

mgr farm. Małgorzata Koltun-Jasion

**Poszukiwanie związków pochodzenia naturalnego w terapii
schorzeń o podłożu zapalnym**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Anna K. Kiss

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Agnieszka Filipek

Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

Realizacja tej pracy nie byłaby możliwa bez wsparcia i współdziałania wielu wspaniałych osób, którzy bez wątpienia zasługują na uznanie.

Składam serdeczne podziękowania **Pani Promotor, Prof. dr hab. n. farm. Annie Kiss** za ciągłą motywację do osiągnięcia samodzielności naukowej, opiekę promotorską, cenne uwagi merytoryczne, a przede wszystkim poświęcony czas, wyrozumiałość, cierpliwość oraz nieocenioną pomoc w przygotowaniu rozprawy doktorskiej.

Pragnę również podziękować całemu zespołowi **Katedry i Zakładu Biologii Farmaceutycznej** oraz **Pracowni Microbiota Lab – wszystkim Pracownikom i Doktorantom** za wspólnie spędzony czas, cenne wskazówki, życzliwość, dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem oraz okazaną pomoc. Serdecznie dziękuję **dr n. farm. Agnieszce Filipek**, za pomoc w analizach cytometrycznych, **dr n. farm. Andrzejowi Parzonko** za cenne rady dotyczące hodowli komórkowej.

Ogromne podziękowania składam także **Monice Marciniak, Sebastianowi Doktorowi, Sebastianowi Pelce, Pani Małgorzacie Lipowskiej** za pomoc techniczną oraz dobre słowo.

Serdecznie dziękuję **dr hab. n. farm. Małgorzacie Wrzosek** za możliwość realizacji badań dotyczących ekspresji genów, związanych z sygnalizacją TLR w Katedrze Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a także **dr hab. n. farm. Marcie Dudek** z Polskiej Akademii Nauk w Łodzi za możliwość realizacji analiz NMR.

Podziękowania składam również mojemu **Mężowi** oraz **Rodziom**, dziękując za niezłomną wiarę we mnie i wieloletnie wsparcie.

Małgorzata Kołtun-Jasion, Warszawa, 2023

Spis treści

Wykaz skrótów	9
Streszczenie w języku polskim.....	11
Streszczenie w języku angielskim.....	15
1. Wstęp.....	19
1.1. Charakterystyka roślin z rodziny Oleaceae	19
1.2. Charakterystyka rodzaju <i>Forsythia</i> Vahl.....	20
1.2.1. Występowanie.....	21
1.2.2. Charakterystyka botaniczna	22
1.2.3. Profil fitochemiczny.....	25
1.2.4. Działanie i wykorzystanie w terapii.....	28
1.3. Charakterystyka rodzaju <i>Fraxinus</i> L.	31
1.3.1. Występowanie.....	31
1.3.2. Charakterystyka botaniczna	32
1.3.3. Profil fitochemiczny.....	33
1.3.4. Działanie i wykorzystanie w terapii.....	33
1.4. Przewlekłe Choroby Niezakaźne	35
1.5. Rola komórek monocytów i makrofagów w przebiegu stanu zapalnego	39
1.5.1. Monocyty	39
1.5.2. Makrofagi.....	40
1.5.3. Udział komórek monocytów i makrofagów w patogenezie chorób o podłożu zapalnym.....	44
1.5.4. Interleukina 10 - kluczowy regulator odpowiedzi zapalnej	45
1.6. Rola monocytów i makrofagów w patogenezie miażdżycy	48
1.7. Receptory TLR	53
2. Cel badania i główne hipotezy badawcze.....	61
3. Materiały i metody	63
3.1. Materiały do badań fitochemicznych.....	63
3.2. Materiał roślinny do badań fitochemicznych oraz badań biologicznych	64
3.2.1. Przygotowanie ekstraktów octanowych do izolacji jednorodnych związków chemicznych.....	67
3.3. Metody badawcze	67
3.3.1. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS).....	67
3.3.2. Chromatografia kolumnowa (CC) i cienkowarstwowa (TLC)	68
3.3.3. Chromatografia preparatywna (HPLC-PREP).....	68
3.3.4. Hydroliza enzymatyczna.....	69
3.3.5. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).....	69
3.3.6. Przygotowanie roztworów wyciągów oraz związków do badań biologicznych	69
3.4. Odczynniki do badań w warunkach <i>in vitro</i>	70
3.4.1. Odczynniki do izolacji i hodowli komórkowych.....	70
3.4.2. Odczynniki do eksperymentów laboratoryjnych	70
3.4.3. Sprzęt laboratoryjny	73

3.5.	Modele komórkowe	74
3.6.	Metody badawcze	78
3.6.1.	Określenie stopnia ekspresji receptora CD68	78
3.6.2.	Ocena stopnia wydzielania dehydrogenazy mleczanowej	81
3.6.3.	Ocena ilości komórek barwionych jodkiem propidyny (PI)	82
3.6.4.	Ocena aktywności metabolicznej komórek w teście MTT	82
3.6.5.	Ocena stopnia wydzielanie mediatorów zapalnych metodą ELISA	83
3.6.6.	Ocena stopnia ekspresji IL-10R, metodą cytometrii przepływowej	85
3.6.7.	Ocena translokacji jądrowej NF- κ B p65 metodą cytometrii przepływowej	85
3.6.8.	Immunochemiczna detekcja białek metodą western blot	86
3.6.9.	Przygotowanie materiału komórkowego do oznaczeń immunochemicznych	88
3.6.10.	Izolacja mRNA z materiału komórkowego	92
3.6.11.	Przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji	93
3.6.12.	Zastosowanie metody real-time PCR do oznaczenia ekspresji panelu 84 genów z wykorzystaniem mikromacierzy RT2 Profiler PCR Array TLR	94
3.6.13.	Zastosowanie metody real-time PCR do oznaczenia ekspresji TNF- α , IL-6, MCP-1 z użyciem pojedynczych sond	97
3.6.14.	Ocena stopnia akumulacji cholesterolu metodą barwienia Oil Red O	98
3.6.15.	Analiza statystyczna oraz oprawa graficzna	99
4.	Omówienie wyników	101
4.1.	Analiza fitochemiczna wyciągów <i>F. suspensa</i> , <i>F. \times intermedia</i> , <i>F. europaea</i>	101
4.2.	Analiza fitochemiczna wyciągów oraz izolacja jednorodnych związków z roślin z rodziny Oleaceae	106
4.2.1.	Frakcjonowanie i analiza fitochemiczna wyciągu metanolowego z liści gatunku <i>Forsythia \times intermedia</i>	106
4.2.2.	Frakcjonowanie i analiza fitochemiczna wyciągu metanolowego z liści gatunku <i>Forsythia suspensa</i>	109
4.2.3.	Analiza fitochemiczna wyciągu wodnego (naparu) przygotowanego z liści gatunku <i>Fraxinus excelsior</i> i jego frakcji	110
4.2.4.	Izolacja związków z grupy lignanów, fenyloetanoidów i sekoirydoidów	112
4.3.	Określenie właściwości przeciwzapalnych wyciągów metanolowych, przygotowanych z liści dwóch gatunków forsycji	115
4.4.	Określenie właściwości przeciwzapalnych naparu i jego frakcji, przygotowanych z liści <i>Fraxinus excelsior</i>	119
4.5.	Ocena właściwości przeciwzapalnych związków z grupy sekoirydoidów, fenyloetanoidów, glikozydów fenylopropanoidowych oraz flawonoidów w modelu monocytów/makrofagów PBMC	124
4.6.	Ocena właściwości przeciwzapalnych związków z grupy lignanów w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC	130
4.7.	Ocena właściwości przeciwzapalnych związków z grupy lignanów, w modelu komórek makrofagów linii THP-1	136
4.8.	Ocena wpływu związków z grupy lignanów na regulację ścieżek sygnałowych MAPK	144
4.9.	Ocena wpływu arkytyny i arkytgeniny na modulację przekazywania sygnału za pośrednictwem receptorów TLR	147

4.10.	Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na ekspresję genów białek efektorowych i receptorów uczestniczących w funkcjach i sygnalizacji makrofagów	152
4.11.	Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na regulację ścieżki sygnałowej NF-κB.....	154
4.12.	Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na regulację ścieżek sygnałowych p38 oraz JNK 1/2 MAPK.....	158
4.13.	Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na regulację ścieżki sygnałowej ERK 1/2 MAPK	160
4.14.	Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na ekspresję genów kluczowych mediatorów zapalnych....	161
4.15.	Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na ekspresję genów dla IL-6, MCP-1 oraz TNF-α z wykorzystaniem pojedynczych sond	163
4.16.	Wizualizacja wpływu związków z grupy lignanów na procesy akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów	164
4.17.	Ocena wpływu związków z grupy lignanów na ekspresję białek receptorów CD36 i ABCA1 oraz HO-1 i szlaku Nrf2	165
5.	Dyskusja.....	169
6.	Wnioski	205
7.	Perspektywy i możliwe kierunki dalszych badań	206
8.	Wykształcenie oraz dorobek naukowy.....	207
9.	Spis rycin i tabel	213
10.	Wykaz literatury	217

Wykaz skrótów

AP-1	Czynnik transkrypcyjny AP-1; ang. <i>activator protein 1</i>	HDL	Lipoproteiny o wysokiej gęstości; ang. <i>high density lipoproteins</i>
ATCC	Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych; ang. <i>American Type Culture Collection</i>	HO-1	Oksygenaza hemowa 1; ang. <i>heme oxygenase-1</i>
BCA	Kolorymetryczny test oznaczania zawartości białka z wykorzystaniem kwasu bincynchinowego; ang. <i>Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit</i>	HRP	Peroksydaza chrzanowa; ang. <i>horseradish peroxidase</i>
BSA	Albumina z surowicy bydłowej; ang. <i>albumin from bovine serum</i>	IFN	Interferon; ang. <i>Interferon</i>
CD68	Receptor CD68; ang. <i>cluster of differentiation 68</i>	IKK	Kompleks o aktywności kinazy dla IκB; ang. <i>IκB kinase</i>
DAMPs	Struktury molekularne związane z uszkodzeniem, alarminy; ang. <i>Damage-associated molecular pattern</i>	IL-10	Interleukina 10; ang. <i>interleukin 10</i>
DMSO	Dimetylosulfotlenek; ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>	IL-10R	Receptor interleukiny 10; ang. <i>interleukin 10 receptor</i>
DPBS	Roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami, bez jonów Ca ²⁺ i Mg ²⁺ ; ang. <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>	IL-1β	Interleukina 1β; ang. <i>interleukin 1β</i>
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy; ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	IL-6	Interleukina 6; ang. <i>interleukin 6</i>
ELISA	Test immunoenzymatyczny; ang. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	IRF	Czynnik regulujący gen dla interferonu; ang. <i>Interferon regulatory factor</i>
EMA	Europejska Agencja Leków; ang. <i>European Medicines Agency</i>	JNK	Kinaza domeny N-końcowej białka Jun; ang. <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
ERK	Kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; ang. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>	LDH	Dehydrogenaza mleczanowa; ang. <i>lactate dehydrogenase</i>
ESI-MS	Spektrometria mas z jonizacją typu elektrosprej; ang. <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>	LDL	Lipoproteiny o niskiej gęstości; ang. <i>low density lipoproteins</i>
FBS	Bydłęca surowica płodowa; ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>	LPS	Lipopolisacharyd; ang. <i>Lipopolysaccharide</i>
FITC	Izotiocyjanian fluoresceiny; ang. <i>fluorescein isothiocyanate</i>	MAPK	Kinazy białkowe aktywowane mitogenem; ang. <i>Mitogen activated protein kinases</i>
GAPDH	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; ang. <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	MCP-1	Białko chemotaktyczne monocytów; ang. <i>Monocyte chemoattractant protein 1, CCL2</i>
		MetS	Zespół metaboliczny; ang. <i>Metabolic Syndrome</i>
		mRNA	matrycowy RNA, informacyjny RNA; ang. <i>messenger RNA</i>
		NCDs	Przewlekłe choroby niezakaźne; ang. <i>Noncommunicable diseases</i>
		NF-κB	Czynnik transkrypcyjny NF-κB; ang. <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
		NO	Tlenek azotu; ang. <i>nitric oxide</i>

Nrf2	Jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2; ang. <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>	TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina; ang. <i>Tetramethylethylenediamine</i>
PAMPs	Wzorce molekularne związane z patogenami; ang. <i>pathogen - associated molecular patterns</i>	TGF-β	Transformujący czynnik wzrostu β ; ang. <i>transforming growth factor β</i>
PBMCs	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej; ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>	THP-1	Monocytna linia komórkowa THP-1; ang. <i>Acute Monocytic Leukemia</i>
PCR	Łącuchowa reakcja polimerazy; ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	TNF-α	Czynnik martwicy nowotworu α ; ang. <i>tumor necrosis factor α</i>
PE	Fikoerytryna; ang. <i>phycoerythrin</i>	TLR	Receptor toll-podobny; ang. <i>Toll-like receptor</i>
PMA	12-Mirystynian-13-octan forbolu; ang. <i>phorbol 12-myristate-13-acetate</i>	WHO	Światowa Organizacja Zdrowia; ang. <i>World Health Organisation</i>
PMSF	Fluorek fenylometylosulfonylu; ang. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>		
PRRs	Receptory rozpoznawania wzorca; ang. <i>Pattern Recognition Receptors</i>		
Real-time PCR	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym; ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>		
RIPA	Bufor lizujący RIPA; ang. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>		
RNA	Kwas rybonukleinowy; ang. <i>Ribonucleic acid</i>		
ROS	Reaktywne formy tlenu; ang. <i>reactive oxygen species</i>		
RPM	Obroty na minutę; ang. <i>Revolutions Per Minute</i>		
RPMI 1640	ang. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium</i>		
SDS-PAGE	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących ang. <i>sodium do dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ;		
s.m	Sucha masa; ang. <i>dry matter</i>		
TBS	Roztwór soli fizjologicznej buforowany TRIS-em; ang. <i>tris buffered saline</i>		
TCM	Tradycyjna Medycyna Chińska; ang. <i>Traditional Chinese Medicine</i>		
TDM	Makrofagi różnicowane z komórek linii THP-1; ang. <i>THP-1 derived macrophages</i>		

Streszczenie w języku polskim

Według raportów Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organisation, WHO*) z 2023 roku, chroniczne choroby niezakaźne (ang. *Noncommunicable diseases, NCDs*) tj. schorzenia układu sercowo-naczyniowego, nowotwory, cukrzyca typu II, choroby autoimmunologiczne i neurodegeneracyjne są przyczyną 7 na 10 zgonów, co koresponduje z 41 milionami przypadków rocznie (w tym 17 milionom ludzi umierających przedwcześnie – przed 70 rokiem życia). Ponadto, istotnym problemem jest rosnący odsetek pacjentów (także wśród dzieci i młodzieży) doświadczających czynników ryzyka rozwoju NCDs tj. nadciśnienie, dyslipidemia, hiperglikemia, otyłość i wynikająca z niej insulinooporność, określane przez WHO pod ogólnym pojęciem Zespołu Metabolicznego (ang. *Metabolic syndrome, MetS, zespół X*).

Fundamentalną rolę w rozwoju NCDs przypisuje się powstawaniu ogólnoustrojowego, subklinicznego stanu zapalnego, określanego terminem „metazapalenia”, pierwotnie związanego z otyłością, wynikającą z niebilansowanej, wysoko przetworzonej diety, ubogiej w produkty pochodzenia roślinnego, ograniczonej aktywności fizycznej i dynamicznego rozwoju przemysłu, prowadząc do wielokładowych interakcji immunologicznych, tj. pobudzenia ścieżek sygnalizacji zapalnej i rozwoju stresu oksydacyjnego.

Rosnące zapotrzebowanie na zasoby systemu ochrony zdrowia oraz postępujące starzenie się społeczeństw generują stałą potrzebę wdrażania skutecznej profilaktyki ograniczającej rosnący odsetek zapadalności na chroniczne choroby niezakaźne. W związku z tym w ostatnich latach wiele uwagi poświęca się korelacji pomiędzy higieną stylu życia i prawidłowo zbilansowaną dietą, bogatą w produkty pochodzenia roślinnego, połączonej z racjonalną suplementacją.

Z uwagi na plejotropowe mechanizmy działania substancji naturalnych, wynikające z ich różnorodności strukturalnej, a także tworzenia licznych metabolitów pośrednich, o znamiennej aktywności biologicznej, surowce roślinne stanowią w ostatnich latach cenne źródło substancji wprowadzanych do lecznictwa lub stosowanych jako bazę do tworzenia nowych połączeń o potencjale terapeutycznym. Nie bez znaczenia wydaje się także fakt, że 80% populacji w krajach rozwijających się docenia wartość medycyny tradycyjnej jako elementu terapii, przy czym aż 40% preparatów farmaceutycznych w skali globalnej opiera się na produktach pochodzenia naturalnego. Pomimo wieloletniego wykorzystania niektórych substancji roślinnych w lecznictwie tradycyjnym, niedostateczna ilość badań przedklinicznych oraz klinicznych, a także brak standaryzacji na zawartość składników czynnych podważa

wiarygodność ich stosowania. Ponadto, wiele lokalnych źródeł surowców nie jest wykorzystywanych, z uwagi na nieznaną skład oraz ich potencjału terapeutycznego.

Pragnąc wpisać się w powyższy kontekst badawczy, **celem** niniejszej pracy była kompleksowa analiza składu fitochemicznego wyciągów, przygotowanych z liści 4 gatunków roślin z rodziny Oleaceae oraz izolacja jednorodnych związków chemicznych dominujących w ich składzie. **Celem** pracy była także szczegółowa ocena aktywności biologicznej wyciągów oraz pojedynczych związków, prowadząca do wytypowania grupy wtórnych metabolitów roślinnych o najwyższym potencjale przeciwzapalnym i wyjaśnienia molekularnych mechanizmów ich działania.

W toku analizy fitochemicznej LC-MS przeanalizowano skład wyciągów przygotowanych z liści 4 gatunków należących do rodziny Oleaceae, w tym 3 gatunków forsycji, zebranych w 2 różnych porach wegetacji oraz liści jesionu wyniosłego. Wysoka zawartość związków z grupy polifenoli w wyciągach przygotowanych z liści 3 z 4 badanych gatunków (liści forsycji zwisłej oraz forsycji pośredniej zebranych w maju, a także liści jesionu wyniosłego) była podstawą do przeprowadzenia izolacji jednorodnych związków z grupy lignanów, fenyletanoidów i sekoirydoidów.

Badania w warunkach *in vitro* przeprowadzono w modelu stymulowanych LPS komórek monocytów/makrofagów PBMC oraz komórek makrofagów TDM, różnicowanych z monocytarnej linii komórek THP-1. W toku niniejszej pracy oceniono m.in. cytotoxycność poszczególnych wyciągów roślinnych oraz pojedynczych związków, a także ich wpływ na stopień wydzielania mediatorów prozapalnych (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MPC-1) i przeciwzapalnych (IL-10, IL-10R, TGF- β) z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych ELISA i cytometrii przepływowej. Z uwagi na obiecujące wyniki badań przeprowadzonych dla szerokiego przekroju związków z grupy lignanów (19 struktur) oraz ich powszechną obecnością w produktach spożywczych i wielu surowcach naturalnych, w toku badań określono wpływ 7 najaktywniejszych struktur z tej grupy na modulację ekspresji ścieżek sygnałowych kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (ang. *Mitogen activated protein kinases*, MAPK) i jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *The Nuclear Factor kappa B*, NF- κ B) z użyciem metody western blot. Ponadto, oceniono wpływ dwóch najaktywniejszych struktur (arktyiny i arktygeniny) na modulację przekaźnictwa sygnału za pośrednictwem receptorów TLR w komórkach makrofagów stymulowanych roztworem bakteryjnego lipopolisacharydu z użyciem metody real-time PCR. Dla wybranych związków

z grupy lignanów oceniono ich wpływ na zmiany w procesach akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów, za pośrednictwem receptora CD36 oraz transporterów ABCA-1 z towarzyszącą sygnalizacją HO-1/Nrf-2.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej dowodzą wysokiej wartości formułacji przygotowanych z liści gatunków *Forsythia* (zebranych w porze wiosennej) oraz *Fraxinus*, w kontekście potencjalnej profilaktyki schorzeń o podłożu zapalnym. Przedstawione rezultaty mogą stanowić punkt wyjścia do poszerzonych badań epidemiologicznych, fitochemicznych i farmakologicznych, które w przyszłości mogłyby wyznaczyć potencjalne kierunki wprowadzenia liści forsycji do fitoterapii, a także innowacyjnego wykorzystania związków z grupy lignanów jako elementów żywności funkcjonalnej czy suplementów diety.

Słowa kluczowe: choroby niezakaźne, makrofagi, Oleaceae, lignany, fenyloetanoide, stan zapalny, cholesterol, miażdżyca,

Streszczenie w języku angielskim

According to the World Health Organization (WHO) reports from 2023, non-communicable diseases (NCDs) such as cardiovascular diseases, cancer, type II diabetes, autoimmune diseases, and neurodegenerative disorders account for 7 out of 10 deaths, corresponding to 41 million cases annually (including 17 million premature deaths - before the age of 70). Additionally, a significant issue is the increasing percentage of patients (including children and adolescents) experiencing risk factors for NCDs development, such as hypertension, dyslipidemia, hyperglycemia, obesity, and insulin resistance, collectively referred to as the Metabolic Syndrome (MetS or Syndrome X).

