora* i *G. quadriradiata* działały wymiatająco na rodniki, jak i hamująco utlenianie kwasu linolowego, w sposób zależny wprost proporcjonalnie od zastosowanego stężenia. Największą zdolność do wychwytywania DPPH (SC<sub>50</sub>±SEM = 6.78±0.94 µg/mL) miała frakcja Gp20. Jednak frakcje GqH<sub>2</sub>O, GpH<sub>2</sub>O, Gq20, Gp20, Gp50 oraz Gq50 też wykazały silne działanie. W teście zdolności zmiatania O<sub>2</sub><sup>•-</sup> wyciągi pierwotne (Gq, Gp, Gq2, Gp2) wykazały silniejszą aktywność w porównaniu do frakcji, w stężeniu 10 µg/mL wymiatały 42-44% rodnika. Natomiast frakcją o najwyższej aktywności była Gp50, dla której wartość

SC50±SEM wyniosła 30.6±3.1 µg/mL. Zdolność hamowania utleniania kwasu linolowego mierzono tylko dla frakcji wykazujących najwyższą aktywność w poprzednich testach. Najaktywniejsza była frakcja GpH<sub>2</sub>O (IC50±SEM = 6.86±1.31 µg/mL), frakcja GqH<sub>2</sub>O wykazała porównywalną aktywność.

Analizę zdolności wymiatających O<sub>2</sub>•- przeprowadziłam także dla wyciągów, którymi zajmowałam się w drugiej części badań, czyli wodnego i etanolowego otrzymanych z obu badanych gatunków żółtlic. Dla tych wyciągów zbadałam ponadto zdolność wymiatania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Badane ekstrakty wykazują aktywność przeciwutleniającą zależną wprost proporcjonalnie od zastosowanego stężenia. W obu testach wyciągi wodne z obu badanych gatunków *Galinsoga* były bardziej aktywne niż wyciągi etanolowe. Badane ekstrakty wykazały znacznie wyższą aktywność wymiatania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SC50±SEM [µg/mL] najsilniejszego wyciągu czyli wodnego z ziela *G. parviflora* wyniosło 1.84±0.59, niż wymiatania O<sub>2</sub>•-, SC50±SEM [µg/mL] najsilniejszego wyciągu czyli wodnego z ziela *G. quadriradiata* wyniosło 18.65±2.70. Test na produkcję kwasu moczowego wykazał, że aktywność ekstraktów w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa jest związane wyłącznie z efektem wymiatania rodnika, a nie hamują one aktywności enzymu.

Szczegółowe informacje dotyczące zbioru i identyfikacji materiału roślinnego, przygotowania wyciągów i frakcji, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacjach **H4** i **H9**. Wyniki prezentowałam także w postaci plakatu na konferencji naukowej (**15P**) (spis zamieszczony na str. 36).

#### **Badania aktywności hamującej wytwarzanie wolnych rodników tlenowych oraz aktywności fotoprotekcyjnej liści i kwiatów *Tropaeolum majus* L. oraz ziela *Galinsoga parviflora* Cav. i ziela *Galinsoga quadriradiata* Ruiz et Pav**

Badania przeprowadzałam na fibroblastach skóry ludzkiej (NHDF). Wykorzystałam następujące testy:

- test redukcji soli tetrazolowej (MTT) do nierozpuszczalnego formazanu, oceniający aktywność oksydacyjną mitochondriów komórki, a więc mówiący nam o stopniu toksyczności badanych wyciągów, pomiary wykonywano na czytniku mikropłytek,
- test LDH (dehydrogenaza mleczanowa), w teście tym ocenia się ilość LDH, która przeszła do środowiska po uszkodzeniu ściany komórkowej, a więc śmierci komórki, służy on także do oceny stopnia toksyczności badanych wyciągów, pomiary wykonywano na czytniku mikropłytek,
- test przy użyciu diocjanu dichlorofluoresceiny (DCFH<sub>2</sub>-DA) oceniający procent RFT w komórce. Fluorescencja była mierzona przy użyciu czytnika mikropłytek, lub przy użyciu cytometru przepływowego,
- barwienie aneksyną i jodkiem propidyny (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit), test ten pozwala ocenić stopień apoptozy/nekrozy komórek. Fluorescencja była mierzona przy użyciu cytometru przepływowego.

W badaniach analizowałam aktywność wyciągów wodnych i wodnoalkoholowych z liści i kwiatów oraz soku z nasturcji większej, a także wyciągi wodne i alkoholowe z ziela żółtlicy owłosionej i ziela żółtlicy drobnokwiatowej. Do badań wybrałam takie wyciągi (niefrakcjonowane), wodne i etanolowe, ponieważ tego typu wyciągi są najczęściej stosowane w medycynie tradycyjnej, a ponadto wykazały ciekawą aktywność przeciwutleniającą w testach bezkomórkowych.

### ***Tropaeolum majus* L. – nasturcja większa**

Ponieważ nasturcja polecana jest w dermatologii i kosmetologii, do leczenia schorzeń skóry, paznokci i włosów, a także oparzeń m.in. słonecznych, wyciągi i sok z niej otrzymane wybrałam do badań na fibroblastach. Aby stwierdzić stopień toksyczności przeprowadziłam test LDH. Badania nie wykazały cytotoksyczności badanych ekstraktów/soku, a nawet niewielki, ale statystycznie znamieny wpływ cytoprotekcyjny wyciągu wodnego (w stężeniu 25 µg/mL) i soku (w stężeniach 25 i 50 µg/mL). Kolejny etap badań miał na celu analizę stopnia ochrony przed promieniowaniem oraz stopnia hamowania produkcji RFT w komórkach po naświetlaniu UVA i UVB. W komórkach traktowanych UVA nie stwierdziłam istotnych różnic w uwalnianiu LDH pomiędzy badanymi wyciągami/sokiem a próbą kontrolną. Jednakże, po naświetlaniu UVB wyciągi/sok we wszystkich badanych stężeniach wykazały zależne od dawki, statystycznie znamienne działanie cytoprotekcyjne. Najsilniej działał wyciąg wodnoalkoholowy, który przy stężeniu 100 µg/mL hamował uwalnianie LDH do środowiska o ok. 30% w porównaniu do kontroli. Stwierdziłam również hamowanie przez badane wyciągi/sok wytwarzania RFT wywołanego przez naświetlanie UVA, jak i przez naświetlanie UVB. Badane wyciągi oraz sok (100 µg/mL) obniżyły ilość produkowanych RFT po naświetlaniu UVA o 10-20%, a po naświetlaniu UVB o 37-51%, w porównaniu do kontroli. Chroniąca komórki aktywność badanych wyciągów/soku jest prawdopodobnie po części związana z hamowaniem wytwarzania RFT.

Wyniki moich badań częściowo tłumaczą zastosowanie wyciągów z nasturcji większej w leczeniu oparzeń słonecznych, ale także leczeniu innych schorzeń skóry m.in. pieluszkowego zapalenia skóry.

Szczegółowe informacje dotyczące materiału roślinnego, przygotowania wyciągów i soku, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacji H7.

### ***Galinsoga* sp. - żółtlica**

Ze względu na stosowanie wyciągów z tych roślin w problemach skórnych i chorobach dermatologicznych, do badań na fibroblastach wybrałam także wyciągi wodne i etanolowe otrzymane z ziela *G. parviflora* i ziela *G. quadriradiata*.

W teście oceny funkcji mitochondriów z użyciem MTT stwierdziłam, że inkubacja komórek w obecności wodnych wyciągów z obu badanych gatunków *Galinsoga*,

w statystycznie znamionym stopniu, zapobiegała obniżeniu aktywności proliferacyjnej komórek stwierdzonej po napromieniowaniu UVA i UVB, w stopniu zależnym od stężenia. Efekt ten był widoczny zarówno, gdy komórki inkubowano z wyciągami wodnymi przed, po, jak również przed i po naświetlaniu promieniowaniem UV. Zupełnie odmienny wpływ wywierały wyciągi etanolowe: przy niskim stężeniu wykazywały korzystną aktywność ochronną podobną do ekstraktów wodnych, jednak w stężeniach 50-200 µg/mL obserwowano jeszcze większe zahamowanie aktywności proliferacyjnej komórek, niż jedynie po napromieniowaniu UV. Działanie to obserwowane było niezależnie od tego, kiedy komórki inkubowano z wyciągami, ale w przypadku napromieniowania UVB było znacznie wyższe niż w przypadku promieniowania UVA.

W badaniach przy użyciu testu LDH, podobnie jak w przypadku testu MTT, zaobserwowałam, że inkubacja komórek w obecności wyciągów wodnych z obu gatunków zmniejszała efekt cytotoksyczny UVA i UVB, w statystycznie znamionym, zależnym od stężenia sposób. Również podobnie jak przy użyciu testu MTT, wyciągi etanolowe nasilały działanie cytotoksyczne promieniowania UV, obserwowany efekt był silniejszy w przypadku promieniowania UVA.