The development of systemic, subclinical inflammation, termed "meta-inflammation", is attributed to playing a fundamental role in NCDs. This condition is originally associated with obesity resulting from an unbalanced, highly processed diet, low in plant-derived products, limited physical activity, and the dynamic development of the industry, leading to multifaceted immunological interactions, including the stimulation of inflammatory signaling pathways and the oxidative stress development.

The increasing demand for healthcare resources and the ongoing aging of populations create a constant need for effective preventive measures to reduce the growing incidence of NCDs. Consequently, in recent years, much attention has been devoted to the correlation between lifestyle hygiene and a well-balanced diet rich in plant-derived products, coupled with rational supplementation.

Due to the pleiotropic mechanisms of action of natural substances arising from their structural diversity and the formation of numerous metabolites with significant biological activity, plant resources have become valuable sources of substances introduced into medicine or used as a basis for creating new compounds with therapeutic potential. 80% of the population of developing countries rely on traditional medicine for their primary health care needs. This correlates with the fact that 40% of pharmaceutical preparations come from natural products, which emphasizes the importance of substances of plant origin.

Despite the long-term use of some plant substances in traditional medicine, the credibility of their application is undermined by insufficient preclinical and clinical research and the lack of standardization for the content of active ingredients. Furthermore, many local sources of raw materials remain untapped due to a lack of knowledge about their phytochemical composition and therapeutic potential.

The aim of the study was a comprehensive phytochemical analysis of the leaves of four species from the Oleaceae family, leading to the isolation of predominant compounds, as well as the assessment of the mechanisms of anti-inflammatory activity of extracts and individual structures.

During the LC-MS analysis, the composition of extracts prepared from the leaves of four Oleaceae family species, including three *Forsythia* species collected at two different vegetation periods and the leaves of common ash, was analyzed. Three plant species with significant levels of polyphenolic compounds were identified, allowing for the isolation of compounds from the groups of lignans, phenylethanoids, and secoiridoids.

In vitro studies were conducted using a model of LPS-stimulated PBMC monocyte/macrophage cells and TDM macrophages, differentiated from the THP-1 monocytic cell line. The work assessed, the cytotoxicity of individual plant extracts and single compounds, as well as their impact on the secretion of pro-inflammatory (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MPC-1) and anti-inflammatory mediators (IL-10, IL-10R, TGF- β) using ELISA immunoassays and flow cytometry. Due to promising results, obtained for a wide range of lignan compounds (19 structures) and their widespread presence in food products and many natural raw materials, their impact on Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and NF- κ B signalling pathways was determined using the western blot method. Furthermore, the influence of the two most active structures (arctiin and arctigenin) on the modulation of signal transduction through TLR receptors in LPS-stimulated macrophages was assessed using real-time PCR. Additionally, I assessed the impact of 7 lignans on the processes of cholesterol accumulation in macrophages by evaluating the expression of CD36 and ABCA1 proteins, along with associated pathways.

Obtained results demonstrate the high value of formulations prepared from the leaves of *Forsythia* species (collected in spring) and ash leaves, in the context of potential prevention of inflammatory-based diseases. The presented results may serve as a basis for further analyses regarding the introduction of *Forsythia* leaves into phytotherapy and the utilization of lignans as components of functional food or dietary supplements.

Keywords: Noncommunicable diseases, macrophages, *Oleaceae*, lignans, phenylethanoids, inflammation, cholesterol, atherosclerosis

1. Wstęp

1.1. Charakterystyka roślin z rodziny Oleaceae

Rodzina Oliwkowatych (Oleaceae Hoffmanns. & Link), należąca do nadklasy okrytonasiennych systematyzuje 30 rodzajów, obejmujących 900 dotychczas scharakteryzowanych gatunków (baza danych Kew Garden: <https://powo.science.kew.org>, dostęp dnia: 13.11.2023) [1,2]. Rośliny z tej grupy, głównie drzewa i krzewy liściaste są rozpowszechnione na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy, zajmując ekosystemy klimatu umiarkowanego i tropikalnego obu półkul, w szczególności wschodnich obszarów Azji, basenu morza Śródziemnego oraz flory Europy Środkowo-Wschodniej. Nazwa rodziny wywodzi się od łacińskiej nazwy rodzaju – *olea*, tłumaczonej jako „drzewo oliwne, oliwka”.

Rodzina Oliwkowatych obejmuje rodzaje o szczególnym znaczeniu gospodarczym i ekologicznym. Rośliny z rodziny Oleaceae wykazują istotną rolę w przemyśle spożywczym (np. *Olea europaea* L. jako roślina jadalna i oleista, *Fraxinus ornus* L. jako komercyjne źródło manny), meblarskim (gatunki z rodzaju *Fraxinus* Tourn. ex L. np. *Fraxinus mandshurica* Rupr., *Fraxinus excelsior* L. oraz *Olea* L. np. *Olea dioica* Roxb. i *Olea robusta* (Roxb.) Sweet), farmaceutycznym (gatunki z rodzaju *Forsythia* Vahl, *Fraxinus*, *Ligustrum* L., *Olea*), perfumeryjnym (np. gatunki z rodzaju *Jasminum* L.), a także jako drzewa i krzewy ozdobne (np. gatunki z rodzaju *Forsythia*, *Ligustrum*, *Syringa* L.) [2-4].





Współcześnie, gatunki z rodziny oliwkowatych dostarczają kilku rodzajów substancji roślinnych wykorzystywanych w fitoterapii takich jak kwiaty, owoce, liście oraz w mniejszej ilości przypadków korę czy korzenie. Według doniesień etnofarmakologicznych substancje pozyskiwane z rodziny oliwkowatych posiadają szerokie spektrum aktywności biologicznej wynikające z obecności metabolitów wyspecjalizowanych tj. flawonoidy, sekoiridoidy, monotereny, kumaryny, lignany oraz fenyloetanoidey, których zróżnicowana zawartość przedkłada się na wielokierunkowe właściwości terapeutyczne np. wiodące działanie antyoksydacyjne czy przeciwzapalne [3].

Gatunki roślin z rodziny oliwkowatych są nieodzowną częścią Tradycyjnej Medycyny Azjatyckiej w tym Tradycyjnej Medycyny Chińskiej (ang. *Traditional Chinese Medicine*, TCM), Japońskiej i Koreańskiej [5]. Szczególną popularnością cieszą się owoce gatunku *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl, od 2 tysięcy lat cenione m.in. jako środek oczyszczający, napotny, przeciwdrobnoustrojowy, ze wskazaniem w leczeniu przeziębień, grypy czy stanów alergicznych. W skład tradycyjnych, chińskich mieszanek ziołowych wchodzi także surowce

roślinne rodzaju *Syringa*, wymieniane jako element terapii schorzeń przewodu pokarmowego (np. biegunek), a także kuracji wspomagającej leczenie stanów zapalnych górnych dróg oddechowych [6]. Z uwagi na charakterystyczną zawartość kumaryn, specyficzną dla rodzaju *Fraxinus*, potencjalne działanie hipoglikemizujące nasion jesionu wyniosłego znalazło zastosowanie jako składnik wspomagającej terapii cukrzycy w tradycyjnej medycynie marokańskiej [7]. Na terenie Europy szczególnie rozpowszechnionym gatunkiem tej rodziny jest oliwka europejska (*Olea europaea* L.), znana z właściwości hipotensyjnych preparatów przygotowanych z liści czy z antyoksydacyjnego działania oliwy, pozyskanej z owoców. Ze względu na znaczną zawartość związków z grupy polifenoli, szczególną uwagę zwraca także przeciwzapalne działanie oliwki europejskiej, kluczowe w terapii chorób przewlekłych tj. choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby neurodegeneracyjne oraz zespół metaboliczny [4,8].

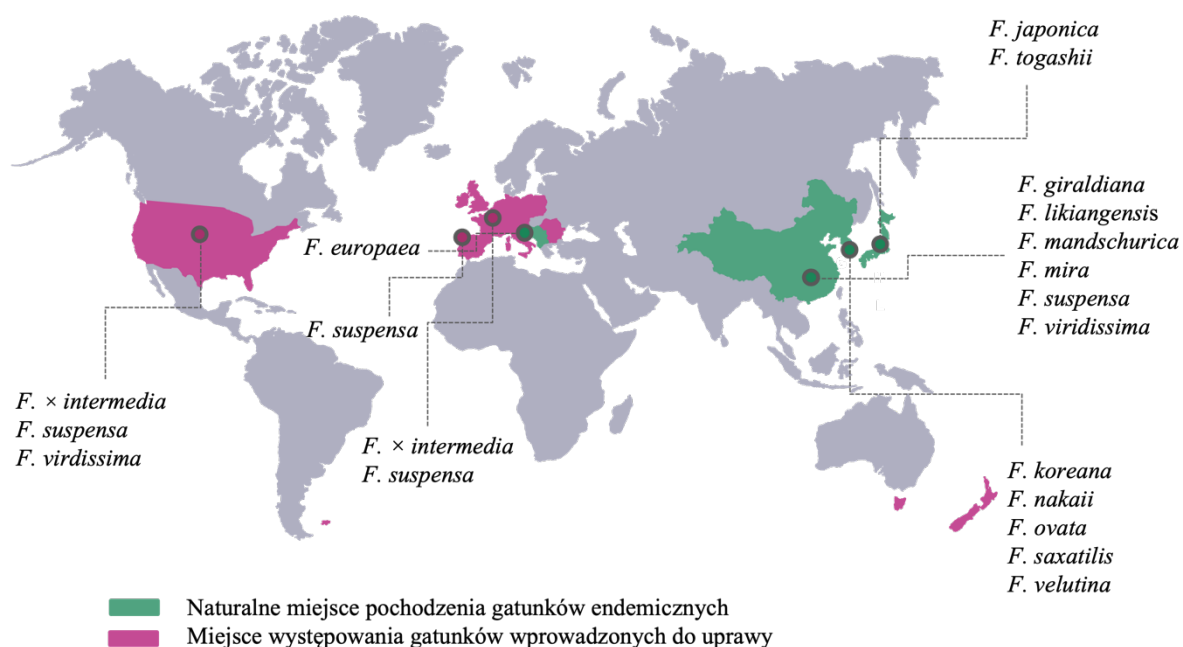
Najczęstsze wskazania terapeutyczne wymieniane dla przedstawicieli roślin z rodziny Oliwkowatych, wynikające m.in. z monografii Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA), wraz z krótkim wyszczególnieniem grup związków dominujących w poszczególnych rodzajach przedstawiono w poniższej tabeli (**tabela 1**) [3,9,10]. W kolejnych rozdziałach zaprezentowano także krótką charakterystykę dwóch rodzajów z rodziny Oleaceae, którym poświęcono szczególną uwagę w ramach realizacji niniejszej pracy.

Tabela 1: Charakterystyka gatunków należących do rodziny oliwkowatych (Oleaceae).
Źródło fotografii: Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org/>.

	<i>Olea</i> L.	<i>Forsythia</i> Vahl	<i>Fraxinus</i> Tourn. ex L.	<i>Syringa</i> L.
Przedstawiciele rodzaju	<i>Olea europaea</i> L.	<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl <i>Forsythia europaea</i> Degen & Bald. <i>Forsythia x intermedia</i> Zabel	<i>Fraxinus excelsior</i> L. <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl <i>Fraxinus acutifolia</i> Dippel <i>Fraxinus ornus</i> L.	<i>Syringa vulgaris</i> L. <i>Syringa tomentella</i> Bureau&Franch. <i>Syringa persica</i> L. <i>Syringa oblata</i> Lindl.
Surowce stosowane w terapii	liść, owoc	liść, owoc, kwiat	liść, kora	liść, kwiat
Grupy związków dominujących w składzie	Fenyletanoidy, flawonoidy, sekoirydoidy, kwasy fenolowe	Flawonoidy, lignany, irydoidy, fenyloetanoidy, kwasy fenolowe	Sekoirydoidy, fenyloetanoidy, flawonoidy, kumaryny	Sekoirydoidy, irydoidy, fenyloetanoidy, flawonoidy, lignany
Wskazania terapeutyczne według monografii EMA	Wspomaganie nerkowej eliminacji wody (liść)	Brak monografii	Łagodne stany bólowe, dysfunkcje układu moczowego (liść)	Brak monografii
Przykładowe ilustracje surowców reprezentujących wybrany rodzaj				
	Liść owocu oliwki europejskiej	Kwiat forsycji żółtej	Liść jesionu wyniosłego	Kwiat lilaka pospolitego

1.2.1. Występowanie

Rodzaj *Forsythia* Vahl zawiera 27 gatunków (w tym 13 gatunków endemicznych) i ich mieszańców, szeroko rozpowszechnionych w rejonach Ameryki Północnej oraz większości krajów europejskich, przy największej różnorodności gatunkowej zachowanej na terenie Azji Wschodniej – sześć gatunków natywnych rozmieszczonych na terenie Chin (*F. giraldiana* Lingelsh., *F. likiangensis* Ching & Feng, *F. mandschurica* Uyeki, *F. mira* M.C. Chang, *F. suspensa* Thunb. Vahl i *F. viridissima* Lindl.), cztery w Korei (*F. koreana* Nakai, *F. ovata* Nakai, *F. saxatilis* i *F. velutina* Nakai) i dwa w Japonii (*F. japonica* Makino i *F. togashii* Hara). Rodzimy, europejskim przedstawicielem gatunku *Forsythia* jest *Forsythia europaea* Degen & Bald. występująca natywnie jedynie na terenie Albanii i Kosowa, w obszarze basenu Morza Adriatyckiego, wymieniana w opracowaniach taksonomicznych jako gatunek rzadki [11]. Z kolei *Forsythia ovata* w 2015 roku, została zaklasyfikowana do kategorii gatunków zagrożonych i wpisana na czerwoną listę Międzynarodowej Unii Ochrony Przyrody (ang. *The International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species*, IUCN) [12]. Poniższa mapa prezentuje rozmieszczenie 13 gatunków endemicznych z rodzaju *Forsythia*, jak również miejsca występowania gatunków wprowadzonych do uprawy (**rycina 1**).



Rycina 1: Rozmieszczenie rodzaju *Forsythia* Vahl.

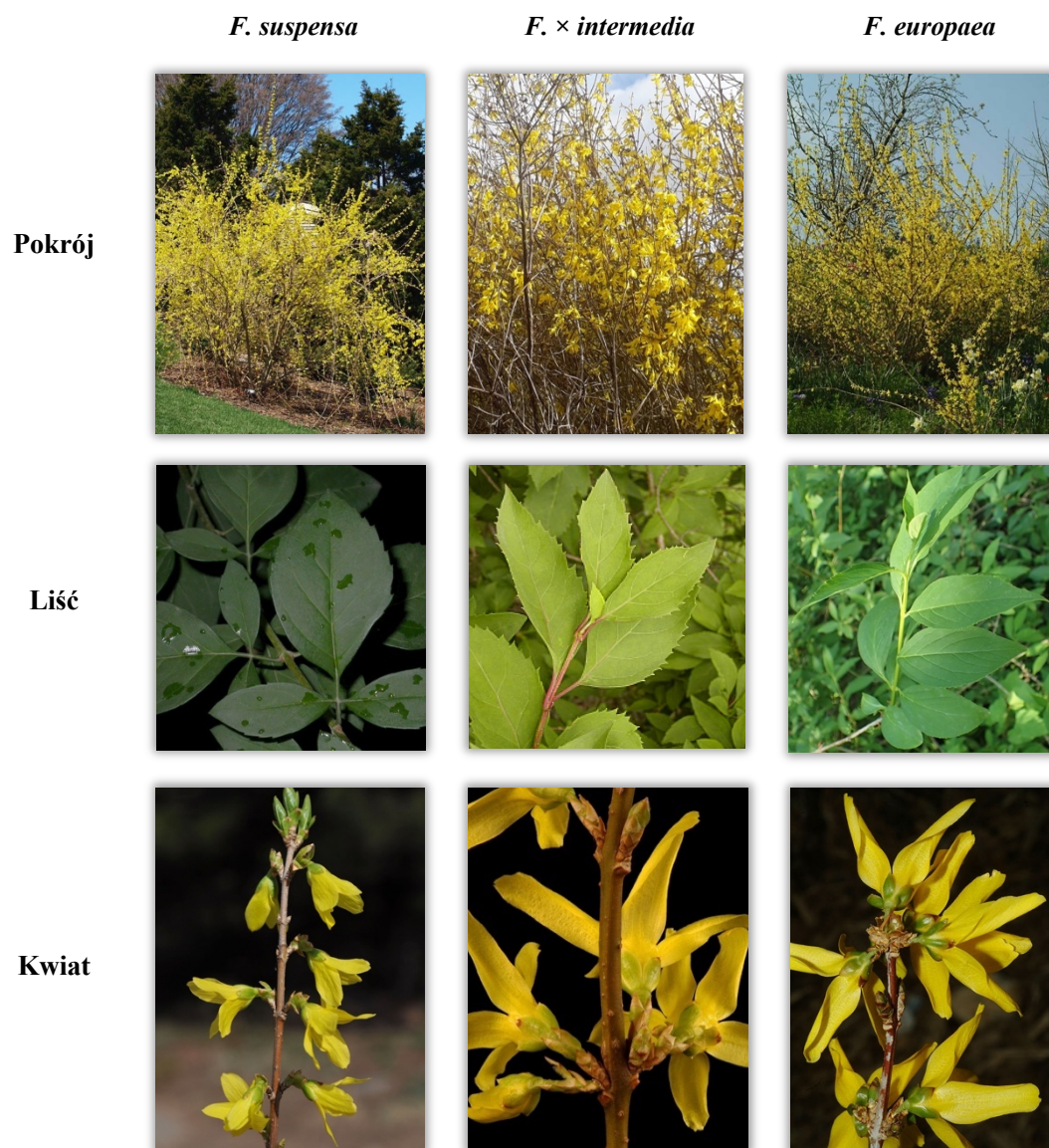
Opracowanie własne na podstawie: Royal Botanic Gardens (<https://powo.science.kew.org>) oraz Global Biodiversity Information Facility (<https://www.gbif.org/>), dostęp dnia: 13.11.2023.

W powszechnej uprawie istnieje także wiele odmian ogrodowych gatunku *Forsythia* powstałych na drodze selekcji siewek lub w wyniku formowania krzyżówek międzygatunkowych. Najpowszechniej występującym mieszańcem międzygatunkowym są liczne odmiany gatunku forsycja pośrednia (*Forsythia* × *intermedia*) tj. *F.* × *intermedia* 'Golden leaf', *F.* × *intermedia* 'Farrand Hybrids', *F.* × *intermedia* 'Karl Sax', *F.* × *intermedia* 'Spectabilis', *F.* × *intermedia* 'Spring Glory' i inne, powstałe w wyniku skrzyżowania forsycji zwisłej (*F. suspensa* var. *fortunei*) odznaczającej się największym zasięgiem geograficznym spośród wszystkich gatunków oraz forsycji zielonej (*F. viridissima*) i forsycji koreańskiej (*F. ovata*). Zasięg występowania forsycji pośredniej obejmuje naturalne siedliska wspólnego występowania gatunków rodzicielskich. W Polsce rośliny z rodzaju *Forsythia* znaleźć można m.in. w Arboretum SGGW w Rogowie (*F. suspensa*, *F.* × *intermedia*) oraz Instytucie Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku (polska odmiana *Forsythia* 'Maluch' – mieszańiec *F. koreana* i *F.* × *intermedia*) [13].

1.2.2. Charakterystyka botaniczna

Rośliny z rodzaju *Forsythia* są niewielkimi krzewami pnącymi. Ze względu na charakterystyczny żółty kolor kwiatów spotykane są jako kwitnące wczesną wiosną krzewy ozdobne, osiągające od 1,5 do 3 metrów wysokości. W obszarze europejskiego klimatu umiarkowanego (w przeciwieństwie do obszaru Azji) rośliny tych gatunków nie wytwarzają owoców, z uwagi na wczesny okres kwitnienia, pokrywany się z występowaniem niskich, wczesnowiosennych temperatur oraz niewielką aktywnością owadów. W polskiej strefie klimatycznej cechują się całkowitą mrozoodpornością [13,14]. Rośliny tego rodzaju swoją niezwykłą popularność i powszechność występowania zawdzięczają przede wszystkim łatwości rozmnażania wegetatywnego zarówno przez sadzonki zdrewniałe jak i zielne. Powszechnie zasiedlają rejony parków miejskich i ogrodów, tworząc krzewiaste drzewostany na zboczach, dolinach i wąwozach [13,14]. Występujące powszechnie w Europie gatunki *Forsythia* × *intermedia*, *Forsythia suspensa*, *Forsythia viridissima* oprócz słonecznego miejsca bytowania, nie posiadają specjalnych wymagań stanowiskowych czy glebowych, odznaczając się wysokim stopniem tolerancji na zimno i suszę [15].

W poniższej tabeli (**tabela 2**) przedstawiono krótką charakterystykę botaniczną 3 gatunków rodzaju *Forsythia* analizowanych w ramach realizacji niniejszej pracy, a także krótki przegląd ilustracji pokroju oraz wybranych części morfologicznych gatunków *F. suspensa*, *F.* × *intermedia* oraz *F. europaea* (**rycina 2**).



Rycina 2: Wybrane części morfologiczne gatunków *F. suspensa*, *F. × intermedia* oraz *F. europaea*.
 Źródło fotografii: Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org/>.

Tabela 2: Charakterystyka morfologiczna wybranych gatunków rodzaju *Forsythia* [13,14].

CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA			
	<i>Forsythia suspensa</i>	<i>Forsythia × intermedia</i>	<i>Forsythia europaea</i>
	Niewielkie krzewy liściaste, sięgające 1,5 - 5 metrów wysokości.		
Pokrój	Częściowo odgięte na boki lub cienkie zwisające ku ziemi pędy.	W zależności od odmiany pędy częściowo wzniesione ku górze, niekiedy rozchylone na boki.	Pędy wzniesione ku górze.
Liść	Błaszka liściowa jajowata lub wąskojajowata, z podstawą zaokrągloną do klinowatej, wierzchołek ostry. Liście pojedyncze, czasem dwu lub trójlistkowe (-klapowe), piłkowane. Obie strony liścia koloru matowo zielonego, czasami owłosione, częścię nagie.	Liście wąskojajowate lub lancetowate, o długości 8 - 12 cm, piłkowane powyżej 1/3 swojej długości (z wyjątkiem nasady blaszki). Obie strony liścia koloru ciemnozielonego. Liście naprzeciwległe, głównie pojedyncze, trójlistkowe lub klapowane na silnych pędach.	Liście jajowate, jajowato - lancetowate, u podstawy zaokrąglone, lub szeroko-klinowate. Błaszka liściowa zazwyczaj całobrzega, powierzchnia liścia nieomszona lub słabo owłosiona na spodniej stronie blaszki.
Kwiat	Kwitnienie bardzo obfite, poprzedzające rozwój liści. Kwiaty obupłciowe, krótko lub długosłupkowe. Płatki korony żółte, złoto-żółte, jajowate, płaskie, pojedyncze, rosnące w kątach liści, łukowato rozchylone. Działki kielicha liczne, o równej długości z płatkami korony.	Kwitnienie bardzo obfite, poprzedzające rozwój liści. W klimacie europejskim, umiarkowanym kwitnienie przypada na okres marzec-kwiecień, z wyjątkiem forsycji europejskiej, kwitnącej najczęściej w miesiącach maj - czerwiec. Płatki korony jasno lub ciemnożółte, skręcone, z podwiniętym brzegiem. Działki kielicha liczne, krótsze od płatków korony. Kwiaty długo lub krótkosłupkowe.	Kwitnienie bardzo obfite, poprzedzające rozwój liści. Kwiaty krótkoszypułkowe, rozmieszone pojedynczo. Płatki korony żółte, dość wąskie. Pączki kwiatowe często otwierają się równocześnie z pączkami liściowymi.
Owoc	Owoce twarde lub skórzaste, o kształcie wydłużonych, dwuklapowych, jajowatych torebek. Torebka zazwyczaj sucha, zaostzona u nasady, o powierzchni brodawkowatej (<i>F. suspensa</i>) lub gładkiej (<i>F. europaea</i>), pękająca podłużnie na dwie części. Okres dojrzewania owoców: lipiec – wrzesień. Smak: gorzki. Nasiona liczne, oskrzydłone, żółtozielone do brązowych.		
Łodyga	Łodyga pokryta oliwkowobrazowym korkiem. Rdzeń blaszkowaty lub zanikający, o pustych międzywęzłach. Pędy pokryte brodawkowatymi przetchlinkami.	Rdzeń krótkopędów komorowy, w węzłach wypełniony, międzywęzła puste, ze śladami przegród poprzecznych. Pędy pokryte licznymi przetchlinkami.	Łodyga pokryta korkiem koloru zielonego lub zielono - żółtego. Rdzeń komorowy występuje na całej długości łodygi.

1.2.3. Profil fitochemiczny

Związkami biologicznie aktywnymi, występującymi w rodzaju *Forsythia* są w głównej mierze związki z grupy polifenoli, w tym flawonoidy, fenyloetanoidy, lignany, kwasy kawoilochinowe, a także związki z grup terpenoidów (triterpeny i diterpeny) oraz pochodne cykloheksyloetanolu, tworzące zróżnicowane profile w poszczególnych organach, co zostało podsumowane w poniższej tabeli (**tabela 3**).

Gatunek *Forsythia suspensa* jest opisywany jako źródło 237 związków czynnych, w tym około 46 lignanów i 31 fenyloetanoidów, 11 flawonoidów, a także znaczącej ilości pochodnych terpenowych i innych metabolitów wyspecjalizowanych [16]. Badania metabolomiczne potwierdzają jednak różnice w profilu jakościowym, względnej zawartości substancji czynnych i idącym za tym potencjale terapeutycznym w poszczególnych organach roślinnych, w zależności od fazy rozwoju, technik i warunków uprawy oraz czasu zbioru surowca, w obrębie tego samego gatunku [15,17]. Potwierdzenie różnic w składzie jakościowym różnych części morfologicznych *F. suspensa* było przedmiotem licznych badań, w których oceniano m.in. zawartość jednego z głównych związków z grupy lignanów - filiryny w zależności od badanego organu, przy czym najwyższa zawartość lignanu została stwierdzona w liściach (2,6%), kwiatach (1,5%) i owocach (1,3%), a najniższa w korzeniach (0,7%) i korze (0,7%) [18]. Zainteresowanie naukowców rodzajem *Forsythia* pozwoliło także na ocenę zawartości poszczególnych grup dominujących metabolitów wyspecjalizowanych w poszczególnych organach roślinnych, w zróżnicowaniu na poszczególne gatunki. Najwyższą zawartość sumy lignanów zidentyfikowano w kwiatach forsycji pośredniej (9,4%), wskazując przy tym na wyraźną dominację obecności arktyny (8,5%) w badanym wyciągu metanolowym [5], przy niemal całkowitym braku jej obecności w wyciągu metanolowym przygotowanym z liści *F. suspensa* [19].

Rodzaj *Forsythia* charakteryzuje się także znamieną zawartością związków z grupy fenyloetanoidów, takich jak werbaskozyd (syn. akteozyd), forsytozyd A, a także ich β -hydroksylowych pochodnych tj. suspensazyd (forsytozyd C). W owocach gatunku *F. suspensa* obecne są także forsytozydy H-J, forsytenzydy M-N oraz rengiozydy D-E [16,20]. Analiza zawartości forsytozydu A w poszczególnych organach *F. suspensa*, wykazała, że głównym jego źródłem jest kora (7,4%), a także liście i kwiaty z zawartością odpowiednio 3,17% i 3,16% [18].

Analiza metanolowych ekstraktów przygotowanych z kwiatów forsycji pośredniej pozwoliła na potwierdzenie znamiennej ilości związków z grupy kwasów kawoilochinowych,

w tym kwasu chlorogenowego, którego zawartość w zakresie 9,7 - 22,6 mg/g s.m. (1,0 - 2,3%) została także oznaczona w alkoholowych ekstraktach przygotowanych z liści forsycji zwisłej, forsycji zielonej oraz kilku gatunkach forsycji pośredniej (*F. × intermedia* 'Zabel', *F. × intermedia* 'Goden Nugget', *F. ovata* 'Robusta', *F. ovata* 'Tetragold') [21].

Grupą metabolitów wyspecjalizowanych, których obecność została wielokrotnie opisana w surowcach pochodzących z gatunków rodzaju *Forsythia* są pochodne triterpenów. Analiza składu ekstraktu etanolowego liści gatunku *F. suspensa* pozwoliła na wyodrębnienie 8 wiodących pochodnych triterpenowych, takich jak np. kwas ursolowy, kwas alfitolowy oraz betulinę, a także ich polihydroksylowych pochodnych oraz form glikozydowych np. kwas eskuletynowy, kwas betulinowy, kwas korsolidowy, suspensanozydy A-C [22,23].

Analiza UHPLC-PDA-ESI-MS³ ekstraktów metanolowych pozyskanych z kwiatów forsycji zwisłej oraz kwiatów forsycji pośredniej wskazywała na obecność rutyny jako wiodącej pochodnej flawonoidowej, której zawartość w kwiatach badanych gatunków oznaczono odpowiednio na poziomie 57,6 oraz 42,3 mg/g s.m. (5,8 i 4,2%) surowca. W badanych ekstraktach wykazano także znamienne zawartość *O*-heksozydu rutyny, *O*-heksozyloramnozydu kwercetyny, *O*-ramnozyloheksozydu kemferolu oraz *O*-feruiloramnozydu trimetoksykwercetyny [21].

Wiele badań podkreśla jednak sezonową zmienność w zawartości składników polifenolowych w surowcach zebranych na poszczególnych etapach rozwoju roślin należących do rodzaju *Forsythia*. Analiza składu wodnych ekstraktów z liści forsycji zwisłej, zebranych w okresie wegetacji od kwietnia do października wskazywała na najwyższą zawartość kwasu chlorogenowego (6,1%) oraz forsytozydu A (7,8%) podczas oceny składu surowca zebranego wczesną wiosną. Podobną zależność zaobserwowano dla rutyny, której poziom oznaczony został na poziomie 1,0 - 2,8%, z najwyższym dla surowca zebranego w kwietniu [24].

Zmiany w zawartości składników aktywnych w zależności od pory wegetacji zostały określone także dla owoców forsycji. Z uwagi na ich powszechne wykorzystanie w Tradycyjnej Medycynie Azjatyckiej, wiele badań wskazuje na istotnie wyższą zawartość niektórych metabolitów np. forsytozydu A, filiryny i rutyny w owocu niedojrzałym (zielonym, *Qing qiao*, UFF), częściej stosowanym w TCM, w porównaniu do owoców dojrzałych (żółtych, *Lao qiao*, RFF). Pomimo wspólnej monografii farmakopealnej – *Forsythiae Fructus*, ze względu na różne czasy zbiorów wyróżnia się je jako dwa odrębne surowce, zbierane odpowiednio na początku września i października [25].

Tabela 3: Charakterystyka fitochemiczna wybranych gatunków rodzaju *Forsythia*.

Gatunek	Surowiec	Związki dominujące	Grupa chemiczna	Metoda identyfikacji	Źródło
<i>Forsythia suspensa</i>	Liść	Forsytozyd A-B Rutyna, 3- <i>O</i> -glukozyd kwercetyny Kwas chlorogenowy 4- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -acetylo)- β -D-glukozyd filigeniny, filigenina β -D-glukozyd pinorezynolu, (+)-pinorezynol	Fenyloetanoidy Flawonoidy Kwasy fenolowe Lignany	LC-MS/MS, HPLC-ESI-MS, ¹ H NMR, ¹³ C NMR	[18,24,26]
	Kwiat	Rutyna β -D-glukozyd pinorezynolu 4- <i>O</i> - β -D-glukozyd filigeniny	Flawonoidy Lignany	UHPLC-PDA-ESI-MS ³	[5,21]
	Owoc	Suspensiazyd A, forsytozyd A-J, forsytyalanzyd A-D, forsytyalan A-B, forsytoneozyd E-F Rengyol/izorengyol 4- <i>O</i> - β -D-glukozyd laricirezynolu, laricirezynol 8'-hydroksypinorezynol, 4'- <i>O</i> - β -D-glukozyd-8'-hydroksypinorezynolu, 7'-epi-8-hydroksypinorezynol, (+)-pinorezynol 4- <i>O</i> - β -D-glukozyd filigeniny Kwas betulinowy, kwas oleanolowy, kwas ursolowy	Fenyloetanoidy Lignany Triterpeny	HPLC-ESI-MS ¹ H NMR, ¹³ C NMR, ¹ H- ¹ H COSY, HSQC, NOESY, ESI-MS, HMBC	[27-31]
<i>Forsythia × intermedia</i>	Liść	Akteozyd, forsytozyd A-B 4- <i>O</i> - β -D-glukozyd filigeniny, (+)-filigenina β -D-glukozyd pinorezynolu, (+)-pinorezynol 4- <i>O</i> - β -D-glukozyd epipinorezynolu, (+)-epipinorezynol 4- <i>O</i> - β -D-glukozyd matairezynolu, (-)-matairezynol Arktyina, (-)-arktygenina Rutyna	Fenyloetanoidy Lignany Flawonoidy	HPLC-ESI-MS ¹ H NMR, ¹³ C NMR	[5,32,33]
	Kwiat	Rutyna β -D-glukozyd pinorezynolu, arktyina	Flawonoidy Lignany	UHPLC-PDA-ESI-MS ³	[21]
<i>Forsythia europaea</i>	Liść	Forsytozyd A-B 4- <i>O</i> - β -D-glukozyd filigeniny, filigenina β -D-glukozyd pinorezynolu, (+)-pinorezynol Rutyna, 3- <i>O</i> -glukozyd kwercetyny	Fenyloetanoidy Lignany Flawonoidy	UHPLC-ESI-MS ¹ H NMR, ¹³ C NMR	[34]
	Owoc	Akteozyd, izoakteozyd Rutyna	Fenyloetanoidy Flawonoidy		

1.2.4. Działanie i wykorzystanie w terapii

Pierwsze doniesienia opisujące właściwości terapeutyczne roślin należących do rodzaju *Forsythia* odnotowano ponad 2 tysiące lat temu w opisach medycyny chińskiej. Najstarszą znaną pozycją potwierdzającą stosowanie gatunku *Forsythia suspensa* w leczeniu gorączki i stanów zapalnych jest pierwsze wydanie farmakopei światowej, znane pod nazwą „Tang Ben Cao”, pochodzące z 659 r. n.e [35].

Szczególnie cenionym surowcem są owoce gatunku *Forsythia* mające wieloletnią tradycję stosowania w medycynie ludowej krajów Dalekiego Wschodu tj. Chiny, Korea czy Japonia. Obecnie preparaty z owoców forsycji są popularnym składnikiem, stosowanym w ramach Tradycyjnej Medycyny Wschodniej w leczeniu między innymi róży, rzeżączki, zapalenia gardła, gorączki, zapalenia migdałków, ostrego zapalenia nerek czy owrzodzeń [36]. O szczególnej popularności surowca może świadczyć fakt, że w wydaniu Farmakopei Chińskiej z 2015 roku zostało opisanych aż 114 preparatów, dostępnych na rynku azjatyckim, zawierających wysuszony owoc forsycji, stosowany w TCM. Ponadto, owoc forsycji jest jednym z głównych składników „Bofutsushosan” (BOFU), niezwykle popularnego w Japonii leku „Kampo”, zalecanego w terapii otyłości [37,38]. Stosowanie wywarów z wysuszonych owoców forsycji jest jednym z najlepiej poznanych w chińskiej medycynie ludowej sposobów zwalczania przeziębienia, grypy i stanów kataralnych [39]. W medycynie azjatyckiej owoce forsycji znajdują także zastosowanie jako środki moczopędne, odwadniające i hipotensyjne. Badania poszczególnych metabolitów wyspecjalizowanych, dominujących w owocach poszczególnych gatunków wskazują również na potencjalne działanie przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe i hipolipemizujące surowca, niepotwierdzone jednak dotychczas w badaniach klinicznych. W terapiach o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym i antyoksydacyjnym zalecana dzienna dawka surowca (dla pacjenta o średniej masie 60 kg) to 6 – 15 g [40].

Pomimo zachęcających doniesień literaturowych na temat składu fitochemicznego oraz potencjalnego wykorzystania w terapii, niewiele danych pochodzących z badań aktywności biologicznej potwierdza prozdrowotny wpływ liści forsycji.

Analiza fitochemiczna liści forsycji zwistej wykazała spójny z owocami profil chemiczny, z dominującą zawartością lignanów i fenyloetanoloidów jako grup wiodących. Większa zawartość związków z grupy lignanów np. filiryny, glukozydu pinorezynolu; fenyloetanoloidów np. forsytozydu A, izoforsytozydu A, forsytiazydu oraz flawonoidów np. rutyny, może wskazywać jednak na odmienny, mechanizm działania biologicznego liści,

w porównaniu do owoców [17,39]. Wcześniejsze doniesienia oceniające aktywność naparu z liści forsycji zwisłej wskazują, że surowiec może być skutecznym środkiem przeciwdrobnoustrojowym, ze szczególną rolą forsytozydu A i izoforsytozydu jako związków o potwierdzonym działaniu przeciwbakteryjnym wobec *Staphylococcus aureus*, z minimalnym stężeniem hamującym (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC) wynoszącym odpowiednio 76,7 i 81,7 µg/ml vs. kontrola pozytywna: tetracyklina MIC = 119 µg/ml, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (kolejno MIC = 38,3 i 40,8 µg/ml vs. kontrola pozytywna: tetracyklina MIC = 29,76 µg/ml) [18,41]. Wyniki szczegółowych badań w warunkach *in vivo* podkreślają również rolę forsytozydu A, jako potencjalnego modulatora receptorów TLR7, a tym samym jego działania przeciwwirusowego [42].

Ostatnie doniesienia wskazują także na silną inhibicję cyklicznej fosfodiesterazy AMP w komórkach układu odpornościowego, modulowaną przez główne składniki występujące w liściach forsycji tj. glukozyd pinorezynolu oraz filirybę, co zostało opisane jako jedna z potencjalnych strategii terapeutycznych w przypadku zaburzeń metabolicznych [39]. Ciekawą obserwacją jest także wpływ filirybiny, głównego lignanu liści forsycji na poprawę insulinowrażliwości tkanek, poprzez aktywację ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydylinozytoli i kinazy białkowej AKT (ang. *phosphatidyl inositol 3-kinase and v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*, PI3K/Akt), dając podstawę do dalszych analiz w kierunku jej wpływu na rozwój miażdżycy, otyłości, zespołu metabolicznego i innych chorób przewlekłych [43-45]. Badania w warunkach *in vivo* wskazywały także na istotny potencjał ekstraktów octanowych z owoców *F. suspensa* w hamowaniu aktywności enzymu α -amylazy, odpowiedzialnego za rozkład polisacharydów do di- i monosacharydów na poziomie IC₅₀ = 117,4 µg/ml, a także inhibicji aktywności reduktazy HMG-CoA (3-hydroksy-3metylo-glutarylo koenzym A), enzymu odpowiedzialnego za regulację syntezy cholesterolu (zahamowanie do poziomu 24,5% aktywności enzymu) [46].

Ocena aktywności przeciwzapalnej ekstraktów metanolowych przygotowanych z liści i kwiatów *F. × intermedia*, wskazuje na istotny potencjał surowca w hamowaniu produkcji mediatorów prozapalnych – interleukiny 8 (ang. *interleukin 8*, IL-8) oraz czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), odpowiednio do poziomu 20 - 40% i 10 - 35% (kwiaty) oraz 5 - 25% oraz 20 - 60% (liście) [33]. Analiza aktywności przeciwzapalnej poszczególnych związków dominujących w etanolowym ekstrakcie z owoców *F. suspensa*, w modelu zapalenia jelita grubego *in vivo*, wskazywała na istotną aktywność filigeniny, jako silnego inhibitora ekspresji receptora toll-podobnego 4 (ang. *Toll-like 4*, TLR4) oraz ścieżek sygnałowych kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (ang. *Mitogen activated protein*

kinases, MAPK) – JNK, p38 i ERK 1/2 [47]. Ponadto znamiennej aktywność przeciwzapalną wykazano także w modelu ludzkich neutrofilów dla matairesynolu oraz pinorezynolu, powszechnie występujących w liściach i kwiatach rodzaju *Forsythia* [33]. Przewodząca aktywność pinorezynolu została także potwierdzona *in vitro* w modelu komórek mikrogleju, wskazując na jego znamiennej, dawkozależny potencjał hamujący wydzielanie cytokin prozapalnych tj. TNF- α , IL-1 β i IL-6 [48].