Ze względu na wyniki wcześniejszych badań przeprowadziłam próby barwienia aneksyną/jodkiem propidyny w celu oceny stopnia apoptozy/nekrozy komórek. W przeprowadzonych testach wyciągi wodne zapobiegały apoptozie fibroblastów wywołanej przez promieniowanie UVA i UVB w statystycznie znamionym, zależnym od stężenia sposób. Wyciągi alkoholowe działały zmiennie w zależności od rodzaju promieniowania, a także w zależności od tego, czy komórki inkubowano w obecności ekstraktów przed, po, czy równocześnie przed i po naświetlaniu. Napromieniowanie promieniami UVA komórek inkubowanych w obecności wyciągów alkoholowych przed i po naświetlaniu, spowodowało niewielkie, lecz statystycznie znamienne zwiększenie odsetka komórek w fazie wczesnej i późnej apoptozy. Po inkubacji komórek w obecności tych wyciągów przed naświetlaniem UVA obserwowano nawet większy wzrost odsetka komórek w fazie wczesnej i późnej apoptozy, a po inkubacji przed naświetlaniem UVB wzrósł odsetek komórek w późnym stadium apoptozy. Natomiast podczas inkubacji komórek z badanymi wyciągami alkoholowymi po naświetlaniu promieniami UVA jak i UVB stwierdzono silny wzrost odsetka komórek nekrotycznych.

Hamowanie przez badane wyciągi, zarówno wodne jak i alkoholowe, wytwarzania RFT wywołanego przez naświetlanie UVA było silne, statystycznie znamienne w porównaniu do kontroli i wprost proporcjonalne do zastosowanego stężenia.

W przypadku promieniowania UVB hamowanie produkcji RFT przez wyciągi wodne z obu gatunków *Galinsoga* było słabsze niż w przypadku promieniowania UVA. Natomiast wyciągi alkoholowe w niskich stężeniach nasilały produkcję RFT w komórkach.

Silniejsza aktywność wyciągów wodnych hamująca produkcję RFT przez fibroblasty może być związana z większą zawartością kwasów kawoiloglukarowych (opisane

w Analiza fitochemiczna). Natomiast aktywność cytotoksyczna wyciągów alkoholowych może być związana z obecnością związków lipofilnych, nieobecnych w wyciągach wodnych. Wśród związków o takim charakterze, obecnych w częściach nadziemnych *Galinsoga*, wymieniane są między innymi alkohole tłuszczowe, sterole, alkohole diterpenowe (fitol) i galaktoglikolipidy (parwizydy).

We wszystkich przeprowadzonych testach nie zaobserwowałam statystycznie znamiennej różnicy w sile działania wyciągów pomiędzy oboma badanymi gatunkami żółtlicy.

Szczegółowe informacje dotyczące zbioru i identyfikacji materiału roślinnego, przygotowania wyciągów, stosowanej metodyki oraz uzyskanych wyników wykonanych badań zamieściłam w publikacji **H9**.

### **Najważniejsze osiągnięcia**

- opracowanie i zvalidowanie metod oznaczania: flawonoidów, oraz oenoteiny B jednocześnie z glukuronidem kwercetyny w wyciągach z ziela *Epilobium angustifolium*,
- opracowanie chromatograficznych układów faz, które mogą być wykorzystane do profilowania chemicznego rodzaju *Potentilla* (metoda HPTLC), oraz rodzaju *Galinsoga* (metoda HPTLC i metoda HPLC),
- stwierdzenie obecności, izolacja i potwierdzenie struktury agrymoniny z ziela *Potentilla recta*; stwierdzenie obecności pięciu pochodnych heksahydroksydifenylu w ziele *Potentilla recta*; stwierdzenie obecności trzech połączeń kawoilochinowych i trzech połączeń p-kumaroilochinowych w ziele *Tropaeolum majus*; stwierdzenie obecności czterech połączeń monokawoiloglukarowych, pięciu połączeń dikawoiloglukarowych i trzech połączeń trikawoiloglukarowych w ziele *Galinsoga parviflora* i ziele *G. quadriradiata*,
- stwierdzenie znacznej aktywności przeciwutleniającej: frakcji octanu etylu i eteru etylowego z metanolowego wyciągu otrzymanego z ziela *P. recta*, oraz izolowanej z niego agrymoniny; wyciągów wodnych i wodnoetanolowych z liści i kwiatów *Tropaeolum majus*; oraz wyciągów wodnych i etanolowych z ziela *Galinsoga parviflora* i ziela *G. quadriradiata*,
- stwierdzenie działania hamującego aktywność enzymów (hialuronidazy, lipooksygenazy i oksydazy ksantynowej) frakcji octanu etylu z metanolowego wyciągu otrzymanego z ziela *P. recta* oraz agrymoniny,
- stwierdzenie aktywności cytoprotekcyjnej i fotoprotekcyjnej wyciągów wodnych i wodnoetanolowych z liści i kwiatów *Tropaeolum majus* oraz soku ze świeżego ziela nasturcji,
- stwierdzenie aktywności cytoprotekcyjnej i fotoprotekcyjnej wyciągów wodnych z ziela *Galinsoga parviflora* i ziela *G. quadriradiata*.



Badania przeprowadziłam we współpracy z zespołem Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM, oraz dr. hab. Michałem Tomczykiem z Zakładu Farmakognozji, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Prof. dr hab. Ewą Osińską z Katedry Roślin Warzywnych i Leczniczych SGGW w Warszawie, i dr Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM.

Prace badawcze, których wyniki zamieszczone są w wyszczególnionych publikacjach, były finansowane dzięki wsparciu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach prowadzonych projektów badawczych: projektu młodego badacza przyznanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny na lata 2005-2006 (nr 03 FW 25/WB/2005-2006), którego byłam kierownikiem, oraz tematu statutowego Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM „Weryfikacja molekularnej i farmakologicznej aktywności naturalnych związków pochodzenia roślinnego o znaczeniu profilaktycznym w chorobach cywilizacyjnych”. W badaniach wykorzystywałam aparaturę Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT) zakupioną z dotacji Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego "Innowacyjna Gospodarka" na lata 2007-2013.

## PIŚMIENNICTWO

- Afaq F., Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 508(2), 144-151.
- Afza N., Malik A., Yasmeen S., Ali M.I., Ferheen S., Tareen R.B., Parvisides A and B, new glucosides from *Galinsoga parviflora*. Natural Product Communication, 2014, 9(8), 1171-1172.
- Afza N., Yasmeen S., Ferheen S., Malik A., Ali M.I., Kalhor M.A., Ifzal R., New aromatic esters from *Galinsoga parviflora*. Journal of Asian Natural Products Research, 2012, 14, 424-428.
- Agra M.F., Baracho G.S., Nurt K., Brasilio I.J.L.D., Coelho V.P M., Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraibano, Brazil. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 111(2), 383-395
- Bartosz G., *Druga twarz tlenu – wolne rodniki w przyrodzie*. PWN, Warszawa, 2004.
- Bruneton J., *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. wyd. 2. Intercept Ltd., Tec&Doc, Lavoisier Publishing Inc., Paryż, 1999.
- Chanaj J., Sikorska M., Matławska I., Analiza chromatograficzna kwasów fenolowych w gatunkach: *Galinsoga parviflora* Cav. oraz *Galinsoga ciliata*. Herba Polonica, 2007, 53, 2.
- Ching T.-L., Jong J., Bast A., A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to asthmatic drugs. Analytical Biochemistry, 1994, 218, 377-381.
- Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H., Kim S.K., Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science 2002, 163, 1161-1168.
- Chung H. Y., Choi H. R., Park H. J., Choi J. S., Choi W. C., Peroxynitrite scavenging cytoprotective activity of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether from the marine alga *Symphyclocladia latiuscula*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49, 3614-3621.
- Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N., Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51, 2900-2911.