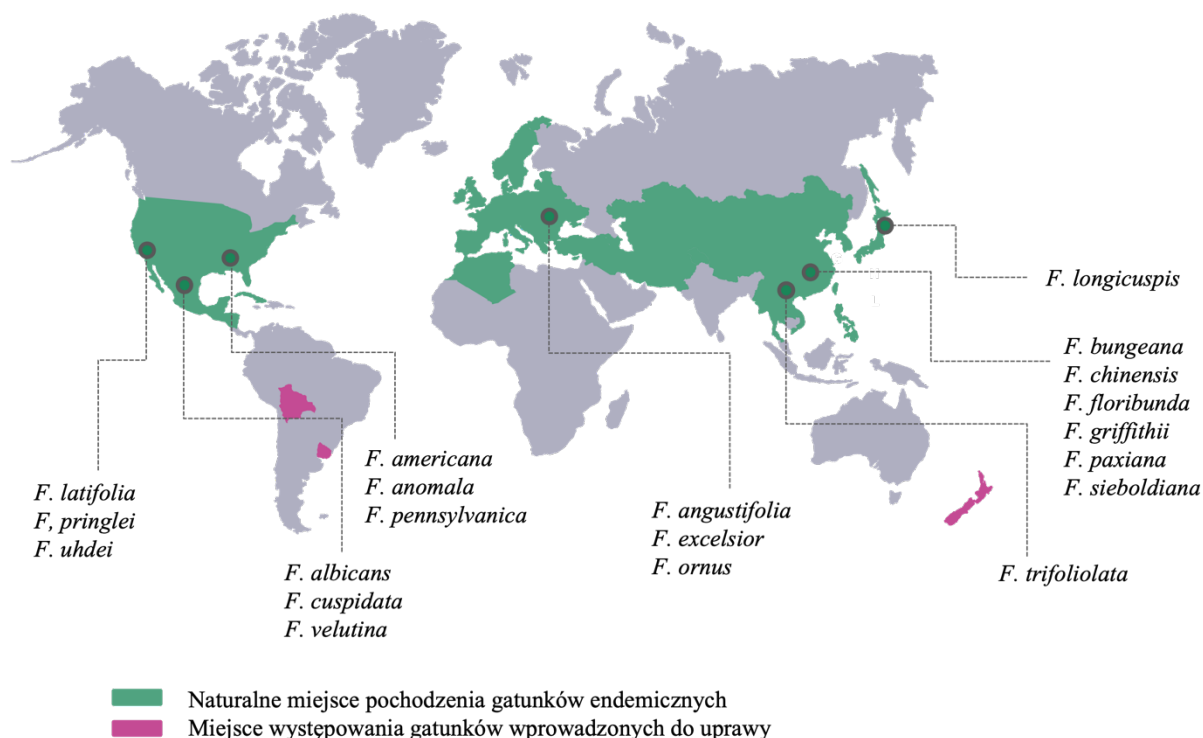
Co ciekawe liście forsykcji, w przeciwieństwie do owoców, nieklasyfikowanych jako produkty spożywcze, zostały wprowadzone w niektórych rejonach świata np. w prowincji Shanxi w Chinach, jako produkty żywnościowe [49]. Na terenie Ameryki Północnej oraz obszarach Dalekiego Wschodu młode liście forsykcji, pąki oraz kwiaty stosowane są jako dodatek do zup, sosów, a także baza do przygotowania nalewek czy syropów. Tradycyjne zastosowanie liści forsykcji wynikające z wiedzy ludowej, zaleca stosowanie surowca w postaci ziół i mieszanek do przygotowania naparów. Wśród wskazań do ich stosowania wymieniana jest modulacja gospodarki lipidowej, działanie przeciwstarzeniowe i przeciwgrypowe [18]. Co więcej, badania *in vivo* dowodzące o braku działania toksycznego naparów z liści *F. suspensa*, przy przewlekłym podawaniu (w dziennej dawce 61,60 g/kg m.c.), potwierdzają potencjalne bezpieczeństwo stosowania surowca [50].

Mimo szerokiego zastosowania gatunków z rodzaju *Forsythia* w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej, brak ilościowych i jakościowych danych z badań przedklinicznych i klinicznych potwierdzających skuteczność stosowania roślin tego gatunku w fitoterapii, uniemożliwia ich wprowadzenie do leczenia europejskiego. Szeroka dostępność liści gatunku *Forsythia* w warunkach klimatu umiarkowanego, polskiej szerokości geograficznej, czyni go interesującym, łatwo dostępnym źródłem surowca o potencjalnym działaniu terapeutycznym/prozdrowotnym. Wobec braku danych na temat różnic w aktywności biologicznej surowca w zależności od czasu zbioru, w niniejszej pracy odniosę się do tego zagadnienia. Dogłębna analiza fitochemiczna oraz badania biologiczne w poszerzonym zakresie, w warunkach *in vitro* oraz w przyszłości *in vivo* mogą stać się dobrym punktem wyjścia do wprowadzenia preparatów z liści forsykcji do ziołolecznictwa, a także szerszego ich zastosowania jako elementy funkcjonalnych produktów żywnościowych.

1.3. Charakterystyka rodzaju *Fraxinus* L.

1.3.1. Występowanie

Rodzaj *Fraxinus* jest najszerzej rozpowszechnioną grupą roślin należących do rodziny Oleaceae, zasiedlającą strefy umiarkowane i subtropikalne półkuli północnej. Spośród 58 poznanych gatunków, należących do tego rodzaju znaczna większość natywnie wywodzi się z obszarów europejskich. Wiodącym przedstawicielem tego rodzaju jest *Fraxinus excelsior* L. (jesion wyniosły), będący jednocześnie jednym z najliczniejszych gatunków drzew liściastych w Europie. Rozmieszczenie *Fraxinus excelsior* obejmuje zasięgiem większość krajów Europy kontynentalnej (64% terytoriów europejskich) [51], pokrywając jednocześnie częściowo obszary występowania dwóch innych przedstawicieli rodzaju *Fraxinus* – *Fraxinus angustifolia* Vahl (jesion wąskolistny) oraz *Fraxinus ornus* L. (jesion mannowy). Największe zagęszczenie rodzaju *Fraxinus* obserwowane jest na obszarach północno-zachodniej Szkocji, a jego naturalny zasięg w dużej mierze pokrywa się z zasięgiem dębu szypułkowego [52]. Rozmieszczenie rodzaju *Fraxinus* Tourn. ex L. zaprezentowano na poniższej rycinie (rycina 3).



Rycina 3: Rozmieszczenie rodzaju *Fraxinus* L.

Opracowanie własne na podstawie: Royal Botanic Gardens (<https://powo.science.kew.org>) oraz Global Biodiversity Information Facility (<https://www.gbif.org/>), dostęp dnia: 13.11.2023.

1.3.2. Charakterystyka botaniczna

Wiodącym przedstawicielem rodzaju *Fraxinus* występującym na obszarze Polski jest jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior*), porastający najczęściej nizinne, wilgotne lasy łąkowe oraz suche stanowiska wapienne. Ze względu na zdolność przystosowania się jesionu do środowisk miejskich oraz niewielkich wymagań glebowych, gatunek stał się nieodłącznym elementem parków i przydrożnych skwerów, jak również brzegów rzek i leśnych zboczy [53]. Z ekologicznego punktu widzenia drzewa jesionu odgrywają kluczową rolę w ochronie różnorodności biologicznej, stanowiąc ważne źródło pożywienia i/lub schronienia dla dzikich zwierząt. Z uwagi na wysoki stopień zasadowości, kora jesionu wyniosłego stanowi doskonałą niszę dla grzybów, mchów oraz wielu gatunków bezkręgowców [54].

Fraxinus excelsior jest jednym z najwyższych drzew liściastych występujących na terenie Europy, sięgającym do 30-40 metrów wysokości, o zwykle wysoko osadzonej koronie. Pień drzewa pokryty jasnozielonoszarą lub ciemnobrązową, gładką u młodych okazów oraz bruzdowaną, spękaną korą, u starszych drzew. Charakterystyczną cechą gatunku są duże, nieparzystopierzaste, przeciwległe liście podzielone na 7 - 11 (-15) wąskojajowatych, brzegiem karbowanopiłkowanych listków siedzących lub krótkoogonkowych, z ząbkami zagiętymi ku blaszce listka. Górna powierzchnia liścia jest najczęściej ciemnozielona, natomiast dolna owłosiona, szarozielona. Owocem są podłużne, spłaszczone orzeszki, ułatwiające rozsiewanie nasion przez wiatr [55]. Kwiaty poligamodwupienne w wiechach [14]. Liście oraz owoce jesionu wyniosłego przedstawiono na poniższej rycinie (**rycina 4**).



Rycina 4: Liście oraz owoce jesionu wyniosłego. Źródło fotografii: Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org/>.

1.3.3. Profil fitochemiczny

Właściwości biologiczne liści rodzaju *Fraxinus* korelowane są głównie z dominującą zawartością związków z grupy polifenoli w ich składzie fitochemicznym. Do głównych grup metabolitów wyspecjalizowanych występujących w liściach tego gatunku należą substancje z grupy sekoirydoidów, fenyloetanoidów, flawonoidów, a także kumaryn których obecność wyróżnia rodzaj *Fraxinus* na tle innych przedstawicieli rodziny Oleaceae [56]. Dużą uwagę w kontekście mechanizmów działania surowca przypisuje się właśnie związkom kumarynowym np. eskulinie i jej aglikonowi eskuletynie, wyizolowanej z gatunku *Fraxinus rhynchophylla*, dla których wykazano efekt hamujący powstawanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji, aktywności α -glukozydazy, kaspazy-3 i białkowej fosfatazy tyrozynowej 1B, wskazując na potencjalne działanie liści jesionu wspomagające metabolizm glukozy [57]. Thuong i wsp. wskazują na działanie innej pochodnej kumarynowej – fraksetyny izolowanej z kory jesionu koreańskiego na bezpośrednie działanie ochronne w przebiegu tworzenia blaszki miażdżycowej poprzez indukcję enzymów antyoksydacyjnych i aktywację szlaku jądrowego czynnika transkrypcyjnego pochodzenia erytroidalnego typu 2/elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/The antioxidant responsive element*, Nrf2/ARE) [58]. Działanie moczopędne surowca, wyrażone zależnym od dawki zwiększeniem wydalania jonów sodu, potasu, chloru oraz mocznika po zastosowaniu ekstraktu wodno-etanolowego przygotowanego z liści jesionu warunkuje obecność znamiennych ilości związków z grupy flawonoidów, głównie pochodnych kwercetyny i kemferolu (3-*O*-glukozyd kemferolu oraz 3-*O*-glukozyd kwercetyny, 3-*O*-ramnoglukozyd kwercetyny) [56]. W liściach jesionu zidentyfikowano także znaczące ilości związków z grupy sekoirydoidów (tj. 10- hydroksyligstrozyd, ligstrozyd, oleuropeina, nuzhenid i jego pochodne oraz pochodne oleozydu), a także niewielkie zawartości triterpenów (kwas ursolowy oraz betuliny) oraz kwasów fenolowych (kwasy ferulowy, kawowy, p-kumarowy, protokatechowy, wanilinowy i inne) [59].

1.3.4. Działanie i wykorzystanie w terapii

Gatunki rodzaju *Fraxinus* od lat były wykorzystywane w tradycyjnej medycynie ludowej, ze względu na ich działanie moczopędne oraz łagodne działanie przeczyszczające, znajdując zastosowanie w terapii dny moczanowej, reumatyzmie, schorzeniach dróg moczowych (liście) oraz jako środki przeciwgorączkowe i tonizujące (kora) [60]. Gatunki

rodzaju *Fraxinus* są cenionym źródłem surowców leczniczych, stosowanych w chińskich grupach etnicznych (Liu-shu, Miao, Han, Bai), znajdując zastosowanie w terapiach antymalarycznych, czy stanach zapalnych przyzębia. W krajach europejskich np. południowych regionach Włoch kora *Fraxinus ornus* jest powszechnie wykorzystywana jako środek hipocholesterolemiczny. Z kolei w bułgarskiej medycynie ludowej kora i liście *F. excelsior* i *F. ornus* znajdują zastosowanie podczas gojenia ran z uwagi na działanie przeciwwysiękowo - przeciwzapalne, a także w terapii biegunki i czerwonki [56].

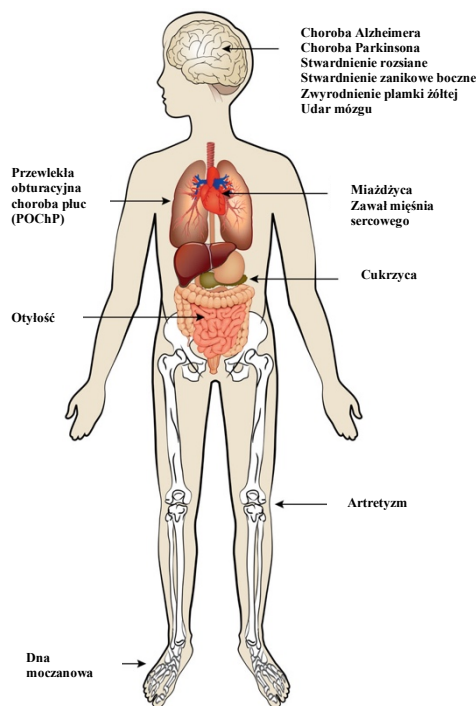
Według Europejskiej Agencji Leków wskazaniem do stosowania formułacji zawierających liście jesionu wyniosłego, jesionu wąskolistnego lub połączenia powyższych surowców jest terapia bólu i łagodzenie stanów zapalnych o niskim stopniu nasilenia. Liście jesionu zalecane są także jako tradycyjne, ziołowe produkty lecznicze, w terapii schorzeń układu moczowo-płciowego, do stosowania w formie naparów, wywarów lub doustnych form stosowania np. kapsułek, rekomendowanych w 2-3 dawkach podzielonych, w celu osiągnięcia efektu moczopędnego [9]. Pomimo dostępności na rynku europejskim suplementów diety i wyrobów medycznych zawierających sproszkowany liść, korę lub pąki jesionu, dla których wymienia się szereg potencjalnych wskazań, rozpoczynając od utrzymania prawidłowych funkcji układu moczowego, poprawy trawienia oraz wzmocnienia narządu ruchu ilość badań przedklinicznych oraz klinicznych, potwierdzających skuteczność tych preparatów jest zaskakująco niewielka. Co więcej, jakość preparatów zawierających substancje roślinne pochodzące z roślin gatunku *F. excelsior*, występujących w polskim obrocie farmaceutycznym jako suplementy diety lub wyroby medyczne pozostaje niestety wątpliwa, przez wzgląd na brak standaryzacji czy informacji o wartości współczynnika DER (ang. *Drug Extract Ratio*).

Z uwagi na wieloletnią tradycję stosowania, w najnowszym wydaniu Farmakopei Polskiej XII rodzajowi *Fraxinus* poświęcono 2 monografie. Pierwsza z nich obejmuje korę jesionu chińskiego (*Fraxini chinensis cortex*) standaryzowaną na obecność eskuletyny i eskuliny. Drugim surowcem farmakopealnym jest liść jesionu (*Fraxini folium*) pozyskany z jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*), jesionu wąskolistnego (*Fraxinus angustifolia*) (syn. *Fraxinus oxyphylla* M. Bieb), mieszańców tych dwóch gatunków lub ich mieszanin, standaryzowany na obecność pochodnych kwasu hydroksycynamonowego [52]. Co ciekawe, preparat zawierający wyciąg etanolowy (60% v/v) kory jesionu wyniosłego, niebędącej surowcem farmakopealnym, w połączeniu z nalewką z ziela nawłoci oraz liści i kory wierzby jest stosowany w łagodzeniu dolegliwości reumatycznych i nerwobóli [61]. Rodzaj *Fraxinus* pojawia się także w składach preparatów kosmetycznych stosowanych podczas gojenia i regeneracji niewielkich zmian naskórka oraz jako czynnik fotoprotekcyjny [56].

1.4. Przewlekłe Choroby Niezakaźne

Jako pierwotną przyczynę powstawania chorób cywilizacyjnych, w tym zaliczanych do tej grupy Przewlekłych Chorób Niezakaźnych (ang. *noncommunicable diseases*, NCDs), określa się zaburzenie relacji pomiędzy organizmem ludzkim, prowadzonym stylem życia, a środowiskiem naturalnym [62]. Według najnowszych doniesień Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) z 2023 roku, przewlekłe choroby niezakaźne (zaprezentowane na **rycinie 5**), tj. schorzenia układu sercowo-naczyniowego, oddechowego, kostno-stawowego, choroby nowotworowe oraz inne zaburzenia, w tym o podłożu metabolicznym (np. cukrzyca typu II) są przyczyną 7 na 10 zgonów, co odpowiada rocznie 41 milionom przypadków na całym świecie (w tym 17 milionom ludzi umierających przedwcześnie – przed 70 rokiem życia) [63]. Z drugiej strony ponad 40% populacji

powyżej 60-go roku życia doświadcza obniżonej jakości życia wynikającej z czynników ryzyka rozwoju NCDs tj. nadciśnienia, dyslipidemii, hiperglikemii, otyłości i wynikającej z niej insulinooporności, określanych przez WHO pod ogólnym pojęciem Zespołu Metabolicznego (ang. *Metabolic syndrome*, MetS, zespół X) [64]. Długoterminowe prognozy nie umniejszają jednak obaw co do obserwowanego trendu, bowiem szczegółowy wgląd w dane epidemiologiczne prognozuje wyraźne przesunięcie średniej granicy wieku oraz procentowej zachorowalności na choroby metaboliczne, zarówno w społeczeństwach wysokorozwiniętych jak również rozwijających się [63]. Niepokojące wyniki przeglądu systematycznego prowadzonego na podstawie badań przekrojowych i badań kohortowych opublikowanych w ramach analiz przeprowadzonych łącznie w 44 krajach, wskazują na obciążenie zespołem metabolicznym 3% dzieci i 5% nastolatków (zakres wieku 6-18 lat) [65]. Szczególną uwagę zwraca także klasyfikacja Polski jako kraju wysokiego ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych względem ostatnich wytycznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego



Rycina 5: Sterylne choroby zapalne.

Opracowanie własne na podstawie raportu Światowej Organizacji Zdrowia (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>; dostęp dnia: 13.11.2023).

[66], co znajduje także odzwierciedlenie w danych opisujących rozpoznanie otyłości u ponad 60% dorosłych Polaków [67].

Postępujące rozpowszechnienie chorób niezakaźnych ma znaczące konsekwencje społeczno-ekonomiczne oraz zdrowotne dla poszczególnych jednostek, a także całych społeczności. Podczas gdy choroby niezakaźne zwykle objawiają się w wieku dorosłym, wiele z nich ma swoje źródło w zachowaniach przyjętych w dzieciństwie i okresie dojrzewania, takich jak bierne/czynne palenie, brak aktywności fizycznej, nadmierne spożywanie alkoholu i wysokokaloryczna dieta z niewielkim udziałem składników pochodzenia roślinnego [62,68,69]. Fundamentalną rolę w rozwoju NCDs przypisuje się jednak powstawaniu ogólnoustrojowego, subklinicznego stanu zapalnego, określanego terminem „metazapalenia”, pierwotnie związanego z otyłością, wynikającą m.in. z niebilansowanej, wysoko przetworzonej żywności, niehigienicznego stylu życia i dynamicznego rozwoju przemysłowego, prowadzących do wieloukładowych interakcji immunologicznych, tj. pobudzenia ścieżek sygnalizacji zapalnej, stresu oksydacyjnego oraz rozwoju insulinooporności [70,71]. W przeciwieństwie do ostrych reakcji zapalnych, przewlekły stan zapalny o niewielkim lub umiarkowanym nasileniu i niskim stopniu złośliwości może trwać tygodnie, miesiące, a w niektórych przypadkach nawet lata. Jednym z czynników podkreślających podstępność i powolny przebieg NCDs jest nierzadko późne pojawienie się objawów chorobowych, uniemożliwiający podjęcie działań prewencyjnych ukierunkowanych na cofnięcie powstałych patologii metabolicznych. Aktualne doniesienia wiążą występowanie metazapalenia z rozwojem i progresją cukrzycy typu II, osteoporozą, alergią, schorzeniami ośrodkowego układu nerwowego np. demencją, depresją, stanami lękowymi, a nawet chorobami nowotworowymi, w konsekwencji prowadzących do skracania długości życia i przedwczesnego zgonu [72-74].

Chociaż obecnie stosowane terapie przeciwzapalne i antyoksydacyjne stanowią element leczenia schorzeń o podłożu zapalnym, ich skuteczność kliniczna u wielu pacjentów jest nadal wysoce ograniczona. Co więcej, złożony patomechanizm chorób niezakaźnych, wymaga zastosowania terapii wielokierunkowej, obejmującej nierzadko kilka celów farmakologicznych, narażając pacjenta na występowanie licznych reakcji polekowych [74,75].

We wcześniejszych doniesieniach korelowano progresję NCDs i MetS ze zwiększonym, ogólnoustrojowym stężeniem lipopolisacharydu (ang. *lipopolysaccharide*, LPS), należącego do prozapalnych składników ściany komórkowej, bakteryjnych szczepów Gram-ujemnych, stanowiących 70% komensalnego mikrobiomu jelitowego [76]. LPS zawiera związany

z patogenem wzorzec molekularny, lipid A, który po połączeniu z receptorem TLR4 inicjuje kaskadę sygnalizacyjną, prowadzącą do aktywacji szlaków prozapalnych (np. związanych z aktywnością kinaz MAP) i oksydacyjnych (produkcja reaktywnych form tlenu, ang. *reactive oxygen species*, ROS), a także wzrostu ekspresji markerów infiltracji makrofagów np. CD86 [77]. W badaniach *in vivo* stały wzrost stężenia LPS w osoczu został powiązany z podwyższoną ekspresją TNF- α , IL-6, IL-1 β oraz opornością na insulinę u gryzoni spożywających dietę wysokokaloryczną, a także u myszy genetycznie otyłych [78]. W randomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu dożylnie podanie małej dawki (0,6 ng/kg masy ciała) LPS zdrowym ochotnikom indukowało szybki, przejściowy wzrost IL-6 (25-krotny) i TNF- α (100-krotny) w osoczu [79]. W modelu myszy nieotyłych, pozbawionych koreceptora LPS, klastra CD14, którym podano endotoksynę razem z dietą wysokotłuszczową, nie obserwowano przyrostu masy ciała oraz ogólnoustrojowego stanu zapalnego, potwierdzając aktywację receptora TLR4 przez LPS jako zdarzenia pośredniczącego w stanach zapalnych wywołanych wysokokaloryczną dietą [80]. Aljada i wsp. wykazali, że w ciągu kilku godzin po spożyciu wysokotłuszczowego, wysokowęglowodanowego posiłku, krążące we krwi leukocyty wykazywały cechy produkcji ROS i aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B) [81]. Co ciekawe, analiza skutków długotrwałego stosowania wysokowęglowodanowej diety „zachodniej”, w przeciwieństwie do zastosowania diety Śródziemnomorskiej, wykazała spadek ilości dostępnej fosfatazy alkalicznej, która w warunkach fizjologicznych odgrywa rolę detoksyfikującą dla LPS w obrębie światła jelita, zapobiegając translokacji aktywnego LPS do krążenia ogólnoustrojowego. Ponadto, w innym badaniu stwierdzono, że wysokie stężenie bakteryjnego LPS wpływa destrukcyjnie na integralność ściany jelita, dodatkowo zwiększając wchłanianie LPS do krwioobiegu, a tym samym inicjując procesy zapalne całego organizmu [82,83]. Analiza funkcji fosfatazy alkalicznej na poziomie komórkowym potwierdziła także jej hamujący wpływ na aktywność ścieżki sygnałowej TLR4/ NF- κ B oraz hamowanie fosforylacji białka inhibitorowego NF- κ B – I κ B α , po aktywacji LPS w makrofagach otrzewnowych, a tym samym ograniczenie ekspresji mediatorów zapalnych [84].

Nawyki żywieniowe i właściwa suplementacja należą do modyfikowalnych czynników biorących udział w rozwoju zapalenia i chorób z nim związanych. Odwrotna korelacja diety śródziemnomorskiej z rozwojem chorób przewlekłych jest przypisywana obecności produktów o dużym potencjale przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym tj. oliwa z oliwek, czerwone wino, orzechy [85]. Spośród proponowanych rozwiązań ograniczenia rozwoju powstawania

przewlekłych stanów zapalnych jest wzbogacenie diety o produkty bogate w związki polifenolowe oraz większy udział w codziennej diecie produktów nieprzetworzonych, w tym pochodzenia roślinnego. W tym kontekście znaczenie nutraceutyków oraz właściwej suplementacji pojawia się jako obiecujące narzędzie do zapobiegania chorobom związanym z odżywianiem i poprawy fizycznego i psychicznego dobrostanu społeczeństwa. Najnowsze dane literaturowe sugerują, że długotrwałe spożycie diety opartej o składniki i suplementację pochodzenia roślinnego chroni przed rozwojem chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycą typu II, osteoporozą czy chorobami neurodegeneracyjnymi [86-88]. W wielu krajach wysokorozwiniętych produkty pochodzenia roślinnego są uważane za składnik terapii, opisywanej pod pojęciem medycyny „komplementarnej”. W badaniu przeprowadzonym przez WHO, w grupie 252 terapeutyków rozważanych jako kluczowe i podstawowe w ogólnie pojętej terapii, aż 11% były lekami pochodzenia roślinnego [89]. Wśród zalet stosowania produktów leczniczych pochodzenia naturalnego należy wymienić mniejszą ilość działań niepożądanych w stosunku do tradycyjnej farmakoterapii oraz szeroki zakres synergistycznego działania metabolitów wtórnych co przekłada się na większą ilość wskazań terapeutycznych [90]. Pomimo wieloletniej tradycji stosowania niektórych surowców naturalnych brak szczegółowych mechanizmów działania wynikający głównie z niskiej jakości oraz niewystarczającej ilości badań biologicznych i klinicznych ogranicza ich zastosowanie w terapii [90]. Kluczowym wydaje się więc lepsze poznanie i analiza surowców zarówno już dostępnych na rynku farmaceutycznym jak i surowców mniej poznanych, mogących pełnić potencjalne funkcje prewencyjne. Szczegółowa analiza składu fitochemicznego oraz badania *in vitro* i *in vivo* mogą zaowocować odkryciem nowych związków, o potencjalnie nowych mechanizmach działania lub przypisanie znanym strukturom nowych funkcji lub zastosowań [91].

1.5. Rola komórek monocytów i makrofagów w przebiegu stanu zapalnego

Zapalenie jest kluczowym procesem niezbędnym do utrzymania homeostazy organizmu, w odpowiedzi na działanie zewnętrznych lub wewnętrznych czynników patogennych [72]. Prawidłowo przebiegająca odpowiedź immunologiczna prowadzi do samoistnego wygaszenia procesu zapalnego, bez powstania uszkodzeń w komórkach gospodarza [92]. Grupa mononuklearnych komórek krwi obwodowej (ang. *Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) klasyfikująca limfocyty T i B, monocyty (Mo), makrofagi (M ϕ), komórki NK oraz komórki dendrytyczne odgrywa główną rolę w bezpośredniej eliminacji czynników patogennych, jak również organizacji poszczególnych faz procesu zapalnego [93].

1.5.1. Monocyty

Monocyty to grupa jednojądrzastych, mieloidalnych komórek efektorowych, stanowiących 5-10% wszystkich komórek leukocytarnych krwi. Czas życia monocytów szacowany jest w zależności od przyjętego fenotypu na okres 1-3 dni, po którym w przypadku braku rekrutacji do tkanek ulegają procesom degradacji [72,94]. Do typowych fizjologicznych cech tej grupy należy obecność owalnego lub nerkowatego jądra komórkowego oraz pęcherzyków cytoplazmatycznych. Monocyty powstają w szpiku kostnym z multipotencjalnych, hematopoetycznych komórek macierzystych (ang. *Hematopoietic Stem Cells*, HSCs), dających początek prekursorom mieloidalnym i limfoidalnym. Szereg sekwencyjnych etapów prowadzi następnie do ich różnicowania do komórek makrofagów, komórek dendrytycznych oraz pre-osteoklastów, predysponujących do pełnienia określonych funkcji efektorowych [93,95].

W stanie stacjonarnym monocyty pełnią funkcje homeostatyczną, a procesy ich różnicowania regulowane są pętlą ujemnego sprzężenia zwrotnego, dzięki obecności czynnika stymulującego kolonie makrofagów (ang. *macrophage colony-stimulating factor 1*, M-CSF-1), produkowanego przez komórki stromalne w obrębie krwi i tkanek [72]. W odpowiedzi na bodźce środowiskowe, np. przerwanie ciągłości tkanek, obecności drobnoustrojów chorobotwórczych, a także indukcję procesów apoptotycznych monocyty infiltrują do błon śluzowych i obszarów objętych procesem zapalnym i ulegają przekształceniu do fagocytarnych makrofagów tkankowych pochodzących z monocytów (mo-Mac) lub komórek dendrytycznych pochodzących z monocytów (mo-DC) [94]. Pierwotna koncepcja rozmieszczenia PBMC zakłada różnicowanie klasycznych monocytów do komórek makrofagów rezydujących

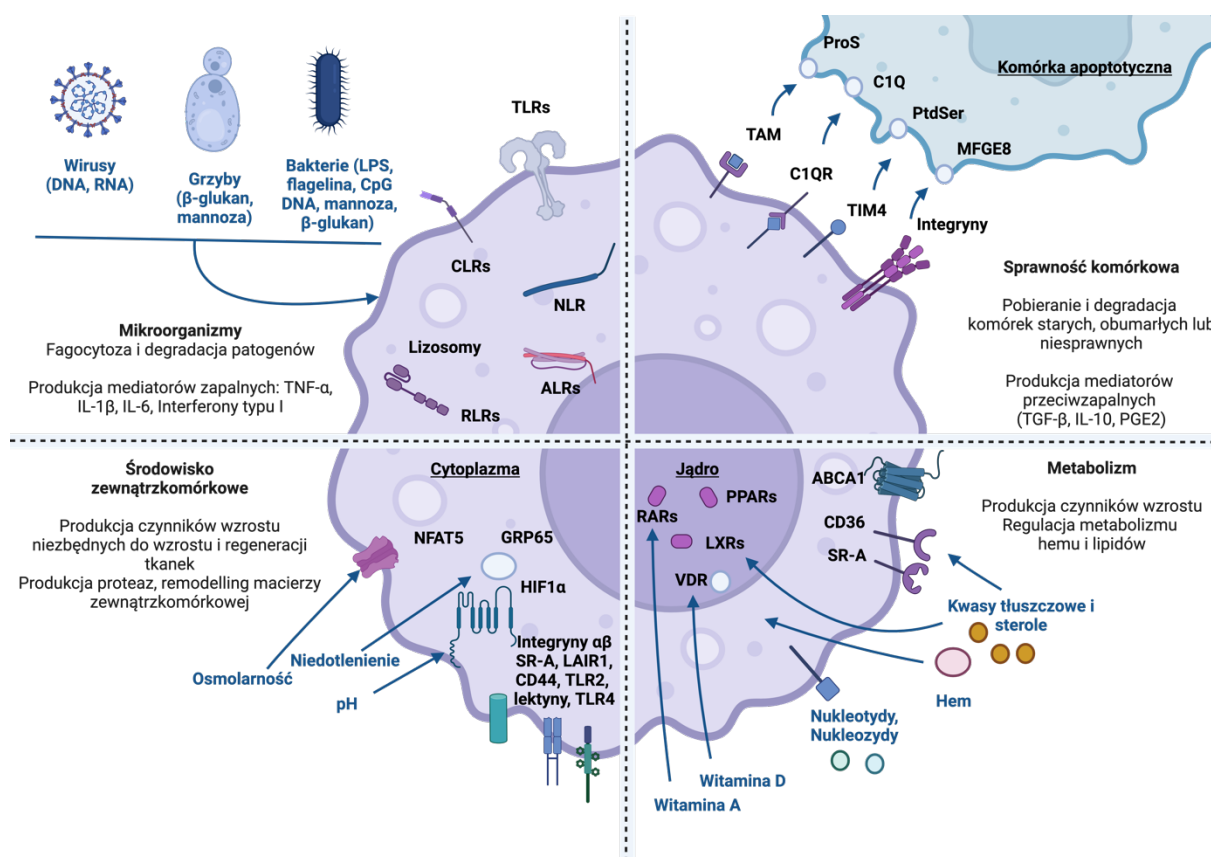
w tkankach (np. serca, płuc, skóry właściwej) w ramach puli osiadłych/rezydentnych makrofagów tkankowych, aktywowanych w trakcie infekcji oraz odrębnej puli makrofagów wędrujących [95].

Monocyty ludzkiej krwi obwodowej nie są populacją homogeną. Klasyfikacja monocytów krążących, oparta na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych CD14 i CD16, wyróżnia 3 grupy komórek zróżnicowanych pod kątem fenotypu i pełnionych funkcji: monocyty klasyczne, CD14⁺⁺ CD16⁻; pośrednie, CD14⁺⁺ CD16⁺ oraz nieklasyczne, CD14⁺ CD16⁺⁺ [94,96,97]. Fizjologiczna rola poszczególnych grup monocytów nie została jeszcze w pełni określona, jednak wykazano, że monocyty klasyczne oraz pośrednie pełnią funkcje prozapalne, wyrażone wydzielaniem cytokin prozapalnych (głównie TNF- α) w odpowiedzi np. na bakteryjny LPS. Do głównych zadań monocytów nieklasycznych należy monitorowanie integralności śródbłonna naczyniowego, odpowiadając głównie za pośrednictwem receptorów toll-podobnych 7/8 (ang. *toll like receptors 7/8*, TLR7/8) na sygnały zagrożenia umiarkowaną sekrecją mediatorów zapalnych (TNF- α , IL-1 β , CCL2, IL-10, IL-8, IL-6) oraz indukcją rekrutacji komórek neutrofilii [97].

1.5.2. Makrofagi

Makrofagi są „strażnikami” układu odpornościowego, które utrzymują integralność tkanek, poprzez eliminację lub naprawę uszkodzonych komórek i macierzy [92]. Makrofagi wraz z neutrofilami należą do najważniejszych składników morfotycznych krwi, uczestniczących we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Z uwagi na przynależność makrofagów do grupy komórek prezentujących antygen (ang. *antigen presenting cell*, APC) limfocytom T, makrofagi stanowią pomost pomiędzy wrodzoną i nabytą odpowiedzią immunologiczną [98].

Poprzez wysoką ekspresję receptorów rozpoznawania wzorca (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs), w tym receptorów toll-podobnych (ang. *toll-like receptors*, TLR), NOD-podobnych (ang. *NOD-like receptors*, NOD), RIG-I-podobnych (ang. *RIG-I-like receptors*, RLR), makrofagi aktywnie uczestniczą w rozpoznawaniu motywów molekularnych związanych z patogenami i uszkodzeniami oraz inicjacji odpowiedzi zapalnej, na każdym etapie jej przebiegu (**rycina 6**) [98, 99].



Rycina 6: Schematyczna prezentacja komórki makrofagów – receptory oraz pełnione funkcje. Strzałki w kolorze niebieskim wskazują interakcję między określonym sygnałem, a czujnikiem makrofagów. ALR - receptory podobne do AIM2; CLR - receptory lektyny typu C; NLR - receptory podobne do NOD; PPAR - receptory aktywowane przez proliferatory peroksisomów; ProS -białko S; PtdSer - fosfatydyloseryna; RAR - receptory kwasu retinowego; RLR - receptory podobne do RIG-I; TLR - receptory toll-podobne; VDR, receptor witaminy D. Opracowano na podstawie: [98, 99].

Funkcje oraz fenotypy makrofagów tkankowych, a także makrofagów pochodzących z monocytów, rekrutowanych z rezerwuaru krwi, szpiku kostnego czy śledziony, mogą wykazywać specyficzność tkankową, w ramach aktualnych potrzeb wynikających z konieczności powrotu organizmu do stanu homeostazy. Makrofagi cechują się znacznym stopniem plastyczności funkcjonalnej, uwarunkowanym rodzajem sygnałów docierających z mikrośrodowiska cytokinowego, co tłumaczy liczne, pozornie przeciwstawne funkcje tej grupy komórek [72,100].

Makrofagi rezydujące w tkankach są wyposażone w szeroką gamę czujników (receptory, mediatory), uczestniczących w koordynowaniu adaptacyjnych odpowiedzi komórkowych, kluczowych dla wzrostu, metabolizmu i przebudowy wyspecjalizowanych komórek tkankowych. Reakcje te obejmują m.in. regulację w odpowiedzi na zmianę parametrów fizjologicznych tj. pH czy temperatura, usuwanie obumarłych komórek,

przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, a także magazynowanie produktów metabolicznych tj. kwasy tłuszczowe, czy produkty rozpadu hemu [98] (**rycina 6**).

Identyfikacja czynnika patogennego inicjuje wydzielanie przez komórki makrofagów leukotreinów cysteinowych, wpływających na wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, a także cytokin i chemokin inicjujących rekrutację innych komórek efektorowych (neutrofilii i makrofagów wędrujących) do miejsca zakażenia. Inicjacja stanu zapalnego wymusza wzrost napływu krwi i transformacji komórek monocytów do komórek makrofagów w celu zwiększenia siły obronnej układu odpornościowego. Jednoczesne zjawisko „zanikania makrofagów” rezydujących w tkankach wynikające z procesów przylegania, emigracji lub śmierci makrofagów rezydentów wymusza procesy uzupełniające braki tych komórek efektorowych [94]. Niektóre grupy komórek tj. fibroblasty, komórki nabłonkowe i śródbłonkowe inicjują migrację komórek monocytów z krwi do tkanek lub ze szpiku kostnego do krwi poprzez wydzielanie dużych ilości białka chemotaktycznego monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1/CCL2), w odpowiedzi na obecność mediatorów zapalnych lub cząstek drobnoustrojów. Kluczowa rola komórek makrofagów w przebiegu pierwszych etapów procesu zapalnego wynika ze zdolności do fagocytozy drobnoustrojów i apoptotycznych neutrofilii (za pośrednictwem TIM4 lub receptorów TAM, C1QR, działających z rozpuszczalnymi cząstkami mostkującymi tj. MFGE8, białko S, C1Q – **rycina 6**), a także produkcji zewnątrzkomórkowych sieci (ang. *macrophages extracellular traps*, MET) składających się m.in. z zewnątrzkomórkowego DNA (pochodzenia jądrowego lub mitochondrialnego), histonów czy metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej 9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*, MMP9) [101].

Podstawowa klasyfikacja, dzieli komórki makrofagów na dwie grupy o funkcjonalnym fenotypie pro- i przeciwzapalnym (odpowiednio M1 i M2), skorelowanym z odpowiedzią napędzaną przez komórki limfocytów, odpowiednio podtypu Th1 i Th2. Obecnie jednak wiadomo, że przyjęty podział jest podziałem umownym, nieodzwierciedlającym w pełni złożoności możliwych fenotypów, zależnych od źródła pochodzenia makrofagów, lokalizacji tkankowej oraz patogenu inicjującego ich aktywację [72].

Polaryzacja podtypu M1 zachodzi w pierwszym etapie odpowiedzi zapalnej. Komórki należące do tej grupy są kluczowymi komórkami efektorowymi, unieczynniającymi patogeny, wirusy i komórki nowotworowe dzięki silnym właściwościom fagocytarnym i cytotoksycznym. Makrofagi podtypu M1 powstają z komórek monocytów pod wpływem czynnika

stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) w odpowiedzi na stymulację LPS [102]. Klasyfikacja podtypu M1 opiera się na ekspresji głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) klasy II, charakterystycznych markerów powierzchniowych: CD14, CD80/86, CD38, a także indukowanej syntazy tlenu azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS). Makrofagi M1 wykazują silną ekspresję cytokin prozapalnych (np. IL-6, IL-12, IL-18, IL-1 β , IL-23 i TNF- α), reaktywnych form tlenu (ROS), proteaz oraz chemokin (np. CCL2, CCL5, CCL8-11, CCL13), indukując translokację limfocytów T i B do miejsca zakażenia, w celu podtrzymania przebiegu stanu zapalnego [103,104]. Ponadto produkcja chemokin CXCL 9-11 przez komórki podtypu M1 inicjuje procesy chemotaksji neutrofilii i monocytów/makrofagów tkankowych do miejsca rozwoju procesu zapalnego. Makrofagi M1 dzięki zwiększonej sekrecji IL-12 pobudzają limfocyty oraz komórki NK (ang. *natural killer*) do produkcji interferonu typu II – IFN- γ , który na zasadzie sprzężenia zwrotnego wpływa na makrofagi zwiększając ich aktywność zapalną i cytotoksyczną. Dodatkowo, wysoka ekspresja białek głównego układu zgodności tkankowej klasy II, a także cząstek kostymulujących CD80/CD86 inicjuje procesy prezentacji antygenów limfocytom Th [100].

Polaryzacja podtypu M2 jest charakterystyczna dla późniejszych etapów reakcji zapalnych. Makrofagi spolaryzowane alternatywnie uczestniczą także w procesach włóknienia, powstawania złogów miażdżycowych oraz w nowotworzeniu [92]. Poprzez zwiększoną produkcję arginazy makrofagi typu M2 promują procesy naprawcze i proliferację komórek, regulują produkcję kolagenu i remodeling tkanek [94].

Jednym z czynników opisywanych jako stymulator polaryzacji makrofagów w kierunku podtypu M2 jest izoforma 1 oksygenazy hemowej 1 (ang. *heme oxygenase-1*, HO-1), odgrywająca istotną rolę ochronną w stanach patologicznych, z uwagi na działanie przeciwutleniające, przeciwapoptotyczne i przeciwzapalne [105]. HO-1, kodowana przez gen *HMOX-1*, określana również jako białko szoku cieplnego 32 (Hsp32), jest wysoce indukowalna przez czynniki tj. stres oksydacyjny, frakcje lipidowe, promieniowanie UV, toksyny bakteryjne, reaktywne formy tlenu, cytokiny prozapalne i ksenobiotyki. Głównym mechanizmem działania HO-1 jest stymulacja katabolizmu wewnątrzkomórkowego hemu do równomolowych ilości biliwerdyny, tlenu węgla oraz wolnych jonów żelaza [106]. Najważniejszym aktywatorem transkrypcji, zwiększającym ekspresję HO-1 jest czynnik związany z czynnikiem jądrowym E2 (Nrf2). Co więcej, wzmożona aktywacja szlaku Nrf2/HO-1 koreluje z inhibicją wydzielania IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO i ROS wskazując na efekt przeciwzapalny i cytoprotekcyjny HO-1.

Niektóre z doniesień spekulują także na temat hamującego wpływu tlenku węgla powstałego w procesie metabolizmu hemu na wydzielanie cytokin TNF- α i IL-1 β [107]. Wiele dowodów sugeruje, że ekspresja HO-1 jest także związana z przeciwzapalną sygnalizacją IL-10, IL-19 i TGF- β w pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, z udziałem szlaków sygnałowych PI3K, NF- κ B i MAPK [108,109].