- Czerwińska M., Kiss A. K., Naruszewicz M., A comparison of antioxidant activities of oleuropein its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry*, 2012, 131, 940–947.
- De Medeiros J.M.R., Macedo M., Constancia J.P., Nguyen C., Cunningham G., Miles D.H., Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 72 (1-2), 157-165.
- Dell'agli M., Di Lorenzo C., Badea M., Sangiovanni E., Dima L., Bosisio E., Restani P., Plant food supplements with anti-inflammatory properties: a systematis review (I). *Critical reviews in food science and nutrition*, 2013, 53(4), 403-413.
- Demiryürek A.T., Wadsworth R.M., Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacology and Therapeutics*, 1999, 84 (3), 355-365.
- Di Lorenzo C., Dell'agli M., Badea M., Dima L., Colombo L., Sangiovanni E., Restani P., Bosisio E., Plant food supplements with anti-inflammatory properties: a systematis review (II). *Critical reviews in food science and nutrition*, 2013, 53(5), 507-516.
- Enomoto S., Okada Y., Güvenc A., Erdurak C.S., Coşkun M., Okuyama T., Inhibitory effects of traditional Turkish folk medicine on aldose reductase (AR) and hematological activity, and on AR inhibitory activity of quercetin-3-O-methyl ether isolated from *Cistus laurifolius* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27, 1140-1143.
- Ferheen S., Ur-Rehman A., Afza N., Malik A., Iqbal L., Azam Rasool M., Irfan Ali M., Bakhsh Tareen R., Galinsosides A and B, bioactive flavanone glucosides from *Galinsoga parviflora*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2009, 24, 1128-1132.
- Fournier P. pod red., *Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tom I-III*. Paul Lechevalier, Paryż, 1947.
- Garzón G.A., Wrolstad R.E., Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry*, 2009, 114 (1), 44-49.
- Gasparotto Jr. A., Boffo M.A., Lourenço E.L.B., Stefanello M.E.A., Kassuya C.A.L., Marques M.C.A., Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (*Tropaeolaceae*) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122 (3), 517-522.
- Gasparotto Jr. A., Gasparotto F.M., Boffo M.A., Lourenço E.L.B., Crestani S., Stefanello M.E.A., Salvador M.J., da Silva-Santose J.E., Marques M.C.A., Kassuya C.A.L., Diuretic potassium - sparing effect of isoquercitrin - An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011a, 134, 210-215.
- Gasparotto Jr. A., Gasparotto F.M., Lourenço E.L.B., Crestani S., Stefanello M.E.A., Salvador M.J., da Silva-Santose J E., Marques M.C.A., Kassuya C.A.L., Antihypertensive effects of isoquercitrin extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011b, 134, 363-372.
- Gautam R., Jachak S.M., Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, 2009, 29(5), 767-820.
- Giday M., Asfaw Z., Woldu Z., Medicinal plants of the Meinit ethnic group of Ethiopia: An ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 124(3), 513-521.
- Gomes C., Lourenço E. L. B., Liuti E. B., Duque A. O., Nihi F., Lourenço A.C., Mendes T. C., Gasparotto Jr, A., Dalsenter P.R., Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 142, 481-487.
- Granica S., Piwowarski J.P., Czerwińska M.E., Kiss A.K., *Phytochemistry, pharmacology and*

- traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 156, 316-346.
- Halliwell B., Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB Journal*, 1987, 1(5), 358-364.
- Hamill F. A., Apio S., Mubiru N. K., Mosango M., Bukonya-Ziraba R., Maganyi O. W., Soejarto D. D., Traditional herbal drugs of southern Uganda, I. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 70(3), 281-300.
- Hanhineva K., Rogachev I., Kokko H., Mintz-Oron S., Venger I., Kärenlampi S., Aharoni A., Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. *Phytochemistry*, 2008, 69, 2463-2481.
- Jansen R., Wang S.Q., Burnett M., Osterwalder U., Lim H.M.. Photoprotection. Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(6) (2013), 853e1-853e12.
- Kiss A. K., Filipek A., Czerwińska M., Naruszewicz M., *Oenothera paradoxa* defatted seeds extract its bioactive component penta-o-galloyl- $\beta$ -d-glucose decreased production of reactive oxygen species inhibited release of leukotriene b4, interleukin-8, elastase, myeloperoxidase in human neutrophils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 9960-9966.
- Komar V.V., Gritsiuk Y.G., Kit S.M., Sishchuk L.V., Sischuk V.M., A study of the androgenous action of extracts of medicinal herbs of Podolye, Poliessye and Capathians. *Farmatsevtichnyi Zhurnal*, 1981, 5, 49-52.
- Lourenço E. L. B., Muller J.C., Boareto A.C., Gomes C., Lourenço A.C., Minatovicz B., Crestani S., Gasparotto Jr. A., Martino-Rade A.J, Dalsenter P.R., Screening for in vivo, (anti)estrogenic , (anti)rogenic activities of *Tropaeolum majus* L. its effect on uterine contractility. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 141, 418-423.
- Maas M., Petereit F., Hensel A., Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules*, 2009, 14, 36-45.
- Matu E. N., Van Staden J., Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 87(1), 35-41.
- Maverakis E., Miyamura Y., Bowen M.B., Correa G., Ono Y., Goodarzi H., Light, including ultraviolet. *Journal of Autoimmunity*, 2010, 34(3), J247-J257.
- Mostafa I., El-Aziz E.A., Hafez S., El-Shazly A., Chemical constituents and biological activities of *Galinsoga parviflora* Cav. (Asteraceae) from Egypt. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2013, 68c, 285-292.
- Nichols J.A., Katiyar K., Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Archives for Dermatological Research*, 2010, 302(2), 71-89.
- Niizu, P. Y., Rodriguez-Amaya, D. B., Flowers leaves of *Tropaeolum majus* L. rich sources of lutein. *Journal of Food Science*, 2005, 70, S605-S609.
- O'Dowd Y., Driss F., My-Chan Dang P., Elbim C., Gougerot-Pocidallo M.-A., Pasquier C., El-Benna J., Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 68, 2003-2008.
- Pan Z.H., Zhao L., Huang R., Ma G.Y., Li Z.Q., Terpenes and sterols from *Galinsoga parviflora*. *Journal of Yunnan University of Nationalities. Natural Sciences*, 2007, 29, 613 – 616.
- Pintao A.M., Pais M.S.S., Coley H., Kelland L.R., Judson I.R., In vitro and in vivo antitumor activity

- of benzyl isothiocyanate: A natural product from *Tropaeolum majus*. *Planta Medica*, 1995, 61 (3), 233-236.
- Piwowski J.P., Kiss A.K., Kozłowska-Wojciechowska M., Anti-hyaluronidase anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 137, 937-941.
- Plekhanova T.I., Bandyukova V.A., Mikhailova, G.A., Flavonoids of *Galinsoga parviflora*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1978, 13, 728-729.
- Popović Z., Smiljanić M., Matić R., Kostić M., Nikić P., Bojović S., Phytotherapeutical plants from Deliblato Sands (Serbia): Traditional pharmacopoeia and implications for conservation. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 2012, 11, 385-400.
- Ranilla L.G., Kwon Y.-I., Apostolidis E., Shetty, K., Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 2010, 101, 4676-4689.
- Ruiz A., Mardones C., Vergara C., Hersimon-Gutierrez I., Von Baer D., Hinrichsen P., Rodriguez R., Arribillaga D., Dominguez E., Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1281, 38-45.
- Saewan N., Jimtaisong A., Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2013, 3(09), 129-141.
- Santo A.P.E., Martins I.S.S., Tomy S.C., Ferro V.O., Anticoagulant in vitro effect of hidrotethanolic extract of edible leaves and flowers of *Tropaeolum majus* L. (*Tropaeolaceae*) on human plasma. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2007, 26 (5), 732-736.
- Sarwa A., Wielki leksykon roślin leczniczych. Warszawa: Książka i Wiedza, 2001.
- Schmidt C., Fronz, M., Goettert M., Geller F., Luik S., Flores E.M.M., Bittencourt C.F., Zanetti G.D., Heinzmann B.M., Laufer S., Merfort I., Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(3), 523-532.
- Schwaiger S., Cervellati R., Seger C., Ellmerer E.P., About N., Renimel I., Godenir C., Andre P., Gafner F., Stuppner H., Leontopodic acid – a novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties. *Tetrahedron*, 2005, 61, 4621-4630.
- Şöhretoğlu, D., Kırmızıbekmez, H., Polyphenols from *Potentilla recta*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2011, 39, 132-134.
- Stevanato R., Bertelle M., Fabris S., Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2014, 69, 71-77.
- Strzelecka H., Kowalski J. pod red., Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. PWN, Warszawa, 2000.
- Svobodova A., Psoťova J., Walterowa D., Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers*, 2003, 147(2), 137-145.
- Svobodova A., Walterowa D., Vostalova J., Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czech Republic*, 2006, 150(1), 25-38.
- Szeczyńska K., Wolbiś M., Polyphenolic compounds of *Galinsoga ciliata* (Raf.) Blake (Compositae).