Jak wykazano we wcześniejszych badaniach w modelach *in vivo* wzrost wydzielania HO-1 po zastosowaniu związków pochodzenia naturalnego tj. kurkumina, kwercetyna, resweratrol, czy oligosacharydy wpływał korzystnie na łagodzenie odpowiedzi zapalnych w komórkach układu odpornościowego [110,111]. Obecność HO-1 i produktu rozpadu hemu – CO, modulowała wydzielanie IL-10 poprzez pośrednią aktywację szlaku p38 MAPK w modelu mysich makrofagów, po zastosowaniu wodnego ekstraktu z omanu wielkiego (*Inula helenium* L.) [112,113]. W związku z powyższym, wstępne doniesienia korelujące aktywność surowców naturalnych ze wzrostem ekspresji białka HO-1 dały postawę do poszukiwań kolejnych modulatorów wydzielania HO-1 o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym [114].

1.5.3. Udział komórek monocytów i makrofagów w patogenezie chorób o podłożu zapalnym

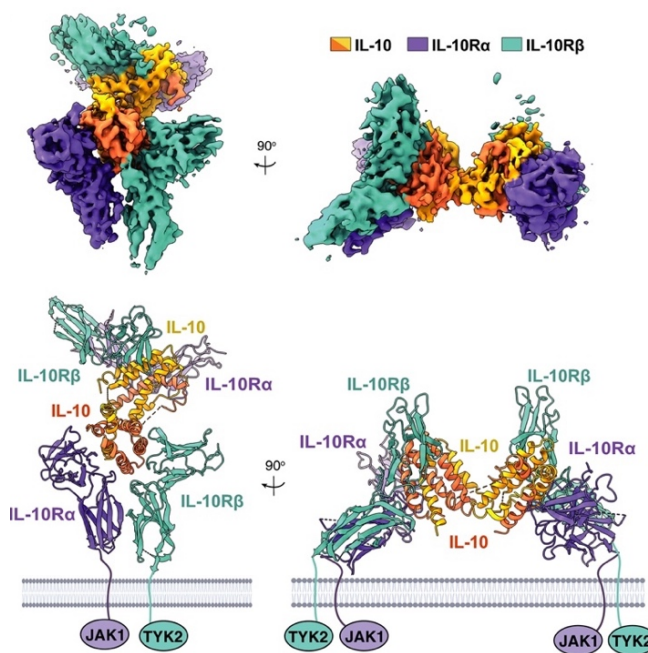
Nieprawidłowa regulacja aktywności monocytów i makrofagów została stwierdzona w patogenezie licznych chorób o podłożu zapalnym [103]. Szczegółowy udział komórek monocytów/makrofagów, a także obecność ich poszczególnych fenotypów i związanych z tym zmian funkcjonalnych nadal jednak pozostają niejasne w wielu schorzeniach. Infiltracja i kumulacja Mo lub M ϕ w tkankach objętych procesem chorobotwórczym leży u podłoża takich schorzeń jak choroby zapalne jelit (IBD): choroba Crohna (CD), wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC), a także w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS), autoimmunologicznego zapalenia wątroby oraz stwardnienia rozsianego (MS) [94]. Heine i wsp. zaobserwowali wzrost liczebności pośredniego fenotypu monocytów u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek co zostało skorelowane z wyższym ryzykiem wystąpienia miażdżycy i późniejszej śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych [115]. W przebiegu miażdżycy, wskazywanej jako klasyczny model przewlekłego stanu zapalnego, zauważono wzmożoną rekrutację obu podtypów monocytów do blaszki miażdżycowej, natomiast jej zanikanie było skorelowane z ograniczeniem procesów kumulacji komórek makrofagów w świetle naczyń krwionośnych [116].

1.5.4. Interleukina 10 - kluczowy regulator odpowiedzi zapalnej

Zrównoważona odpowiedź immunologiczna jest kluczowym czynnikiem zapewniającym ochronę komórek gospodarza przed nadmierną i niekontrolowaną reakcją wynikającą z działania efektorów zapalnych. Jednym z czynników warunkujących utrzymanie homeostazy w miejscu toczącego się stanu zapalnego jest immunosupresyjna IL-10, której aktywność jest ukierunkowana zarówno na wrodzone, jak i adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne [117].

Głównym miejscem sekrecji IL-10 są ludzkie komórki jednojądrzaste krwi obwodowej tj. limfocyty T CD4+ podtypów: TH1, Th2, TH17, Tr1, Treg; limfocyty T CD8+; limfocyty B; komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DC), monocyty, przy największej sekrecji IL-10, zaobserwowanej w komórkach makrofagów [118]. Wydzielanie IL-10 odbywa się także za pośrednictwem niektórych komórek niekrwiotwórczych np. komórek nabłonkowych, keratynocytów czy komórek ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego po aktywacji odpowiednim bodźcem [119].

Większość komórek hematopoetycznych odbiera sygnalizację IL-10 poprzez ekspresję heterodimerycznego receptora dla IL-10 (ang. *interleukin-10 receptor*, IL-10R), złożonego z łańcucha α wiążącego IL-10 (IL-10R α) o wysokim powinowactwie oraz cząsteczki pomocniczej β , współdzielonej z kompleksem receptorów innych członków nadrodziny IL-10 (IL-10R β) [117, 120] (**rycina 7**). Analiza ekspresji receptora na powierzchni pierwotnych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) wykazała wysoką ekspresję IL-10R α i IL-10R β na pierwotnych monocytach i makrofagach i niską, ale obecną ekspresję na powierzchni komórek NK, limfocytach B i T, co sugeruje, że monocyty i makrofagi mogą wykazywać silniejszą odpowiedź sygnalizacyjną IL-10 w porównaniu do innych członków klasy PBMC [121].



Rycina 7: Struktura krio-EM kompleksu receptora IL-10. Model molekularny receptora IL-10 z wyszczególnieniem podjednostki IL-10R α (fioletowy), IL-10R β (seledynowy), oraz IL-10 (pomarańczowo-żółty) [120].

Dimeryzacja IL-10R α i IL-10R β w obecności IL-10 prowadzi do fosforylacji białka kinazy janusowej 1 (ang. *Janus kinase 1*, JAK1) związanego z podjednostką IL-10R α i kinazy tyrozynowej 2 (ang. *Tyrosine kinase 2*, TYK2) związanego z podjednostką IL-10R β , powodując aktywację przetwornika sygnału – czynnika transkrypcyjnego i aktywatora transkrypcji 3 (ang. *Signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3). Aktywacja kaskady sygnalizacji JAK1-TYK2-STAT3 oraz translokacja czynnika STAT3 do jądra komórkowego inicjuje program transkrypcyjny, definiujący odpowiedź przeciwzapalną za pośrednictwem IL-10 [119]. Głównym mechanizmem efektorowym aktywacji osi sygnałowej IL-10/STAT3 jest hamowanie transkrypcji genów kodujących aktywność cytokin i chemokin prozapalnych, uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej np. TNF- α , IL-1 β i IL-6, w wielu typach komórek. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu aktywności IL-10, wiele kwestii dotyczących sygnalizacji IL-10/STAT3 pozostaje jednak nierozstrzygniętych. Badania przeprowadzone na modelu komórek makrofagów, stymulowanych bakteryjnym LPS sugerują m.in aktywację innych szlaków sygnałowych, uczestniczących w sygnalizacji IL-10, np. szlaku p38 MAPK. Ponadto o złożoności mechanizmów definiujących aktywność IL-10, mogą świadczyć także wcześniejsze doniesienia o uczestnictwie innych kaskad sygnalizacyjnych tj. PI3K/Akt/mTOR w toku aktywności przeciwzapalnej IL-10 [119,122,123].

Szczególną cechą IL-10 jest wielokierunkowe działanie, odgrywające istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi zapalnej na etapie jej wygaszania. Główne mechanizmy działania IL-10 opierają się m.in. na udziale w hamowaniu transkrypcji cytokin i chemokin zapalnych, ograniczeniu prezentacji antygenów oraz produkcji cząsteczek kostymulujących i adhezyjnych, warunkując ochronę przed autoimmunizacyjnym uszkodzeniem tkanek. Pomimo tych ważnych funkcji przeciwzapalnych, IL-10 może przyczynić się do powstania różnorodnych i pozornie przeciwstawnych efektów biologicznych. Wzmoczona aktywność sygnalizacji IL-10, po podaniu ogólnoustrojowym niesie za sobą możliwość stymulacji efektów prozapalnych, np. aktywacji limfocytów T CD8⁺ oraz produkcji cząstek prozapalnych takich jak IFN- γ i cytotoxicylnych, takich jak granzym B, co może częściowo przyczynić się do wyjaśnienia funkcjonalnej plejotropii tej cytokiny. Z kolei obecność interferonu typu I promuje produkcję IL-10 w mysich makrofagach, ludzkich monocytach i komórkach dendrytycznych, potwierdzając wysoką współzależność funkcjonowania tych dwóch czynników w procesach immunomodulacji [124,125].

Podjmując próbę opisu potencjalnego zastosowania IL-10 w poszczególnych jednostkach chorobowych, wiele doniesień podkreśla kluczową rolę receptora IL-10 w chorobach o podłożu zapalnym w tym chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, w których

opisano rolę IL-10 jako czynnika uczestniczącego w ograniczaniu uszkodzeń neuronów podczas infekcji oraz pośredniego regulatora neurogenezy [126]. Z kolei badania epidemiologiczne łączą niską produkcję IL-10 z zespołem metabolicznym i otyłością, co wydaje się potwierdzać badanie Rajbhandari i wsp. prezentujące zależność braku sygnalizacji IL-10 u myszy karmionych pokarmem wysokoenergetycznym z niewystępowaniem otyłości związanej z dietą [127]. Wcześniejsze doniesienia sugerowały także, że wzrost ekspresji IL-10 może promować przeciwzapalną aktywność makrofagów M2 w tkance tłuszczowej, oraz hamować odpowiedź prozapalną w mysich adipocytach, za pośrednictwem szlaku NF- κ B [128].

Mutacja receptora IL-10 α w komórkach makrofagów jelitowych prowadziła w badaniach *in vivo* do ciężkiego zapalenia okrężnicy w odpowiedzi na komensalną florę jelitową [129]. Z kolei u myszy z niedoborem IL-10 wykazano zwiększoną podatność na rozwój wstrząsu septycznego, potwierdzając znaczenie IL-10 jako regulatora negatywnego sprzężenia zwrotnego w układzie odpornościowym [130]. Niektóre doniesienia dowodzą także o istotnej roli IL-10 w procesach regulacji macierzy zewnątrzkomórkowej i funkcji fibroblastów, co może także wskazywać na potencjalną rolę IL-10 w procesach gojenia ran [131].

1.6. Rola monocytów i makrofagów w patogenezie miażdżycy

Miażdżyca stanowi obecnie główny czynnik przyczyniający się do globalnej epidemii chorób sercowo-naczyniowych, których powikłania zakrzepowe tj. udar niedokrwienny, zawał mięśnia sercowego czy niestabilna dławica piersiowa stały się główną przyczyną zgonów, zarówno w rejonach o wysokim dochodzie, jak również w krajach rozwijających się. Jedną z głównych przyczyn globalnej powszechności występowania miażdżycy, określanej jako choroba cywilizacyjna XXI wieku jest bezobjawowy przebieg patologii, utrudniający wczesne wykrycie zmian, a co za tym idzie późna diagnoza i wysoka śmiertelność [132].

Z patofizjologicznego punktu widzenia miażdżyca uważana jest za przewlekłą chorobę naczyń krwionośnych, charakteryzującą się powstawaniem swoistych dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń z towarzyszącymi naciekami zapalnymi. W trakcie rozwoju choroby dochodzi do przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, wynikającej z nasilonych procesów włóknienia, silnie związanej z występowaniem miejscowego stanu zapalnego oraz zmianami profilu lipidowego krwi, skorelowanego z apoptotyczną śmiercią makrofagów [133].

Rozwój blaszki miażdżycowej jest procesem wieloetapowym, mającym swój początek w procesach adhezji jednojądrzastych komórek leukocytów (głównie monocytów) do komórek śródbłonka naczyniowego, wskutek zwiększonej ekspresji czynników adhezyjnych np. cząstki adhezyjnej komórek naczyniowych 1/2 (ang. *vascular cell adhesion molecules*, VCAM-1/2) i odpowiadających im ligandów tj. integryn np. integryny $\alpha 4\beta 1$ (ang. *very late antigen 4*, VLA-4) na powierzchni monocytów/limfocytów T [134]. Tworzenie swoistych połączeń monocyt - komórki śródbłonka, przy jednoczesnej aktywacji czynników chemotaktycznych np. MCP-1, poprzez relatywny receptor CCR2, prowadzi do przechodzenia monocytów przez błonę podstawną i konwersji do makrofagów uzyskujących fenotypy uwarunkowane lokalnymi bodźcami. Modyfikowalnymi czynnikami predysponującymi do inicjowania zmian w obrębie komórek śródbłonka mogą być uszkodzenia czynnościowe, palenie tytoniu, stres oksydacyjny, otyłość, nadprodukcja zaawansowanych produktów glikacji (w cukrzycy), a w szczególności zmodyfikowane cząstki cholesterolu LDL (gł. formy utlenione) związane z postępującą hipercholesterolemią [135].

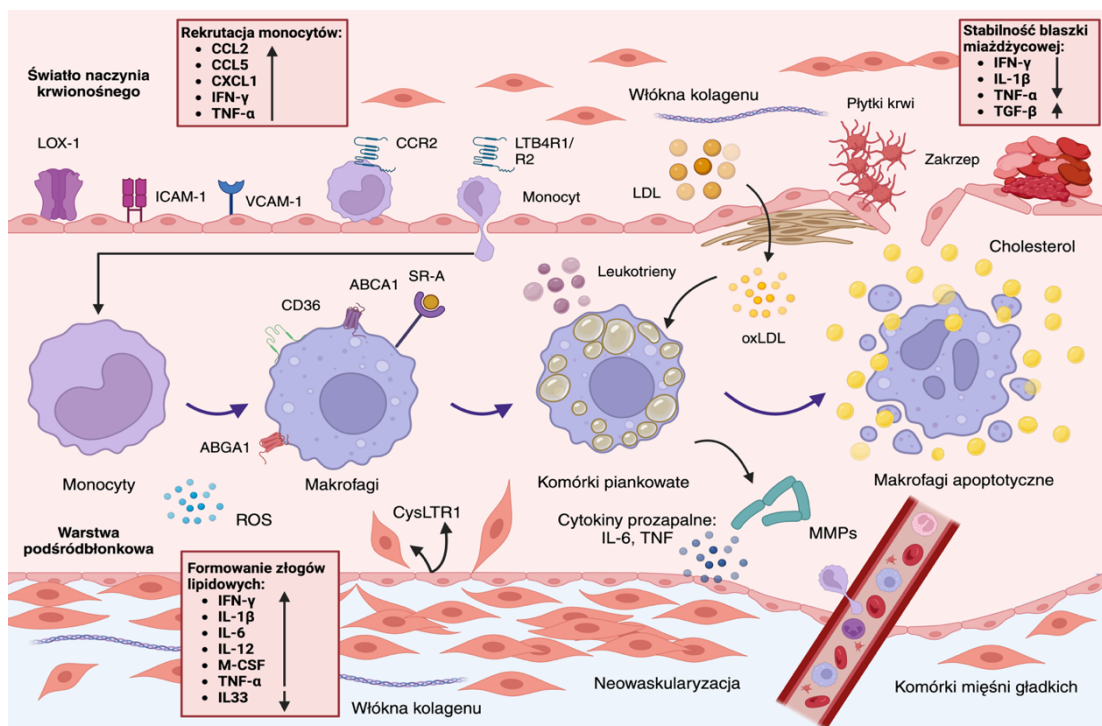
We wczesnych stadiach rozwoju blaszki miażdżycowej największe gromadzenie lipidów ma miejsce w regionie podśródbłonkowym, gdzie zostają uwięzione w wyniku interakcji między dodatnio naładowanymi apolipoproteinami (apoB), a ujemnie naładowanymi łańcuchami bocznymi proteoglikanu i składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej komórek

mięśni gładkich (ang. *Smooth muscle cells*, SMC). Gromadzenie lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*, LDL), lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoprotein*, VLDL) oraz pozostałości lipoprotein bogatych w trójglicerydy, poddawanych procesom agregacji i utleniania, a także obecność cząstek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna (ICAM-1 i VCAM-1) indukuje aktywację komórek endotelialnych, rekrutujących większe ilości leukocytów, w tym neutrofilii, limfocytów, płytek krwi oraz monocytów do przestrzeni podśródbłonkowej [136]. Konwersja monocytów do komórek makrofagów skutkuje pobieraniem zagregowanej i utlenionej frakcji LDL (ang. *oxidized low-density lipoprotein*, ox-LDL), co prowadzi do ich przekształcenia w komórki piankowate, wypełnione cholesterolem. Późniejsze etapy rozwoju zmiany miażdżycowej inicjują formowanie włóknistej czapeczki, ochraniającej powstałą blaszkę włóknisto - tłuszczową, oraz bogatego w lipidy rdzenia nekrotycznego powstającego w następstwie apoptozy komórek piankowatych oraz zaktywowanych makrofagów i limfocytów, tworzących wspólnie kompleks stabilnej blaszki miażdżycowej [137]. Postępujące procesy zapalne, wraz z towarzyszącym stopniowym zanikiem fizjologicznego światła naczynia, wynikającym z procesów nagromadzenia złogów lipidowych prowadzą do uwalniania metaloproteinaz, trawiących składowe tkanki łącznej tj. kolagen, elastynę, skutkując ścieńczeniem pokrywy włóknistej i powstawaniem niestabilnej, podatnej na urazy mechaniczne blaszki miażdżycowej [138].

Początku rozwoju zmian miażdżycowych upatruje się w procesach nasilenia ekspresji receptorów TLR4 przez endogenne ligandy (np. ox-LDL) oraz egzogenne cząstki bakteryjne np. LPS, prowadząc do aktywacji szlaku TLR4/MyD88/NF- κ B oraz inicjacji produkcji białkowych komponentów inflamasomu (ang. *NLR family pyrin domain containing 3*, NLRP3), będącego wiodącym kompleksem odpowiedzialnym za aktywację IL-1 β , co stanowi wstęp do produkcji i wydzielania wtórnych cytokin prozapalnych tj. IL-6, kluczowych w procesach rozwoju blaszki miażdżycowej [139].

Stymulacja komórek makrofagów bakteryjnym LPS, znanym jako ligand receptorów TLR4 istotnie reguluje szybkość wychwytu cząstek lipidowych przez komórki makrofagów za pośrednictwem wzrostu ekspresji białek związanych z transportem i przechowywaniem lipidów (ADRP/ADFP) oraz zestawu białek wiążących lipidy (ALBP), znajdującego się na powierzchni komórek piankowatych [140]. Kluczową rolę w formowaniu złogów lipidowych odgrywają także szlaki sygnałowe kinaz MAP. Jedną z wiodących ról przypisuje się kinazie MAP p38, odgrywającej główną rolę w regulacji syntezy MCP-1, uczestniczącej w procesach rekrutacji monocytów, cytokin prozapalnych tj. TNF- α , IL-1 β , IL-6 czy IL-8, a także w procesach adhezji

i chemotaksji. Jak wykazano w licznych modelach *in vivo* produkcja mediatorów przeciwzapalnych tj. TGF- β i IL-10 zmniejsza podatność do formowania blaszek miażdżycowych w obrębie największych naczyń. W modelu *in vivo* myszy z upośledzoną funkcją receptora IL-10, u zwierząt poddanych wysokotłuszczowej diecie obserwowano nasiloną tendencję do powstawania zmian miażdżycowych, zwiększoną infiltrację komórek efektorowych wraz z nasiloną ekspresją IFN- γ , jako jednego z wiodących związków stymulujących procesy destabilizacji blaszek miażdżycowych [141]. Podsumowanie czynników wpływających na procesy destabilizacji blaszek miażdżycowych zaprezentowano na poniższym schemacie (**rycina 8**) [142].



Rycina 8: Procesy uczestniczące w powstawaniu blaszki miażdżycowej – wpływ mediatorów zapalnych. W czerwonych ramkach podano czynniki regulujące procesy powstawania złogów lipidowych: \uparrow - wpływ stymulujący, \downarrow - wpływ hamujący na procesy rozrostu oraz stabilizacji blaszki miażdżycowej. Opracowanie własne na podstawie: [142].

Patofizjologia rozwoju procesów miażdżycowych jest silnie korelowana z ekspresją specyficznych receptorów na powierzchni komórek makrofagów, w tym tzw. receptorów zmiataczy (ang. *scavenger receptors*, SR) np. SR-A1, CD36, lektynopodobnego receptora oxLDL-1 (LOX-1), zaliczanych do grupy receptorów rozpoznających wzorce, o wysokim powinowactwie do utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości (oxLDL) [143,144].

Kluczowym receptorem uczestniczącym w procesach fagocytozy zależnej od SR i pinocytozy, a tym samym przyczyniającym się do wychwytu 75-90% zmodyfikowanych

lipoprotein jest receptor CD36, obejmujący dwie domeny zewnątrzkomórkowe i dwie domeny transbłonowe, dystrybuowany w wielu typach komórek, w tym monocytach, makrofagach, adipocytach czy komórkach nabłonkowych. Interakcja oxLDL z CD36 inicjuje endocytozę kompleksu CD36-oxLDL, prowadząc do gromadzenia oxLDL wewnątrz komórek makrofagów. Oprócz pośredniczenia w wychwycie lipidów, CD36 moduluje procesy proliferacji i migracji komórek w obrębie zmian miażdżycowych, a jego nieprawidłowa regulacja może sprzyjać rozwojowi stanów zapalnych [143].