- Acta Poloniae Pharmaceutica, 1984, 41, 117-121.
- Tariq S., Ferheen S., Moazzam M., Jabbar A., Riaz N., Saleem M., Afza N., Malik A., Tareen R.B., Phytochemical studies on *Galinsoga parviflora*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2008, 30, 762–765.
- Terra V.A., Souza-Neto F.P., Frade M.A.C., Ramalho L.N.Z., Andrade T.A.M., Pasta A.A.C., Conchon A.C., Guedes F.A., Luiz R.C., Cecchini R., Cecchini A.L., Genistein prevents ultraviolet B radiation induced nitrosative skin injury and promotes cell proliferation. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2015, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.01.013.
- Tomczyk M., Leszczyńska K., Tomczykowa M., Jakoniuk P., Antimicrobial activity of *Potentilla* species. Fitoterapia, 2008, 79, 592-594.
- Tomczyk M., Wiater A., Pleszczyńska M., *In vitro* anticariogenic effects of aerial parts of *Potentilla recta* and its phytochemical profile. Phytotherapy Research, 2011, 25, 343-350.
- Tomczyk, M., Latté, K.P., *Potentilla* - A review of its phytochemical and pharmacological profile. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 122, 184-204.
- Tomczyk, M., Secondary metabolites from *Potentilla recta* L. and *Dryocallis rupestris* (L.) Soják (syn. *Potentilla rupestris* L.) (Rosaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39, 893-896.
- Tosun A., Bahadır Ö., Altanlar N., Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine in Turkey. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 3, 167-176 i piśmiennictwo w nim zawarte.
- Turan N.N., Demiryürek A.T., Kanzik I., Hypochlorous acid-induced responses in sheep isolated pulmonary artery rings. Pharmacological Research, 2000, 41 (5), 589-596.
- Van Dyke K., McConnell P., Marquardt L., Green tea extract its polyphenols markedly inhibit luminol-dependent chemiluminescence activated by peroxynitrite or SIN-1. Luminescence, 2000, 15, 37-43.
- Virtanen A.I., Antimicrobial and antithyroid compounds in some edible vegetables. Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles, 1969, 18 (1-3), 8-28.
- Vogl S., Picker P., Mihaly-Bison J., Fakhrudin N., Atanasov A.G., Heiss E.H., Wawrosch C., Reznicek G., Dirsch V.M., Saukel J., Kopp b., Ethnopharmacological *in vitro* studies on Austria's folk medicine—An unexplored lore *in vitro* anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 149, 750–771.
- Wagner H., Bladt S., pod red., Plant Drug Analysis. Springer, Berlin, 1996, str. 195.
- Wang Q., Kuang H., Su Y., Sun Y., Feng J., Guo R., Chan K., Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 146, 9–39.
- Wojciechowska, B., Wizner, L., Cucurbitacines in *Tropaeolum majus* L. fruits. Herba Polonica, 1983, 29, 97-101.
- Wood M., The Earthwise Herbal: A Complete Guide to Old World Medicinal Plants. North Atlantic Books, Berkeley, 2008.
- Zanetti, G.D., Manfron, M.P., Hoelzel, S.C.D.V.M., Pagliarin, V.P., Morel, A.F., Acute toxicity and antibacterial activity of *Tropaeolum majus* L. extracts. Acta Farmaceutica Bonaerense, 2003, 22 (2), 159-162.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

### a) działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Od początku mojej pracy zawodowej zainteresowania moje skupiały się na analizie składu, zarówno pod względem jakościowym jak i ilościowym, substancji roślinnych. W badaniach nad korzeniami różnych gatunków z rodzaju *Rumex* (*Lapathi acuti* r), którymi zajmowałam się w ramach mojej pracy magisterskiej oraz przez jakiś czas po jej ukończeniu wykorzystywałam metody spektrofotometryczne i kolorymetryczne do oznaczeń ilościowych, oraz metodę chromatografii cienkwarstwowej do badań jakościowych. Korzeń kobyłaka jest substancją roślinną tradycyjnie stosowaną jako lek zapierający ze względu na znaczną zawartość związków garbnikowych. Ponieważ równocześnie występują w niej przeciwstawnie działające glikozydy antranoidowe, konieczne było opracowanie metod oceny surowca, tak aby zapewnić bezpieczeństwo stosowania. Wyniki tych badań zamieściłam w publikacji **1D\***, oraz prezentowałam na konferencji w postaci plakatu (**1P**\*\*).

Drugą substancją roślinną, którą badałam było *Maydis stigma*. Ta substancja roślinna jest stosowana tradycyjnie w łagodzeniu objawów wczesnych stadiów rozrostu gruczołu krokowego. Wśród substancji chemicznych odpowiedzialnych za działanie wymieniane są m.in. kwasy tłuszczowe i sterole (głównie  $\beta$ -sitosterol). Moim celem była analiza składu, głównie frakcji polifenolowej badanej substancji. Otrzymane wyniki prezentowałam na konferencji naukowej (**2P**\*\*).

W badaniach nad *Geranii pratensae herba* przeprowadzanych we współpracy z dr Katarzyną Miłkowskiej-Leyck opracowywałam metodę oznaczania geraniny w wyciągach otrzymanych z ziele bodziszka łąkowego. Opracowana metoda była na ówczesne czasy metodą nowatorską. Wyniki moich badań zostały opublikowane w pracy **2D\***.

Następnym związkiem, którego metodę oznaczania opracowałam oraz zwalidowałam był lawandulifoliozyd w ziele *Leonurus cardiaca*. Badania te prowadziłam również we współpracy z dr Katarzyną Miłkowską-Leyck. Pomimo tradycyjnego stosowania ziele serdecznika miało mało opracowanych metod analitycznych do jego standaryzacji. Wyniki moich badań były prezentowane na konferencjach naukowych (**4P, 6P**\*\*).

Duża część mojej pracy badawczej dotyczyła analizy fitochemicznej ziele tymianku (*Thymi hba*), wyciągów z niego otrzymanych oraz preparatów te wyciągi zawierających. Ziele tymianku jest jedną z ważniejszych substancji roślinnych służących do przygotowania preparatów stosowanych w infekcjach dróg oddechowych. W aptekach znajduje się znaczna liczba preparatów z tymiankiem. Zawierają one *Thymi herba*, bądź wyciągi z niego przygotowane, najczęściej *Thymi extractum fluidum* i *Thymi extractum siccum*.

Badania rozpocząłam od porównania składu ziele tymianku z otrzymanymi z niego, metodami przemysłowymi, wyciągami: *Thymi extractum fluidum* i *Thymi extractum*

*siccum*.

Ziele tymianku jest substancją roślinną olejkową, dlatego standaryzuje się go na zawartości olejku, i zwykle także znajdujących się w nim fenoli. Okazało się, że metoda farmakopealna, stosowana z powodzeniem do oznaczenia zawartości olejku w ziele i wyciągu suchym, nie mogła być użyta do określenia zawartości olejku w wyciągu płynnym, ponieważ uniemożliwia to wysoka zawartość etanolu w preparacie. Zastosowałam, więc metodę dającą jedynie przybliżone wyniki.

Następnym pytaniem na które chciałam znaleźć odpowiedź było jaka jest zawartość tymolu w obu wyciągach. Wykorzystywana w niektórych farmakopeach metoda kolorymetryczna oparta na reakcji Emmersona pozwala oznaczyć jedynie sumę fenoli. Dlatego do oznaczeń tymolu zastosowałam dwie metody, opracowane i zwalidowane w toku niniejszych badań, zmodyfikowaną metodę GC oraz metodę densytometryczną.

W następnej części badań zajęłam się polifenolami. Opisane w literaturze polifenole, występujące w tymianku, to: flawonoidy, kwasy fenolowe i garbniki. Zdecydowałam się więc porównać zawartość tych trzech grup związków w badanym ziele i wyciągach. W badaniach wykorzystałam metody spektrofotometryczne i kolorymetryczne, opisane w piśmiennictwie: do oznaczania flawonoidów – metodę wg FP V, fenolokwasów – metodę z odczynnikiem Arnowa, a garbników - metodę adsorpcji na proszku skórzanym.

W dalszej części pracy przeprowadziłam wstępne badania jakościowe (metodą TLC) kwasów fenolowych. Na ich podstawie stwierdziłam podobny jakościowo skład ziele i wyciągów, przy czym, dominującym związkiem był kwas rozmarynowy. Biorąc pod uwagę doniesienia o działaniu przeciwutleniającym, przeciwwirusowym, a przede wszystkim przeciwzapalnym tego związku, zdecydowałam się w dalszych badaniach porównać jego zawartość w ziele, otrzymanych z niego wyciągach i preparatach. Do oznaczania jego zawartości wykorzystałam także metodą TLC w połączeniu z densytometrią. Opracowana i zwalidowana metoda okazała się specyficzna, dokładna i precyzyjna. Jest ona także szybka i prosta, ponieważ zastosowany został rozdział izokratyczny, a odczyt wykonuje się bez wywoływania chromatogramu.

Poza działaniem dezynfekującym w przypadku schorzeń dróg oddechowych, w jakich stosowane jest ziele tymianku, istotne jest również działanie rozkurczające. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że wyciągi z *Thymi herba* posiadają taką aktywność. Potwierdziły to także badania przeprowadzone we współpracy z Prof. dr hab. Barbarą Filipek z Zakładu Farmakodynamiki Collegium Medicum UJ. Według danych literaturowych związkami odpowiedzialnymi za to działanie są flawonoidy. Z doniesień wynika, że najbardziej aktywne spazmolitycznie są metoksyloowane flawony. Dlatego stwierdzenie ich obecności w ziele i analizowanych wyciągach było przedmiotem moich dalszych badań. Ze względu na trudność uzyskania wzorcowych flawonów, kirsilineol i 8-metoksykirsilineol wyizolowano z badanego wyciągu płynnego. Dominującym związkiem w zespole flawonoidów była luteolina. Postanowiłam zbadać jej zawartość w ziele i wyciągach.

W tym celu opracowałam metodę TLC w połączeniu z densytometrią. Opracowana metoda po zwalidowaniu okazała się specyficzna, dokładna i stosunkowo precyzyjna. Największą trudność sprawił rozdział luteoliny od innych związków zawartych w badanym wyciągu, a szczególnie oddzielenie luteoliny od kwasu fenolowego, który ma bardzo zbliżoną wartość współczynnika retencji. Dlatego ostatecznie do rozdziału zastosowałam trzystopniowy gradient.

Porównanie zawartości tymolu, kwasu rozmarynowego i luteoliny obejmowało dalszą część moich badań. Ilości ww. związków oznaczałam, poza *Thymi herba*, *Thymi extractum fluidum* i *Thymi extractum siccum*, także w naparze i wyciągu etanolemowym z substancji roślinnej oraz trzech preparatach rynkowych. Wyciąg etanolemowy z zieleń tyminianku jest składnikiem niektórych preparatów rynkowych. Natomiast napar jest do tej pory jedną z najbardziej pospolitych form leku w przypadku ziół. Wybrane do oceny preparaty rynkowe zawierały tymianek w różnej postaci: ziele, wyciąg płynny i wyciąg suchy. Ponadto tymianek jest w nich głównym składnikiem, i jedynym mogącym działać dezynfekująco czy spazmolitycznie.

Do badań zawartości tymolu wykorzystałam wyżej opisane metody, w większości przypadków metodę GC, tylko przy oznaczaniu w wyciągu etanolemowym metodę densytometryczną po rozdziale metodą TLC.

Oznaczenia zawartości luteoliny oraz kwasu rozmarynowego wykonałam opracowanymi i zwalidowanymi metodami TLC w połączeniu z densytometrią. Porównując otrzymane wyniki stwierdziłam, że najlepszą postacią, zarówno ze względu na zawartość związków czynnych jak i na działanie rozkurczające i przeciwskurczowe, jest wyciąg suchy (*Thymi extractum siccum*). Aczkolwiek wydaje się, że opracowanie technologii otrzymywania tego wyciągu, tak aby straty tymolu były mniejsze, lub wzbogacanie preparatów zawierających *extractum siccum* dodatkiem tymolu, rozszerzyłoby wskazania i przypuszczalnie podniosłoby efektywność leków go zawierających.

Wyniki tych badań były podstawą mojej pracy doktorskiej. Część z moich badań została opublikowana (4D, 6D, 8D, 9D)\*, oraz była prezentowana w postaci plakatów na konferencjach naukowych (5P, 7P-12P)\*\*.

#### b) działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Opracowaną, w toku badań nad zieleń tyminianku, metodę oznaczania kwasu rozmarynowego wykorzystałam także do oznaczeń jego zawartości w kulturze korzeni *Ocimum tenuiflorum* L., które przeprowadzałam we współpracy z dr. hab. Olgą Olszowską z Zakładu Botaniki Farmaceutycznej WUM.

Ponadto metoda ta była także stosowana przeze mnie, wraz ze studentkami z koła naukowego, do oznaczania zawartości kwasu rozmarynowego w rynkowym preparacie zawierającym: *Thymi hba*, *Salviae fol.* i *Manthae fol.* Wszystkie wymienione substancje roślinne należą do rodziny *Lamiaceae*, i są zaliczane do surowców olejkowych. Jednak



formą leku do stosowania badanego preparatu jest napar, czyli wyciąg wodny. Ciekawym wydało się nam jaka jest zawartość głównych składników olejków eterycznych w naparze, a także jaka jest zawartość kwasu rozmarynowego, który w przeciwieństwie do lipofilnych składników olejkowych, dobrze rozpuszcza się w wodzie. Podstawą naszych badań była również aktualna (FPIX) standaryzacja *Menthae piperitae folii extractum siccum*, właśnie na zawartość kwasu rozmarynowego, oraz stwierdzona przeze mnie we wcześniejszych badaniach znaczna jego ilość w wyciągach z *Thymi hba*. Oznaczanie składników olejkowych prowadziłyśmy opracowaną w toku badań metodą GC. Stwierdziłyśmy nieznaczne ilości składników olejkowych, natomiast znaczną ilość kwasu rozmarynowego.

Moją wiedzę i doświadczenie w zakresie metody HPTLC w połączeniu z densytometrią, wykorzystałam także do optymalizacji rozdziału w opracowanej metodzie oznaczania zawartości oleaceiny, oleuropeiny i echinakozydu w wyciągach otrzymanych z liści *Ligustrum vulgare* L. Badania te prowadziłam we współpracy z dr Moniką Czerwińską z Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy **16D\***, oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (**26P, 28P**)\*\*. Plakat 28P został nagrodzony przez le Club de Chromatographie sur Couche Mince na International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, 02.-04.07.2014, Lyon, Francja.

W ramach współpracy z dr. hab. Michałem Tomczykiem zapoczątkowałam badania nad polifenolami (ze szczególnym uwzględnieniem flawonoidów) w rodzaju *Potentilla s.l*. Sprawowałam opiekę merytoryczną nad opracowaniem rozdziału związków, wykonaniem części doświadczeń techniką wysokosprawnej chromatografii cienkwarstwowej oraz przeprowadzałam analizę statystyczną wyników eksperymentów. Wyniki tych badań były opublikowane (**10D, 12D**)\*, oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (**18P, 20P, 21P**)\*\*.

W czasie pracy nad zieleń tyminu, a dokładniej w związku z aktywnością kwasu rozmarynowego, bliżej zainteresowałam się działaniem przeciwzapalnym substancji roślinnych. Byłam członkiem zespołu zajmującego się badaniem aktywności przeciwzapalnej ziela wierzbowicy i oenoteiny B, gdzie przygotowywałam materiał do badań oznaczając m.in. zawartość oenoteiny B w wyciągach roślinnych z różnych gatunków wierzbowic, metodą przeze mnie opracowaną i zvalidowaną (**14D\***). Następnym etapem było rozszerzenie stosowanej przeze mnie metodologii badań o analizy działania przeciwzapalnego, rozpoczynając od prostych testów badania aktywności przeciwutleniającej, jako jednego z czynników odpowiedzi w stanach zapalnych. Do tych metod dołączyłam następnie testy badania wpływu na aktywność enzymów biorących udział w procesie zapalnym. Ostatecznie ukierunkowałam swoje zainteresowania na substancje roślinne mające tradycyjne wskazania do leczenia schorzeń skóry. Wyniki tych badań są włączone do mojego postępowania habilitacyjnego.

Sprawowałam także opiekę merytoryczną nad procesem walidacji opracowanej metody

HPLC oznaczania oenoteiny B w wybranych substancjach roślinnych. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy **13D\***.

Opracowaną przez mnie metodę badania hamowania aktywności lipooksygenazy wykorzystałam do zbadania działania wyciągów z liści *Gaultheria procumbens* L. Badania te przeprowadziłam we współpracy z pracownikami Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy **15D\***.

Aktualnie rozpoczęłam badania nad kolejną substancją roślinną (*Stellariae mediae herba*), która stosowana jest tradycyjnie w schorzeniach skóry. Ziele gwiazdnicy podobnie jak ziele żółtlicy jest popularnym w Polsce chwastem. Natomiast dane na temat składu i działania tej substancji roślinnej są ograniczone.

\* spis publikacji na stronie 35.

\*\* wykaz doniesień zjazdowych na stronie 36.

#### c) podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek obejmuje:

- 25 prac oryginalnych, z czego 18 opublikowanych zostało w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Report (JCR)*, a 7 w czasopismach krajowych innych niż znajdujące się w bazie *Journal Citation Report (JCR)*. W 13. pracach byłam pierwszym autorem,
- 7 prac przeglądowych,
- 28 streszczeń z prezentowanych doniesień na konferencjach naukowych, z czego 6 zostało opublikowanych w *Planta Medica*, czasopiśmie znajdującym się w bazie *Journal Citation Report (JCR)*,
- 1 rozdział w książce,
- sumaryczny *impact factor* według listy *Journal Citation Reports (JCR)*, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 40,826; łączna punktacja MNiSW: 539,
- liczba wszystkich cytowań publikacji według Web of Science™ Core Collection: **93 (103** wg bazy Scopus)
- liczba cytowań (bez autocytowań) publikacji według Web of Science™ Core Collection: **77 (87** wg bazy Scopus)
- indeks Hirscha (h) według Web of Science™ Core Collection i bazy Scopus: **6**