Z uwagi na istotną funkcję receptora w procesach formowania blaszki miażdżycowej CD36 jest powszechnym celem terapeutycznym, wykorzystywanym w terapii z udziałem preparatów syntetycznych np. statyn, ograniczających ilość rozpuszczalnej frakcji CD36 (sCD36), regulując tym samym wychwyt oxLDL przez monocyty i makrofagi. Wzrost ekspresji CD36 został silnie skorelowany z insulinoopornością i wyższym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu II, a jego wzmożona ekspresja została zaobserwowana w monocytach pacjentów z chorobą wieńcową i ostrym zespołem wieńcowym, u których 6-miesięczne leczenie atorwastatyną znacząco hamowało ekspresję CD36 [145].

Alternatywnie, nadmiar cholesterolu i fosfolipidów może być transportowany do zewnątrzkomórkowej apolipoproteiny A-I (apoA-I) i lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) przez transportery kasety wiążącej adenosynotrójfosforan A1 (ABCA1), transportery kasety wiążącego adenosynotrójfosforan G1 (ABCG1), uczestniczących w odwrotnym transporcie wolnego cholesterolu, na drodze modulacji ekspresji czynników transkrypcyjnych receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR- γ) i wątrobowego receptora X α (ang. *liver X receptor alpha*, LXRA), podczas gdy aktywacja czynnika jądrowego NF- κ B antagonizuje ich ekspresję [146].

Na przestrzeni lat prowadzono intensywne poszukiwania rozwiązań ograniczających rozwój miażdżycy na pierwszych etapach powstawania zmian, a także metod terapeutycznych znajdujących zastosowanie w pomocniczej terapii zaawansowanych stadiów choroby. Pomimo braku bezpośrednich dowodów na to, że selektywna inhibicja stanu zapalnego może cofać postęp zmian miażdżycowych, badania kliniczne jednoznacznie wykazały, że modulacja stanu zapalnego może zapobiegać powstawaniu miażdżycy i jej powikłaniom [142]. Ponadto zmiana wcześniejszych poglądów opisujących miażdżycę jako stan postępujący i nieodwracalny, na rzecz możliwości modyfikacji i odwracalności jej przebiegu dało podstawę do intensywnych poszukiwań środków mogących znaleźć zastosowanie w terapii i prewencji choroby [147]. W metaanalizie opisującej 4 prospektywne badania kohortowe, z udziałem niemal 56 tysięcy

uczestników bezsprzecznie wykazano bezpośredni wpływ zdrowego stylu życia na zmniejszenie narażenia na choroby sercowo-naczyniowe. Co więcej wśród uczestników o wysokim ryzyku genetycznym, zdrowy styl życia, ograniczający rozwój procesów zapalnych (aktywność fizyczna, zbilansowana dieta, oparta o produkty nieprzetworzone, prawidłowa masa ciała, brak aktywnego palenia) wiązał się z prawie 50% niższym względnym rozwojem ryzykiem choroby wieńcowej [148].

Plejotropowe mechanizmy działania surowców pochodzenia naturalnego wynikające z współdziałania poszczególnych grup metabolitów wyspecjalizowanych dały podstawę do oceny wpływu poszczególnych surowców roślinnych na procesy związane z progresją zmian miażdżycowych. Lee i wsp. zaobserwowali, że przedstawiciel polifenoli, kwercetyna stymuluje sygnalizację LXR α , a następnie zwiększa ekspresję białka transportera ABCA1 i wpływ cholesterolu z makrofagów różnicowanych z linii komórek THP-1, wskazując, na potencjalną rolę kwercetyny lub pokarmów bogatych w kwercetynę we wspomagającej terapii niwelującej ryzyko rozwoju choroby [149]. S-allilocysteina, najobficiej występujący związek siarki organicznej w dojrzałym ekstrakcie czosnkowym, stymuluje ekspresję białka ABCA1 *in vitro* [150]. Z kolei spożywanie oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia przez 12 tygodni indukowało zależną od stężenia regulację ekspresji ABCG1 w ludzkich makrofagach [151].

1.7. Receptory TLR

Wrodzony układ odpornościowy stanowi pierwszą linię obrony organizmu ludzkiego w odpowiedzi na bodźce pochodzenia endo i egzogenne, o charakterze szkodliwym. Do grupy komórek uczestniczących w inicjacji odporności wrodzonej zalicza się monocyty, makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne, komórki NK, komórki tuczne, eozynofile i bazofile. W przeciwieństwie do limfocytów T i B, komórki odporności wrodzonej nie wykazują specyficzności receptorów rozpoznawania antygenów, wspólnie uczestnicząc w inicjacji odpowiedzi immunologicznej. W procesie nieswoistej odpowiedzi na kontakt z patogenami decydującą rolę odgrywają receptory rozpoznające wzorce molekularne, zwane również receptorami rozpoznawania wzorca (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRRs), należące do rodziny białek transbłonowych lub cytoplazmatycznych. PRRs odznaczają się zdolnością rozpoznawania specyficznych wzorców molekularnych unikalnych dla danego patogenu (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), nieobecnych w układzie macierzystym, jak również cząstek wzorcowych zwanych „alarminami”, uwalnianych z komórek uszkodzonych, najczęściej w czasie inicjacji procesów nekrotycznych lub pyroptycznych (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) [99]. Obecność niektórych cząstek PAMP w organizmie człowieka np. bakteryjnego LPS jest typowa, ze względu na stałą obecność drobnoustrojów komensalnych. Do dobrze scharakteryzowanych DAMP należą z kolei białko o wysokiej mobilności grupy 1 (ang. *High-Mobility Group Box-1*, HMBG-1), IL-1 α , IL-33, ATP (ang. *adenosine triphosphate*) oraz mitochondrialne DNA [152].

Najwcześniej odkrytym, a zarazem najlepiej scharakteryzowanym podtypem receptorów PRRs są receptory toll-podobne (TLR), należące do rodziny integralnych glikoprotein błonowych typu I, o budowie homo lub heterodimerycznej. Z uwagi na pełnioną funkcję ukierunkowaną na aktywację określonych szlaków komórkowych, TLR należą do grupy aktywujących, powierzchniowych PRRs, nieuczestniczących w procesach fagocytozy [153].

Budowa receptorów TLR opiera się na trzech domenach strukturalnych: zewnątrzkomórkowym motywie bogatym w leucynę (ang. *Leucine rich repeats*, LRRs) pośredniczącym w rozpoznawaniu ligandów, domenie transmembranowej oraz cytoplazmatycznej domenie TIR (ang. *Toll/IL-11 receptor homology domain*) inicjującej właściwą sygnalizację przez specyficzne dla TLR sygnalizacyjne białka adaptorowe (MyD88, TRIF, TRAM lub SARM) [154,155].

Rodzina białek TLR jest reprezentowana przez 13 członków, wykazujących ekspresję na komórkach eukariotycznych. U człowieka zidentyfikowano 10 genów kodujących białka receptorów TLR. Podtypy numerowane kolejno od TLR1 do TLR10 ulegają ekspresji na większości komórek ludzkiego układu odporności wrodzonej oraz znacznej części komórek niehematopoetycznych, takich jak neutrofile, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK, komórki tuczne, bazofile, eozynofile, czy komórki nabłonkowe [72]. Jedynie mieloidalne komórki dendrytyczne (DCs) wykazują ekspresję wszystkich 10 podtypów TLR. Kluczowe komórki układu odpornościowego tj. monocyty, makrofagi i neutrofile wykazują wzmożoną ekspresję TLR3, TLR4, TLR5 i TLR9, przy czym ekspresja TLR4 jest większa, a TLR9 mniejsza w makrofagach w porównaniu z monocytami, które nie wykazują ekspresji TLR3, TLR6, TLR7 i TLR10 [156].

Ekspresja receptorów TLR może zachodzić na poziomie zewnątrzkomórkowym (TLR1, TLR2, TLR 4, TLR6 i TLR6, TLR10) lub pochodzić z przedziałów wewnątrzkomórkowych, takich jak retikulum endoplazmatyczne, mitochondria czy fagolizosomy (TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 i TLR9). Wewnątrzkomórkowe TLR uczestniczą w rozpoznawaniu infekcji drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi (wirusami lub niektórymi bakteriami), a ich aktywacja następuje po fagocytozie drobnoustroju i uwolnieniu ligandów dla określonych receptorów [157,158].

Aktywacja poszczególnych receptorów TLR wynika z obecności specyficznych dla danego podtypu PAMP, unikalnych dla poszczególnych patogenów. Kaskada sygnałowa indukująca transkrypcję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, w odpowiedzi na informację o obecności patogenu wymaga korelacji wielu białek modulujących. W celu skutecznego rozpoznania patogenu większość receptorów TLR ulega procesom dimeryzacji, kluczowych dla zbliżenia wewnątrzkomórkowych domen TIR receptorów, tworzących miejsce wiązania dla białek adaptorowych. Dla kompleksów TLR1/2 oraz TLR2/6 dimeryzacja ma charakter heterogeny, co zwiększa zakres rozpoznawanych cząstek PAMP, podczas gdy w przypadku pozostałych receptorów proces ma charakter homodimeryzacji. Zakres ligandów receptorów TLR obejmuje także wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (DAMP) [159,160]. Szczegółowe podsumowanie PAMP i DAMP odpowiednich dla poszczególnych receptorów TLR przedstawiono w poniższej tabeli (**tabela 4**).

Tabela 4: Charakterystyka receptorów toll-podobnych [156].

TLR	Lokalizacja	Ligandy PAMP	Występowanie PAMP	Ligandy DAMP
Heterodimer TLR 1/TLR 2	Błona komórkowa	Bakteryjne lipopeptydy Zymosan Kwas lipoteichojowy	mikobakterie	β -defensyny
Heterodimer TLR 2/TLR6		Bakteryjne lipoproteiny Diacylowane lipopeptydy Kwasy teichojowe Peptydoglikan Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Paciorkowce z grupy B Drożdżaki	HMGB-1, amyloid A
TLR 3		Dwuniciowe RNA (dsRNA)	Niektóre wirusy	mRNA
TLR 4		Lipopolisacharyd (LPS) Mannany Glikoinozytolofosfolipidy	Bakterie Gram– Drożdżaki Wirusy	HMGB-1, fibronektyna, fibrynogen, amyloid A
TLR 5	Błona endosomu	Flagelina	Bakterie Gram–	nieznane
TLR 7		Jednociowe RNA (ssRNA)	Wirusy RNA	ssRNA
TLR 8		Jednociowe RNA (ssRNA)	Wirusy RNA	ssRNA
TLR 9		Niemetylowane CpG-DNA DNA Hemozoina	Bakterie Zarodziec malarii Wirusy DNA np. (z grupy opryszczki)	HMGB-1
TLR 10	Błona komórkowa	Cząsteczka profilinopodobna	nieznane	nieznane

Receptor TLR4

Jednym z najszerzej badanych receptorów z grupy TLR jest transbłonowy receptor typu I – TLR4. Głównym miejscem ekspresji TLR4 są monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki śródbłonkowe, komórki tłuszczowe oraz komórki nabłonkowe jelit i dróg oddechowych, dzięki czemu TLR4 uczestniczy w rozpoznawaniu drobnoustrojów już w pierwszych etapach powstawania zakażenia [161].

Głównym aktywatorem ekspresji receptora TLR4 jest bakteryjny LPS. Receptor TLR4 stanowi szczególny przypadek sposobu aktywacji TLR, w którym zewnątrzkomórkowe wiązanie ligandu odbywa się bezpośrednio przy udziale białka CD14 zakotwiczonego w zewnętrznej warstwie błony komórkowej oraz pośrednio przy udziale ko-receptora, białka MD-2 (określanego jako antygen limfocytów 96, kodowanego przez gen *LY96*) oraz białek wiążących lipopolisacharyd (ang. *Lipopolysaccharide binding protein*, LBP). Obecność kompleksu LBP-CD14 ułatwia umiejscowienie ligandu w pobliżu kompleksu TLR4/MD2, zwiększając skuteczność lokalizacji LPS. Wiązanie LPS z MD2/TLR4 inicjuje homodimeryzację receptora, poprzedzającą jego aktywację [72].

Podczas infekcji, TLR4 odpowiada na LPS obecny w tkankach i krwiobiegu, uruchamiając reakcje prozapalne ułatwiające eradykację bakterii inwazyjnych. Aktywowany TLR4 uruchamia dwie kaskady sygnalizacyjne: błonową z udziałem białek adaptorowych TIRAP i MyD88, oraz drugą, rozpoczynającą się we wczesnych endosomach po endocytozie receptora, z użyciem białek adaptorowych TRAM i TRIF. Wczesna faza odpowiedzi kompleksu TLR4-MD2-LPS powstającego po rozpoznaniu bakteryjnego LPS uruchamia kaskady sygnalizacyjne szlaku NF- κ B i kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK).

Endocytoza TLR4 kończy sygnalizację zależną od MyD88, podczas gdy następujące po niej dojrzewanie endosomów i lizosomalna degradacja TLR4 określają czas trwania i wielkość sygnalizacji zależnej od TRIF [162].

Przedłużona aktywacja TLR4 jest związana z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych, a także z chorobami autoimmunologicznymi i nowotworami. Szlak sygnalizacyjny receptora TLR4 jest uznawany za jeden z głównych czynników wyzwalających odpowiedź zapalną wywołaną otyłością [70]. Z kolei wykazano, że występowanie mutacji genu kodującego TLR4 związane jest ze zwiększoną podatnością na infekcje bakteryjne, przy jednoczesnym zmniejszeniu ryzyka rozwoju miażdżycy [156].

Proces aktywacji receptorów TLR

Jedną z funkcji receptorów TLR jest łączenie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej z odpowiedzią adaptacyjną, poprzez regulację aktywacji komórek prezentujących antygen i kluczowych cytokin zapalnych (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN) [163]. Specjalizacja podtypów receptorów TLR dla poszczególnych klas wzorców molekularnych umożliwia precyzyjne dostosowanie odpowiedzi zapalnej w celu skutecznej neutralizacji patogenu. Pomimo istotnych różnic strukturalnych w budowie poszczególnych ligandów TLR, mechanizm aktywacji receptorów przebiega w większości przypadków w sposób analogiczny (z wyjątkiem TLR4, którego aktywacja wymaga cząstki kostymulującej, co opisano powyżej). Proces dimeryzacji receptorów TLR zapoczątkowuje inicjację wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacji, uwarunkowanej przez kluczowe białka adaptorowe, prowadząc do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κ B, AP-1 (czynnik transkrypcyjny AP-1; ang. *activator protein 1*) i czynnika regulatorowego interferonu 3 (ang. *interferon regulatory factor*, IRF3). W zależności od tworzonych odrębnych kompleksów supramolekularnych, szlaki sygnalizacyjne TLR w monocytach i makrofagach są klasyfikowane głównie jako szlaki zależne od białek adaptorowych MyD88 lub TRIF [72].

Ścieżka MyD88-zależna

Aktywacja ekspresji genu MyD88 przez specyficzne ligandy prowadzi do rekrutacji kinaz I- rzędu związanych z receptorem IL-1 (IRAK 1/2/4), za pośrednictwem dodatkowego białka adaptorowego TIRAP/Mal. Białko TIRAP bierze udział w przekazywaniu sygnału od receptorów TLR2, TLR4 i TLR9 do białka MyD88. Warunkiem aktywacji dalszych szlaków sygnałowych jest inicjacja fosforylacji białka IRAK1, przez kinazę serynowo-treoninową IRAK4, skutkującej powstawaniem wielocząsteczkowego kompleksu myddosomu, złożonego z 6 cząstek MyD88, 4 cząstek IRAK4 i 4 cząstek IRAK2. Aktywacja IRAK1 aktywuje kaskadę szlaków promujących oddziaływanie z czynnikami związanymi z receptorem TNF np. TRAF6, prowadząc do aktywacji kolejnego przekaźnika sygnału, kinazy TAK1, należącej do dużej rodziny kinaz MAP3K. Kinaza TAK1 może aktywować substraty dwóch szlaków sygnałowych: kompleksu kinazy inhibitora czynnika NF- κ B (ang. *I κ B kinase*, IKK) oraz kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK) [164].

Kompleks kinazy I κ B (IKK) stanowi złożoną strukturę białkową, która pełni kluczową rolę w regulacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego κ B (NF- κ B), zaangażowanego w liczne procesy biologiczne, związane z przebiegiem stanu zapalnego i procesów apoptotycznych. Kompleks IKK zbudowany jest z trzech głównych podjednostek: dwóch podjednostek katalitycznych IKK α (kodowaną przez gen *CHUK*) i IKK β (kodowaną przez gen *IKKB*) oraz podjednostki regulatorowej, zwanej NEMO (ang. *nuclear factor- κ B essential modulator*) lub IKK γ (IKBK γ) [165]. Kanoniczny szlak NF- κ B, zaangażowany w regulację transkrypcji większości mediatorów procesu zapalnego, może przebiegać z udziałem poszczególnych białek zidentyfikowanych w komórkach ssaków: p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB i c-Rel. W warunkach homeostazy czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest zlokalizowany w cytoplazmie w formie nieaktywnego dimeru p50/p65 połączonego z białkami I κ B [164].

Fosforylacja białka IKK β jest krytycznym etapem w procesie aktywacji kompleksu IKK, który prowadzi do fosforylacji i ubikwitynacji I κ B α . Powyższa kaskada skutkuje zahamowaniem interakcji między I κ B α , a NF- κ B co umożliwia jego degradację w proteasomie oraz uwolnienie i translokację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B do jądra komórkowego. Translokacja podjednostki inicjuje ekspresję genów kodujących cytokiny zapalne, takie jak interleukiny (IL-6 i IL-1 β), chemokiny i czynniki martwicy nowotworów (TNF- α), które odgrywają istotną rolę w odpowiedziach immunologicznych i stanach zapalnych. Translokacja

podjednostki NF- κ B ma także pośredni wpływ na ekspresję czynników przeciwzapalnych np. TGF- β i IL-10 [152].

W szlaku kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny (MAPK), aktywowana kinaza TAK1 odgrywa kluczową rolę jako mediator sygnałów prowadzących do etapowej aktywacji członków rodziny MAPK. Aktywacja TAK1 prowadzi do fosforylacji i aktywacji kinaz MKK4/7 oraz MKK3/6, oraz konsekwentnej regulacji kinazy domeny N-końcowej białka Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinase*, JNKs) oraz kinazy p38. Za pośrednictwem IKK β dochodzi także do aktywacji MKK1/2, który dodatkowo fosforyluje i aktywuje zewnątrzkomórkową kinazę białkową regulowaną sygnałem 1 i 2 (ERK1/ERK2) [166].

Dalsza fosforylacja rodziny białek c-Jun i c-Fos inicjuje aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1, pośredniczącego w ekspresji cytokin: IL-6, IL-1, IL-2, IL-12, TNF α i chemokin prozapalnych CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1. Rozpoznanie ligandów przez wewnątrzkomórkowe receptory TLR, takie jak TLR7, TLR8 i TLR9, za pośrednictwem szlaku MyD88-zależnego prowadzi także do aktywacji czynnika IRF3, indukującego ekspresję genów interferonów typu I, takich jak interferon- α (IFN- α) i interferon- β (IFN- β) [167].

Ścieżka MyD88-niezależna

Aktywacja ekspresji czynników zapalnych w komórkach monocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych może odbywać się także z udziałem białka adaptorowego TRIF, w szlaku MyD88- niezależnym. Szlak zależny od TRIF jest specyficzny tylko dla kilku TLR, takich jak TLR3 i TLR4, podczas gdy do aktywacji TLR4 wymagana jest dodatkowa obecność białka TRAM. TRIF promuje również zależną od TRAF3 aktywację kinazy związanej z IKK kinazy wiążącej TANK 1 (ang. *TANK Binding Kinase-1*, TBK1). TRAF3 aktywuje TBK1 i inhibitor kinazy NF- κ B (IKKi) wraz z NEMO do fosforylacji i dimeryzacji czynnika regulacyjnego interferonu 3, IRF3 [168].

Translokacja czynnika IRF3 do jądra komórkowego indukuje transkrypcję genów specyficznych dla interferonu β (IFN β). W ścieżce MyD88-niezależnej dochodzi także do „opóźnionej” aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, manifestującej się wzrostem wydzielania cytokin prozapalnych w odpowiedzi na bakteryjny LPS [72].