## 6. Pozostałe publikacje oryginalne

- 1D. Miłkowska K., Bazylko A., Strzelecka H., Korzeń kobyłaka (*Rx. Lapathi*) jako surowiec leczniczy, *Herba Polonica*, 1997, 43(1), 26-32.
- 2D. Miłkowska K., Bazylko A., Strzelecka H., Kozarewicz P., Korzenie bodziszka łąkowego (*Geranium pratense* L. - *Geraniaceae*) jako nowy surowiec garbnikowy, *Herba Polonica*, 44(4), 287-291, 1998.
- 3D. Stefańska J., Miłkowska-Leyck K., Bazylko A., Kozarewicz P., Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej preparatów z korzeni bodziszka łąkowego (*Geranium pratense* L. - *Geraniaceae*), *Farmacja Polska*, 1998, 54(20), 944-947.
- 4D. Bazylko A., Strzelecka H., Quantitative determination of phenol derivatives from *Oleum Thymi*, *Chromatographia*, 2000, 52(1/2), 112-114 (IF<sub>2000</sub> - **1,619**).
- 5D. Skopińska-Różewska E., Strzelecka H., Sommer E., Sokolnicka I., Bazylko A., Filewska M., Immunotropowe i antyangiogenne właściwości preparatu EKOGAL, *Onkologia Polska*, 2001, 4(3-4), 119-123.
- 6D. Bazylko A., Śliwińska A., Strzelecka H., Izolacja kirsilineolu i 8-metoksykirsilineolu z *Thymi extractum fluidum*, *Herba Polonica*, 2002, 48(3), 130-135.
- 7D. Skopińska-Różewska E., Strzelecka H., Białas-Chromiec B., Sommer E., Filewska M., Bazylko A., Skurzak H., Badanie wpływu preparatu PROSTAMER na wzrost mięsaka L1 u myszy, *Urologia Polska*, 2002, 55(2), 20-25.
- 8D. Bazylko A., Strzelecka H., A HPTLC densitometric determination of luteolin in *Thymus vulgaris* and its extracts, *Fitoterapia*, 2007, 78(6), 391-395 (IF<sub>2007</sub> - **1,106**).
- 9D. Bazylko A., Zygmunt M., Sapa J., Strzelecka H., Filipek B., Determination of spasmolytic and anti-spasmodic activity of thyme extracts and one of it's major component, rosmarinic acid in isolated rabbit ileum and isolated rat aorta, *Acta Biologica Cracoviensia, series: Zoologia*, 2009, 51, 49-54.
- 10D. Tomczyk M., Bazylko A., Staszewska A., Determination of polyphenolics in extracts of *Potentilla* species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method, *Phytochemical Analysis*, 2010, 21(2), 174-179 (IF<sub>2010</sub> - **1,848**).
- 11D. Kiss A.K. Bazylko A., Filipek A., Granica S., Jaszewska E., Kiarszys U., Kośmider A., Piwowarski J., Oenothien B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp., *Phytomedicine*, 2011, 18, 557-560 (IF<sub>2011</sub> - **3,268**).
- 12D. Tomczyk M., Bazylko A., Bonarewicz J., Method development and validation for optimized separation of quercetin derivatives in selected *Potentilla* species using high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 61, 265– 270 (IF<sub>2012</sub> - **2,947**).
- 13D. Granica S., Bazylko A., Kiss A.K., Determination of macrocyclic ellagitannin-oenothien B in plant material by HPLC-DAD-MS. Method development and validation, *Phytochemical Analysis*, 2012, 23, 582-587 (IF<sub>2012</sub> - **2,480**).
- 14D. Schmid D., Gruber M., Piskaty C., Woehs F., Renner A., Nagy Z., Kaltenboeck A., Wasserscheid T., Bazylko A., Kiss A., Moeslinger T., Inhibition of nuclear factor kappa B dependent cytokine and inducible nitric oxide synthesis by the macrocyclic ellagitannin oenothien B in TLR-stimulated RAW 264.7 macrophages, *Journal of Natural Products*, 2012, 75(5), 870-875 (IF<sub>2012</sub> - **3,285**).
- 15D. Michel P., Dobrowolska A., Kicel A., Bazylko A., Granica S., Piwowarski J., Olszewska M.,

Phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory activity of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) leaf extracts, *Molecules*, 2014, 19, 20498-20520 (IF<sub>2014</sub> - 2,416).

- 16D. Czerwińska M.E., Ziarek M., Bazylko A., Osińska E., Kiss A.K., Quantitative determination of secoiridoids and phenylpropanoids in different extracts of *Ligustrum vulgare* L. leaves by validated HPTLC-photodensitometry method, *Phytochemical Analysis*, 2015, DOI 10.1002/pca.2558 (IF<sub>2014</sub> - 2,341).

## 7. Publikacje przeglądowe

- 1R. Bazylko A., Strzelecka H., Surowce roślinne stosowane w terapii cukrzycy, *Herba Polonica*, 1997, 43(3), 253-270.
- 2R. Śliwińska A., Bazylko A., Strzelecka H., Spazmolityczne działanie *Thymi herba et extracta*, *Herba Polonica*, 2001, 47(1), 56-69.
- 3R. Bazylko A., Właściwości farmakologiczne i toksyczne naftochinonów oraz surowców zawierających tę grupę związków, *Czynniki Ryzyka*, 2006, 49(3), 33-39.
- 4R. Bazylko A., Naruszewicz M., Biologiczne i terapeutyczne właściwości diosminy na podstawie badań klinicznych preparatu Phlebodia 600, *Czynniki Ryzyka*, 2007, 52(2), 60-64.
- 5R. Bazylko A., Kozłowska-Wojciechowska M., Wpływ polifenoli z żurawiny na zdrowie człowieka, *Czynniki Ryzyka*, 2007, 54(4), 57-61.
- 6R. Bazylko A., Kiss A.K., Naruszewicz M., Zastosowanie koagregowanej diosminy w przewlekłej niewydolności żylniej, *Czynniki Ryzyka*, 2008, 58(4), 26-30.
- 7R. Bazylko A., Substancje roślinne, wskazania i przeciwwskazania do stosowania w czasie ciąży i przygotowania do porodu, *Farmacja Polska*, 2010, 66(7), 478-483.

## 8. Udział w międzynarodowych lub krajowych konferencjach naukowych

- 1P. Miłkowska K., Bazylko A., Strzelecka H., Wstępne badania chemizmu korzenia kobyłaka - plakat na V-tej Konferencji: Zastosowanie metod chromatograficznych w badaniach fitochemicznych i biomedycznych, Lublin, 21-22.06.1996
- 2P. Bazylko A., Strzelecka H., Wstępne badania związków polifenolowych w *Maidis stigma*- plakat na VI-tej Konferencji: Zastosowanie metod chromatograficznych w badaniach fitochemicznych i biomedycznych, Lublin, 19-21.06.1997
- 3P. Staszewska M., Malinowski J., Bazylko A., Miłkowska K., Ocena wybranych roślinnych preparatów galenowych- plakat na VI-tej Konferencji: Zastosowanie metod chromatograficznych w badaniach fitochemicznych i biomedycznych, Lublin, 19-21.06.1997
- 4P. Miłkowska-Leyck K., Bazylko A., Marciniak M., Oznaczanie zawartości wybranych glikozydów fenylopropanoidowych (lawandulifoliozydu) w ziele *Leonurus cardiaca* L., *Lamiaceae.*, metodą densytometryczną- plakat na Sympozjum: Jakość Leku we wdrożeniach, produkcji i kontroli, Miedzeszyn, 15-17.03. 2000. Abstrakt opublikowany w *Biuletynie Instytutu Leków* 44(1), 218-219, 2000
- 5P. Bazylko A., Śliwińska A., Strzelecka H., Investigation of polyphenols in *Extractum Thymi fluidum*- plakat na: 2<sup>nd</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin - Kazimierz Dolny, 14-16.06. 2000
- 6P. Miłkowska-Leyck K., Bazylko A., Kopczacki P., Witowska J., Strzelecka H., Phenylethanoid glycosides from *Leonurus cardiaca*, plakat na konferencji: International Congress and 48<sup>th</sup>

- Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Zürich, Szwajcaria, 3-7.09. 2000
- 7P.** Bazyłko, A., Strzelecka, H., Analysis of essential oils of *Thymi herba et extracta.*, plakat na konferencji: World Conference on Medicinal and Aromatic Plants, Budapeszt, Węgry, 8-11.07.2001
- 8P.** Bazyłko A., Strzelecka H., Badania porównawcze flawonoidów zawartych w *Thymi herba et extracta*, plakat na IV-tej Konferencji: Flawonoidy i ich zastosowanie, Rzeszów, 23-25.05.2002
- 9P.** Bazyłko A., Strzelecka H., Comparative investigation of thyme and its commercialized extracts, plakat na: 3<sup>nd</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin - Kazimierz Dolny, 12-15.06.2002
- 10P.** Bazyłko A., Stefańska J., Strzelecka H., Chemical and microbiological studies of main compounds of *Thymi herba et extracta*, plakat na 33<sup>rd</sup> International Symposium on Essential Oils, Lizbona, Portugalia, 04-07.09.2002
- 11P.** Bazyłko A., Strzelecka H., Quantitative determination of rosmarinic acid in *Thymi herba* and *extracta*, plakat na: 51<sup>st</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Kiel, Niemcy, 31.08-04.09.2003
- 12P.** Bazyłko A., Strzelecka H., Investigation of polyphenolic acids in *Thymi herba*, plakat na 4<sup>nd</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin - Kazimierz Dolny, 14-17.06.2004
- 13P.** Bazyłko A., Kiss A., Kowalski J., Quantitative determination of oenothien B in *Epilobium extracta*, plakat na: 53<sup>st</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Florencja, Włochy, 21.08-25.08.2005
- 14P.** Bazyłko A., Kiss A., Kowalski J., Determination of flavonoids in extracts of *Epilobii angustifolii herba* by HPTLC-densitometry, plakat na: 54<sup>st</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Helsinki, Finlandia, 29.08-02.09.2006. Abstrakt opublikowany w *Planta Medica* 72(11), 1074, 2006
- 15P.** Derwińska M., Bazyłko A., Kowalski J., Antioxidant activity of *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga quadriradiata*, plakat na: 54<sup>st</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Helsinki, Finlandia, 29.08-02.09.2006. Abstrakt opublikowany w *Planta Medica* 72(11), 1012, 2006
- 16P.** Bazyłko A., Kiss A., Kowalski J., Simultaneous determination of oenothien B and quercetin glucuronide in aqueous extract of *Epilobii angustifolii herba*, plakat na: 55<sup>st</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz, Austria, 02.09-06.09.2007. Abstrakt opublikowany w *Planta Medica* 73(9), 900, 2007
- 17P.** Kiss A., Kiarszys U., Piwowarski J., Staszewska A., Bazyłko A., Contribution of oenothien B in the anti-inflammatory activity of *Epilobium* sp. extracts, plakat na: 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF - (Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie (AFERP), American Society of Pharmacognosy (ASP), Society for Medicinal Plant Research (GA), Phytochemical Society of Europe (PSE), and Società Italiana di Fitochimica (SIF - )), Ateny, Grecja, 03-08.08.2008. Abstrakt opublikowany w *Planta Medica* 74(9), 68, 2008
- 18P.** Tomczyk M., Bazyłko A., Staszewska A., Simultaneous determination of polyphenolics in extracts of *Potentilla* species, plakat na: 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF - , Ateny, Grecja, 03-08.08.2008. Abstrakt opublikowany w *Planta Medica* 74(9), 214, 2008
- 19P.** Bazyłko A., Tomczyk M., Flazińska A., Lęgas A., Optimization of the separation of flavonoids,

- methyyl brewifolincarboxylate, ellagic acid and its derivative in extracts from *Potentilla* species using HPTLC, plakat na 7<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products joined with 6<sup>th</sup> International Symposium of the International Society for the Development of Natural Products, Lublin 14-17.06.2010
- 20P.** Tomczyk M., Bazyłko A., Łęgas A., Development of HPTLC method for quantification of flavonoids in extracts of the selected *Potentilla* species, plakat na: 58<sup>st</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Berlin, Niemcy, 29.08-02.09.2010. Abstrakt opublikowany w *Planta Medica* 76(12), 1329, 2010
- 21P.** Bazyłko A., Tomczyk M., Bonarewicz J., Łęgas A., Quantitative determination of flavonoid glycosides in extracts of *Potentilla* species, plakat na: International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography HPTLC 2011, Basel, Szwajcaria, 06-08.06.2011
- 22P.** Bazyłko A., Szyller N., Granica S., Osińska E., Kiss A.K., Composition investigations of aqueous and water-ethanol extracts of *Tropeolum majus* L. herb using HPTLC and HPLC-DAD-MS methods, plakat na 8<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin 17-20.05.2012
- 23P.** Bazyłko A., Tomczyk M., Bonarewicz J., Łęgas A., Comparison of antioxidant activity of different extracts and fractions of *Potentilla recta* l. herb, 8<sup>th</sup> Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF - , New York City, USA, 28.07-01.08.2012
- 24P.** Bazyłko A., Piwowarski J., Tomczyk M., Agrymonina, elagotanina wyizolowana z *Potentilla recta* l., jej aktywność przeciwutleniająca i przeciwzapalna, plakat na XXII Naukowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Białystok 18-21.09.2013
- 25P.** Bazyłko A., Boruc K., Borzym J., Kiss A.K., Aqueous and ethanolic extracts of *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga ciliata* - composition investigations using HPTLC and HPLC-DAD-MS methods, plakat na 9<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin 26-29.05.2014
- 26P.** Czerwińska M., Ziarek M., Bazyłko A., Osińska E., Kiss A., Determination of secoiridoids and phenylpropanoids in different extracts of *Ligustrum vulgare* L. leaves by HPTLC and HPLC-DAD-MS methods, plakat na 9<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin 26-29.05.2014
- 27P.** Bazyłko A., Boruc K., Kiss A.K., Optimization of the separation of caffeoyl derivatives from aqueous and ethanolic extracts of *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga ciliata*, International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, Lyon, Francja, 02–04.07.2014
- 28P.** Ziarek M., Czerwińska M., Bazyłko A., Osińska E., Kiss A., HPTLC analysis of secoiridoids and phenylpropanoids in different extracts of *Ligustrum vulgare* L. leaves, International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, Lyon, Francja, 02–04.07.2014

## 9. Monografia

Bazyłko A., Naruszewicz M., Zastosowanie chromatografii cienkwarstwowej (TLC) i wysokosprawnej chromatografii cienkwarstwowej (HPTLC), w połączeniu z densytometrią, do badań substancji roślinnych, w Postępie w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych pod red. prof. UM dra hab. Edmunda Grześkowiaka, prof. UM dr hab. Anny Jelińskiej i prof. dr hab. Marianny Zajac. UM Poznań, Poznań 2010, str. 209-223.

## 10. Współpraca naukowa

- z Zakładem Farmakognozji, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (dr hab. Michał Tomczyk) dotycząca badań nad rodzajem *Potentilla sensu lato* (4. wspólne publikacje),
- z Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (dr Joanna Stefańska) dotycząca badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji roślinnych (2. wspólne publikacje),
- z Katedrą Roślin Warzywnych i Leczniczych SGGW w Warszawie (Prof. dr hab. Ewa Osińska) dotycząca uprawy roślin do pozyskiwania substancji roślinnych o potwierdzonym pochodzeniu (2. wspólne publikacje),
- z Zakładem Ekologii i Ochrony Przyrody w Turystyce Uniwersytetu Rzeszowskiego (dr Maria Ziaja) dotycząca pozyskiwania substancji roślinnych o potwierdzonym pochodzeniu ze stanu naturalnego.

## 11. Projekty badawcze

- Praca własna, lata 1999-2001: Akademia Medyczna w Warszawie (obecnie: Warszawski Uniwersytet Medyczny) nr: FW-25/W/1999-2001; temat: „Badanie frakcji garbnikowych w wybranych surowcach z rodziny *Lamiaceae*”; udział: kierownik tematu
- Praca własna, lata 2002-2004: Akademia Medyczna w Warszawie (obecnie: Warszawski Uniwersytet Medyczny) nr: 03-FW-25/W-1/2002-2004; temat: „Ocena metod standaryzacji preparatów roślinnych w świetle najnowszych badań”; udział: kierownik tematu
- Praca własna (projekt młodego badacza), lata 2005-2006: Akademia Medyczna w Warszawie (obecnie: Warszawski Uniwersytet Medyczny) nr: FW-25/WB1/2005-2006; temat: „Opracowanie metod do standaryzacji surowców i złożonych preparatów pochodzenia roślinnego”; udział: kierownik tematu
- Praca własna, 2008: Akademia Medyczna w Białymstoku (obecnie: Uniwersytet Medyczny w Białymstoku); temat: „Oznaczanie zawartości związków polifenolowych w wybranych taksonach rodzaju *Potentilla* L.” (nr 4-12546F); udział: współwykonawca (kierownik tematu: dr n. farm. Michał Tomczyk, Zakład Farmakognozji UMB)
- Praca własna, 2011: Akademia Medyczna w Białymstoku (obecnie: Uniwersytet Medyczny w Białymstoku); temat: Oznaczenia flawonoidów w wybranych gatunkach z rodzaju *Potentilla* L. metodą HPTLC. (nr 11-12610F); udział: współwykonawca (kierownik tematu: dr n. farm. Michał Tomczyk, Zakład Farmakognozji UMB)
- Praca własna, 2012: Akademia Medyczna w Białymstoku (obecnie: Uniwersytet Medyczny w Białymstoku); temat: „Badania aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej wybranych gatunków z rodzaju *Potentilla* L.” (nr 123-12885F); udział: współwykonawca (kierownik tematu: dr n. farm. Michał Tomczyk, Zakład Farmakognozji UMB)

## 12. Otrzymane nagrody za działalność naukową

- Indywidualna nagroda Rektora WUM, naukowa I stopnia za: cykl publikacji dotyczący oznaczania zawartości związków fenolowych w wyciągach i surowcach roślinnych metodą densytometryczną po rozdziale metodą chromatografii cienkowarstwowej; 2008 rok.
- Indywidualna nagroda Rektora WUM, naukowa II stopnia za: cykl publikacji dotyczący badań związków polifenolowych w różnych gatunkach *Potentilla* sp. metodą HPTLC-densytometryczną; 2012 rok.
- Zespołowa nagroda Rektora WUM, naukowa III stopnia za: cykl publikacji dotyczących badania działania przeciwutleniającego i przeciwzapalnego części nadziemnych pozyskanych z *Galinsoga* sp., *Tropeolum majus* i *Potentilla recta*; 2014 rok.

Za osiągnięcia naukowe oraz wkład w organizację procesu dydaktycznego zostałam odznaczona w 2012 r. przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Brązowym Krzyżem Zasługi.

## 13. Przebyte szkolenia i kursy

- Szkolenie dotyczące optymalizacji rozdziału w metodzie chromatografii cienkowarstwowej TLC (prof. dr hab. n. farm. Grażyna Matysik, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej UM w Lublinie, Katedra Chemii, Samodzielna Pracownia Chromatografii Planarnej, 21-25.09.2000).
- Szkolenie z zakresu badania wyciągów i preparatów roślinnych; Pharmaton, Lugano, Szwajcaria (15-31.09.2002).
- Kursy z zakresu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej UM w Lublinie, Katedra Chemii, 29.01-03.02.1996; 12-16.09.2005).
- Kurs nowoczesnej chromatografii cienkowarstwowej (Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej UM w Lublinie, Katedra Chemii, 13-17.09.2004).
- Szkolenie z zakresu walidacji metod analitycznych stosowanych w ocenie jakości substancji czynnych produktów leczniczych; Urząd Rejestracji, Warszawa, 04.11 i 10.11.2005.
- Kurs pedagogiczny organizowany przez Akademię Medyczną w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny), w roku akademickim 2001/2002.

## 14. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

### a) działalność dydaktyczna w ramach WUM

Od początku mojej pracy biorę czynny udział w zajęciach dydaktycznych dla studentów Wydziału Farmaceutycznego, kierunek Farmacja:

- przygotowywałam, aktualizuje i wygłaszam wykłady dla roku III, aktualnie materiał



przeze mnie wykładany obejmuje: przedmiot i zakres farmakognozji, pierwotne i wtórne substancje roślinne – wstęp, węglowodany, wstęp do glikozydów, glikozydy fenolowe, procyjanidyny i antocyjany, glikozydy nasercowe, antrazwiązki, olejki eteryczne, sterole i steroidy, związki siarki oraz wydzieliny pochodzenia roślinnego,

- przygotowywałam i wygłaszałam wykłady dla IV i V roku Fakultatywnego Bloku Programowego Fitochemia i Fitoterapia, z których jeden, dotyczący walidacji metod analitycznych w badaniach substancji i ekstraktów roślinnych, znalazł się aktualnie w programie Bloku Analiza Farmaceutyczna,

- na roku III prowadzę ćwiczenia z mikroskopowej identyfikacji, a także badań fitochemicznych substancji roślinnych, brałam czynny udział w opracowywaniu ich aktualnej wersji,

- prowadzę także ćwiczenia na roku IV, dla Bloku Analiza Farmaceutyczna (poprzednio dla Fakultatywnego Bloku Programowego Fitochemia i Fitoterapia) dotyczące oznaczania kwasu rozmarynowego, metodą HPTLC w połączeniu z densytometrią, w preparatach rynkowych zawierających substancje roślinne z rodziny *Lamiaceae*.

Od roku akademickiego 2004/2005 byłam kierownikiem ćwiczeń w ramach przedmiotu Farmakognozja: od roku akademickiego 2004/2005 pracowni mikroskopowej, od roku 2006/2007, zarówno pracowni mikroskopowej jak i fitochemicznej, funkcję tę pełniłam do roku akademickiego 2011/2012.

W roku akademickim 2007/2008 byłam osobą odpowiedzialną za opracowanie egzaminu testowego z przedmiotu Farmakognozja.

Jestem bezpośrednim opiekunem 1-2 studentów rocznie w ramach Koła Naukowego przy Katedrze. Dwie moje studentki uzyskały mini granty studenckie.

Byłam bezpośrednim opiekunem dwudziestu prac magisterskich, z czego 4. zostały nagrodzone na Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich.

W latach 2011-2015 byłam recenzentem 11. prac magisterskich.

W 2007 roku recenzowałam prace magisterskie w ramach XLIV Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich, w grupie tematycznej Lek Pochodzenia Naturalnego.

W latach 2014 i 2015 zostałam zaproszona aby pełnić rolę recenzenta w ramach konferencji naukowej studentów Warsaw International Medical Congress, organizowanej przez Studenckie Towarzystwo Naukowe i Samorząd Studentów WUM.

W 2005 roku dostałam nagrodę Rektora Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny), zespołową dydaktyczną pierwszego stopnia.

Jestem również wysoko oceniana jako nauczyciel akademicki przez studentów, w ramach ankiety studenckiej, w latach 2011/2012, 2012/2013, 2013/2014 uzyskałam noty:

4,45, 4,81, 4,58 w 5 stopniowej skali.

W ramach szkolenia ciągłego farmaceutów wygłaszam wykład na temat interakcji i działań niepożądanych leków roślinnych.

W 2011 r. przeprowadziłam staż szkoleniowo-naukowy, z zakresu badań ilościowych związków flawonoidowych w wybranych gatunkach roślin z rodzaju *Potentilla* L. z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) w połączeniu z techniką densytometryczną, dr. n. farm. Michała Tomczyka z Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

W latach 1996-2006 prowadziłam ćwiczenia i wykłady na I i II stopniu kursu „Towaroznawstwo zielarskie” organizowanym przez Katedrę.

#### b) działalność dydaktyczna i popularyzatorska poza WUM

W latach 2002-2008 pracowałam w Technikum Farmaceutycznym w Medycznej Szkole Policealnej nr 2 w Warszawie, prowadziłam wykłady oraz zajęcia praktyczne z przedmiotu Farmakognozja.

Prowadziłam wykłady i ćwiczenia z zakresu fitoterapii oraz badania surowców roślinnych dla dzieci w ramach Uniwersytetu Dzieci.

Od września 2007 do stycznia 2009 – redaktor naczelna Farmastyle ISSN: 1898-6129, Medical Education, Warszawa. Głównym moim celem jako redaktora było dostarczenie farmaceutom pracującym w aptekach wiedzy opartej na najnowszych badaniach naukowych.

#### **Prace popularnonaukowe:**

1. Bazylko A., Odkrywamy naftochinony. Pau d'arco (Lapacho) i inne surowce bogate w naftochinony dostępne w Polsce, Farmastyle, 2007, vol.1 nr 2(2), 36-39.
2. Kiss A., Bazylko A., Tomczyk M., Leki roślinne działające na gruczoł krokowy, Farmastyle, cz. 1:, 2008, vol. 2 nr 1(3), 34-37.
3. Kiss A., Bazylko A., Tomczyk M., Leki roślinne działające na gruczoł krokowy, Farmastyle, cz. 2: 2008, vol. 2 nr 2(4), 30-33.
4. Kiss A., Bazylko A., Tomczyk M., Leki roślinne działające na gruczoł krokowy, Farmastyle, cz. 3:, 2008, vol. 2 nr 3(5), 32-35.
5. Bazylko A., Kiss A., Surowce roślinne o działaniu uspokajającym, Farmastyle, 2008, vol.2 nr 4(6), 32-38.

### 15. Recenzowanie publikacji w czasopismach

Występowałam w roli recenzenta 50. prac zgłoszonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines (1), Central European Journal of Biology (1), Chromatographia (5), Current Drug Targets (1), Industrial Crops and Products (13), Journal of Applied Biomedicine (1), Journal of Chromatography A (5), Journal of Food Composition and Analysis (2), Journal of Medicinal Plants Research (3), JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC (12), Molecules (1), Natural Product Research (1), Phytochemical Analysis (1), Phytotherapy Research (2), SpringerPlus (1).

### 16. Działalność organizacyjna

Rada Wydziału – delegat pracowników naukowo-dydaktycznych niebędących pracownikami samodzielnymi	1999-2002
Komisje Senackie: Dyscyplinarna Komisja ds. Studentów	1999-2002
Odwoławcza Dyscyplinarna Komisja ds. Studentów	2002-2005
	2005-2008
Wydziałowa Komisja ds. mini grantów studenckich oraz projektów młodego badacza	od 2014

W trakcie pracy w Komisji Dyscyplinarnej w jednej z rozpatrywanych spraw pełniłam funkcję Przewodniczącej Składu Orzekającego.

### 17. Pozostałe

Uczestniczyłam ponadto w pracach dotyczących opracowywania metodyki standaryzacji oraz oceny surowców i preparatów roślinnych: mieszanki ziołowe, kapsułki, przeciwbiegunkowa pasta lecznicza. Opracowałam także dwie monografie do FPVIII: *Species diureticae* i *Species metabolicae*.