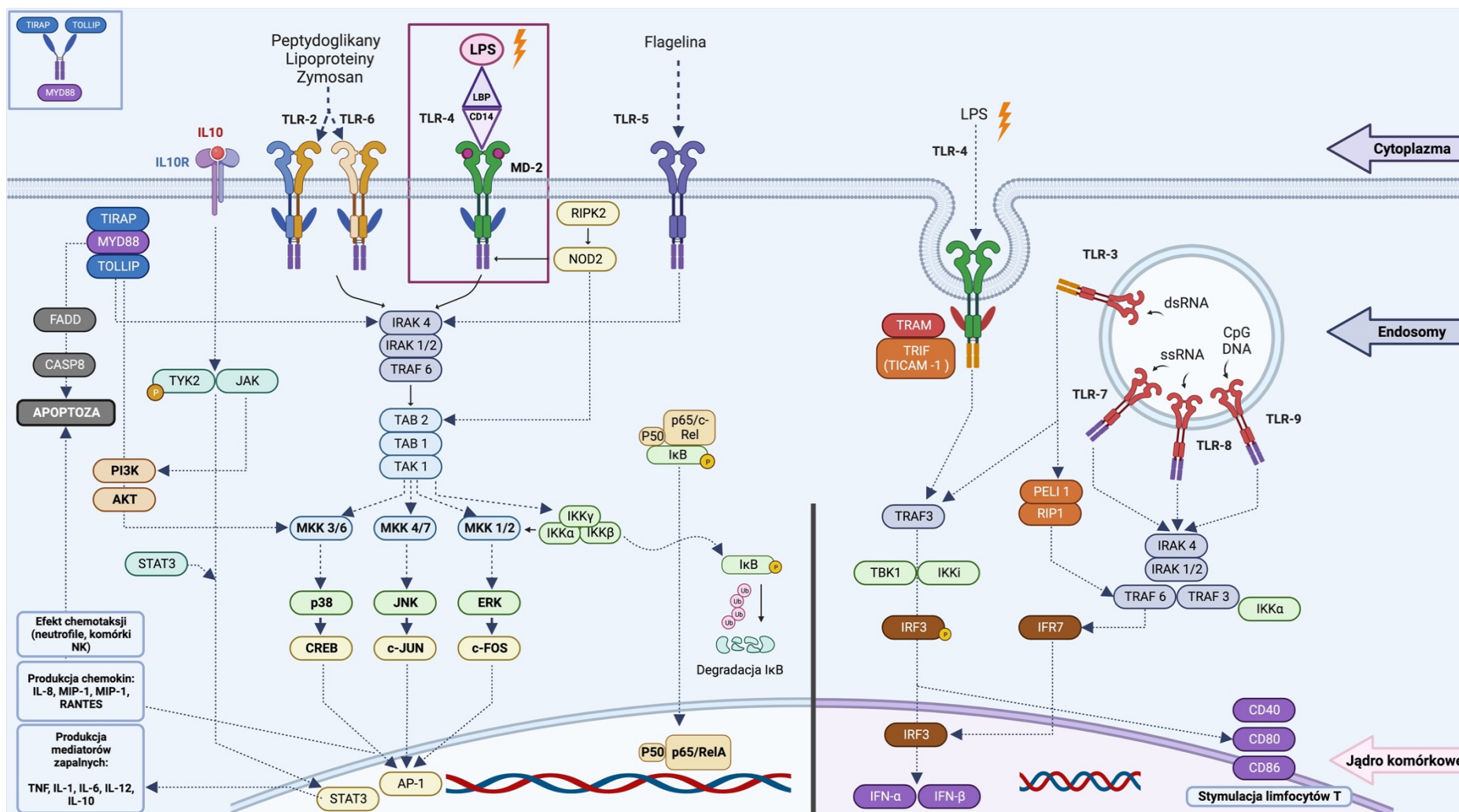
Udział sygnalizacji TLR w procesach chorobotwórczych

Nadmierna aktywacja receptorów TLR warunkowana obecnością bodźców pochodzenia endo i egzogenego może być przyczyną uszkodzenia tkanek, wynikającej m.in. ze zbyt silnej aktywności prozapalnej komórek monocytów i makrofagów [169].

Jednym ze skutków wynikających z aktywacji receptorów TLR w makrofagach jest nasilenie procesów fagocytozy oraz prezentacji antygenów dla komponentów adaptacyjnego układu odpornościowego. Z uwagi na to, nieprawidłowa aktywizacja receptorów TLR przez autoantygeny oraz czynniki egzogenne leży u podłoża przewlekłych ogólnoustrojowych zaburzeń o podłożu zapalnym (np. cukrzyca typu II, miażdżyca, astma), chorób autoimmunologicznych (reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), toczeń rumieniowaty układowy (SLE), stwardnienie rozsiane czy choroba Leśniowskiego-Crohna) [73,170] oraz neurodegeneracyjnych (np. choroba Alzheimer) [171]. Wiele doniesień podkreśla także udział nasilonej, przewlekłej ekspozycji komórek na LPS prowadzącej do powstawania zjawiska „burzy cytokinowej” oraz hipercytokinemii i zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych w przebiegu sepsy. Mutacje genu kodującego TLR4 wiążą się ze zwiększoną podatnością na infekcje o podłożu bakteryjnym oraz rozwoju miażdżycy, natomiast mutacje w obrębie TLR5 zostały skorelowane ze zwiększoną zachorowalnością na zapalenie płuc wywołane przez *Legionella pneumophila* [172].

Poszukiwanie związków wpływających zarówno na pozytywną jak i negatywną regulację kontrolowanych przez TLR ścieżek sygnalizacyjnych, w odpowiedzi na zróżnicowane PAMPs jest przedmiotem badań także wśród związków pochodzenia naturalnego [173-175].

Poniższa rycina (**rycina 9**) stanowi kompleksowe podsumowanie szczegółowych ścieżek przekazywania sygnałów za pośrednictwem receptorów TLR. W toku niniejszej pracy szczególną uwagę zwrócono na aktywację receptorów TLR4 za pośrednictwem LPS, akcentowaną na powierzchni komórek makrofagów. Ocena wpływu związków z grupy lignanów na ekspresję TLR4 zapewni wgląd w niepoznane dotąd molekularne mechanizmy działania lignanów, stanowiąc gruntowny wstęp do poszerzonych w warunkach *in vivo*.



Rycina 9: Schemat przekazywania sygnałów za pośrednictwem receptorów TLR oraz szlaków pokrewnych. Opracowanie własne na podstawie [153].

2. Cel badania i główne hipotezy badawcze

Przewlekły stan zapalny o niskim stopniu nasilenia leży u podstawy rozwoju przewlekłych chorób niezakaźnych (NCDs) takich jak miażdżycy, cukrzyca typu II i choroby układu sercowo-naczyniowego, a także czynników predysponujących tj. otyłość, nadciśnienie, hiperlipidemia oraz insulinooporność. Uwzględniając wielokierunkowe aspekty, w tym względy ekonomiczne, niedoskonałość terapii lekami syntetycznymi wynikającą m.in. z występowania niebezpiecznych działań niepożądanych, celowym wydaje się więc zwiększenie nacisku na edukację zdrowotną, związaną z samokontrolą spożywanych posiłków, profilaktykę opartą o pełnowartościowe produkty spożywcze, a także uzupełnienie tradycyjnej farmakoterapii racjonalną fitoterapią.

Według doniesień Światowej Organizacji Zdrowia około 80% populacji w krajach rozwijających się docenia wartość medycyny tradycyjnej jako elementu terapii, przy czym aż 40% preparatów farmaceutycznych w skali globalnej opiera się na produktach pochodzenia naturalnego [176]. Koreluje to z faktem ciągłego poszukiwania struktur o wysokim poziomie bezpieczeństwa i skuteczności terapeutycznej, stanowiąc aktualnie jedno z największych wyzwań, a tym samym jeden z nadrzędnych celów współczesnej farmacji. Z uwagi na plejotropowe mechanizmy działania substancji naturalnych, wynikające z różnorodności strukturalnej, a także tworzenia licznych metabolitów pośrednich, o znamiennej aktywności biologicznej, surowce roślinne stanowią w ostatnich latach cenne źródło substancji wprowadzanych do leczenia lub stosowanych jako bazę do tworzenia nowych połączeń o potencjale terapeutycznym [177].

Pragnąc wpisać się w powyższy kontekst badawczy, **celem** niniejszej pracy była kompleksowa analiza składu fitochemicznego wyciągów, przygotowanych z liści 4 gatunków roślin z rodziny Oleaceae oraz izolacja jednorodnych związków chemicznych dominujących w ich składzie. Dodatkowo **celem** pracy była szczegółowa ocena aktywności przeciwzapalnej badanych wyciągów oraz pojedynczych związków, prowadząca do wytypowania grupy wtórnych metabolitów roślinnych o najwyższym potencjale przeciwzapalnym i wyjaśnienia mechanizmów działania najaktywniejszych struktur.

Realizacja przedstawionych celów badawczych ma być odpowiedzią na postawioną **hipotezę**, zakładającą rolę roślin z rodziny Oleaceae jako źródła związków czynnych, wykorzystywanych w pomocniczej terapii przewlekłych chorób o podłożu zapalnym.

Realizacja postawionych celów naukowych opierała się o poniższe cele szczegółowe:

1. Analiza fitochemiczna liści 4 gatunków roślin należących do rodziny Oleaceae (*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl, *Forsythia × intermedia* Zabel, *Forsythia europaea* Degen & Bald., *Fraxinus excelsior* L.).
2. Izolacja jednorodnych związków chemicznych z grupy lignanów, fenyloetanoidów i sekoirydoidów z wyciągów *F. suspensa*, *F. × intermedia* oraz *F. excelsior*.
3. Ocena wpływu wyciągów roślinnych na produkcję mediatorów zapalnych (TNF- α , IL-6, IL-1 β) i przeciwzapalnych (TGF- β) oraz ekspresję IL-10R w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC.
4. Ocena wpływu wybranych związków z grupy lignanów, enterolignanów, fenyloetanoidów, glikozydów fenylopropanoidowych, sekoirydoidów, flawonoidów na produkcję mediatorów zapalnych (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1) i przeciwzapalnych (IL-10) oraz ekspresję IL-10R w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC oraz makrofagów TDM.
5. Ocena wpływu wybranych związków z grupy lignanów na przekaźnictwo sygnału za pośrednictwem receptorów TLR oraz ekspresję ścieżek sygnałowych MAPK i NF- κ B.
6. Ocena wpływu związków z grupy lignanów na zmiany w procesach akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów, za pośrednictwem receptorów CD36, transporterów ABCA1 oraz szlaków towarzyszących.

Stopień aktywności badanych wyciągów i pojedynczych związków oceniono w dwóch modelach komórkowych: prawidłowych komórkach monocytów/makrofagów PBMC izolowanych z krwi obwodowej oraz makrofagów TDM. Ocenę stopnia aktywności porównano do działania substancji o udowodnionej skuteczności przeciwzapalnej (deksametazon) oraz hipolipemizującej (pitawastatyna).

3. Materiały i metody

3.1. Materiały do badań fitochemicznych

Tabela 5: Odczynniki do analizy fitochemicznej.

Nazwa	Pochodzenie
Aceton (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Acetonitryl (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Acetonitryl, <i>isocratic grade</i> , do LC-MS	Merck, Darmstadt, Niemcy
β -glukozydaza z migdałów, ≥ 2 jednostek/mg masy	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Celulaza z <i>Aspergillus niger</i> , 1,56 U/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Chloroform-d (CDCl_3)	Amar AG, Döttingen, Szwajcaria
Dichlorometan (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Dimetylosulfotlenek (DMSO) (cz.d.a.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
DMSO-d6	Amar AG, Döttingen, Szwajcaria
Kwas mrówkowy (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Kwas octowy (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Kwas siarkowy (VI) (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Metanol (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Metanol, <i>isocratic grade</i> , do LC-MS	Merck, Darmstadt, Niemcy
Metanol-d4	Amar AG, Döttingen, Szwajcaria
Octan sodu, $\geq 98,0\%$,	POCh, Gliwice, Polska
Octan etylu (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Wanilina, $\geq 99,0\%$	Loba Feinchemie, Apolda, Niemcy

Tabela 6: Inne materiały do analizy fitochemicznej.

Nazwa	Pochodzenie
Filtry strzykawkowe z membraną $0,2 \mu\text{m}$ i $0,45 \mu\text{m}$	Macherey-NAgel GmbH & Co. KG, Duren, Niemcy
Kolumny chromatograficzne szklane o wymiarach $80 \times 2,5 \text{ cm}$, $40 \times 3 \text{ cm}$	ChemLand, Stargard, Polska
Kolumna chromatograficzna Zorbax SB-C18 ($150 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$, $1,9 \mu\text{m}$)	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Kolumna chromatograficzna Zorbax SB-C18 ($150 \text{ mm} \times 21,2 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Komora chromatograficzna $20 \times 20 \text{ cm}$ do TLC	ChemLand, Stargard, Polska
TLC 60G F ₂₅₄ płytki szklane $10 \times 20 \text{ cm}$ pokryte żelem krzemionkowym	Merck, Darmstadt, Niemcy
Złoże Sephadex-LH20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy

Tabela 7: Aparatura używana do analizy fitochemicznej.

Nazwa	Pochodzenie
Chromatograf preparatywny (HPLC-PREP) z systemem LC20-AP z detektorem frakcji FRC-10A Shimadzu	Shimadzu, Japonia
Kolektor frakcji, Teledyne ISCO	Lincoln, NE, USA
Liofilizator, FreeZone 4.5 Plus	Labconco, Missouri, USA
pH metr, Orion Star A111	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spektrometr Bruker Avance III 500 Bruker BioSpin	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Niemcy
Ultrasprawy chromatograf cieczowy UHPLC- 3000 RS (Dionex, Dreieich, Niemcy) z detektorem z matrycą diodową (DAD) sprzężony ze spektrometrem mas typu pułapka jonowa i interfejsem ESI AmaZon SL	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Niemcy
Wyparka rotacyjna Rotavator R-3	Buchi, Flawil, Szwajcaria

3.2. Materiał roślinny do badań fitochemicznych oraz badań biologicznych

Materiał roślinny stanowiły ekstrakty alkoholowo-wodne, przygotowane z liści gatunków należących do rodziny Oleaceae – *Forsythia suspensa*, *Forsythia × intermedia*, *Forsythia europaea* oraz napar i jego frakcje, przygotowany z liści *Fraxinus excelsior*.

Materiał do badań pozyskano ze stanu naturalnego na terenie Polski (Łódź, Warszawa, Legionowo, Chełm), a także w ramach współpracy m.in. z Ogrodem Botanicznym Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie oraz Katedrą Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Tożsamość materiału roślinnego została zidentyfikowana na podstawie danych literaturowych [13], a także wiedzy botaników Łódzkiego Uniwersytetu Medycznego oraz Warszawskiego Ogródu Botanicznego. Okazy zielnikowe materiału użytego do badań zostały zachowane do wglądu w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Zebrany materiał roślinny, został wysuszony w temperaturze pokojowej, rozdrobniony, a następnie zabezpieczony w odpowiednich warunkach temperatury i wilgotności do dalszych badań fitochemicznych. Dane na temat użytych surowców naturalnych oraz wyciągów podsumowano w poniższej tabeli (**tabela 8**).

Tabela 8: Surowce roślinne oraz wyciągi użyte do badań.

Material do badań	Źródło
SUROWCE ROŚLINNE	
Liście forsycji zwisłej – <i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	Stan naturalny Łódź, Polska 51°45' N, 19°28' E
Liście forsycji pośredniej – <i>Forsythia</i> × <i>intermedia</i> Zabel (<i>F. suspensa</i> × <i>F. viridissima</i>)	Stan naturalny: Legionowo, Polska: 52°25' N i 20°53' E; Chełm, Polska: 51°09' N i 23°28'E
Liście forsycji europejskiej – <i>Forsythia europaea</i> Degen & Bald.	Ogród botaniczny Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie
WYCIĄGI	
Napar z liści jesionu wyniosłego (<i>Fraxinus excelsior</i> L.), jego frakcje wodne i metanolowo-wodne o rosnącej procentowości (20, 50, 70, 100%), a także subfrakcje przygotowane z wyciągów 20% i 50%	Wykonano w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej WUM Źródło materiału: Warszawa, Polska (52°12' N 21°00'E)
Wyciągi metanolowo-wodne (75% v/v) z liści forsycji zwisłej (<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl)	Wykonano w Katedrze Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Źródło materiału: Ogród Botaniczny w Łodzi oraz Arboretum Leśnego Zakładu Doświadczalnego SGGW w Rogowie
Wyciągi metanolowo-wodne (75% v/v) z liści forsycji pośredniej (<i>Forsythia</i> × <i>intermedia</i> Zabel)	Wykonano w Katedrze Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Źródło materiału: Ogród Botaniczny w Łodzi oraz Arboretum Leśnego Zakładu Doświadczalnego SGGW w Rogowie
Wyciągi metanolowo-wodne (75% v/v) z liści forsycji europejskiej (<i>Forsythia europaea</i> Degen & Bald.)	Wykonano w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Uzupełnienie materiałów do badań biologicznych stanowiły jednorodne związki z grupy lignanów, sekoirydoidów, flawonoidów, fenyloetanoidów i glikozydów fenylopropanoidowych wyizolowane w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z roślin z rodziny Oleaceae (kwiaty forsycji pośredniej, liście, kwiaty i kora lilaka pospolitego), a także innych surowców naturalnych (nasion lnu i sezamu, z których pozyskano sekoizolariciresinol i jego diglukozyd oraz sezaminol; owoców łośnianu większego, jako źródła diarktygeniny; drzewa jodły pospolitej – źródła cyklolaricirezynolu, oraz hydroksymatairezynolu, a także owoców krokosza barwierskiego, z którego pozyskano trachelogeninę).

Substancje stosowane w ramach kontroli pozytywnych oraz inne substancje do badań biologicznych np. enterolignany zakupiono komercyjnie lub pozyskano w ramach wcześniejszych badań w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Szczegółową charakterystykę badanych struktur, z uwzględnieniem źródła ich pochodzenia zaprezentowano w poniższej tabeli (**tabela 9**).

Tabela 9: Związki użyte do badań biologicznych.

Nr	Nazwa związku	Surowiec źródłowy	
LIGNANY			
1.	Arktygenina	Liście i kwiaty forsycji pośredniej (<i>F. × intermedia</i>)	[33]
2.	Diarktygenina	Owoce łopianu (<i>Arctium lappa</i> L.)	-
3.	Cyklolaricirezynol	Drewno jodły pospolitej (<i>Abies alba</i> Mill.)	[178]
4.	Głukozyd oliwilo	Kora lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[179]
5.	Oliwil	Kora lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[179]
6.	Hydroksymatairezynol	Drewno jodły pospolitej (<i>Abies alba</i> Mill.)	[178]
7.	Secoizolaricirezynol (SECO)	Nasiona lnu (<i>Linum</i> L.)	-
8.	Diglukozyd sekoizolaricirezynolu (SDG)	Nasiona lnu (<i>Linum</i> L.)	-
9.	Sezaminol	Nasiona sezamu (<i>Sesamum</i> L.)	-
10.	Trachelogenina	Owoce krokosza barwierskiego (<i>Carthamus tinctorius</i>)	-
SEKOIRYDOIDY			
11.	Demetylooleonuzhenid	Kwiaty lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[180]
12.	Epiframerozyd	Liście lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[181]
13.	Hydroksyoleonuzhenid	Kwiaty lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[180]
14.	oleonuzhenid	Liście lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[181]
15.	Oleuropeina	Liście lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[181]
FENYLOETANOIDY			
16.	Forsytozyd B	Kora lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[179]
17.	Oleoechinakozyd	Liście lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[181]
GLIKOZYDY FENYLOPROPANOIDOWE			
18.	Syringina	Kora lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[181]
FLAWONOIDY			
19.	Rutozyd	Kwiaty lilaka pospolitego (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	[180]
INNE			
20.	Enterodiol	Metabolit jelitowy	[33]
21.	Enterolakton	Metabolit jelitowy	[33]
22.	Deksametazon	Zakupiono w Sigma Aldrich	-
23.	Pitawastatyna	Zakupiono w Cayman Chemical Company	-
24.	Cholesterol (rozpuszczalny w wodzie)	Zakupiono w Sigma Aldrich	-

3.2.1. Przygotowanie ekstraktów octanowych do izolacji jednorodnych związków chemicznych

Z dokładnie wysuszonych i rozdrobnionych liści dwóch gatunków forsycji przygotowano wyciągi metanolowo-wodne (75% v/v). Materiał roślinny (liście *F. suspensa*: 100 g, liście *F. × intermedia*: 300 g) pięciokrotnie ekstrahowano 75% roztworem metanolu w stosunku ilościowym 1:150 w każdym powtórzeniu, każdorazowo macerując surowiec przez 24 godziny. Wyciągi przesączono dwukrotnie przez filtr bibułowy, a następnie odparowano metanol z użyciem wyparki rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem, w temp. 60°C. Zagęszczoną pozostałość wodną ekstrahowano 6-krotnie, octanem etylu, w stosunku 1:1. Zebrane frakcje octanowe odparowano do suchej pozostałości z użyciem wyparki rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem, w temp. 60°C. Uzyskane ekstrakty poddano analizie LC-DAD-ESI-MS/MS i zachowano do dalszych analiz fitochemicznych.

3.3. Metody badawcze

3.3.1. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS)

Próbki do analizy chromatograficznej przygotowano rozpuszczając 5 mg zliofilizowanego wyciągu lub frakcji w metanolu z dodatkiem 0,1% roztworu wodnego kwasu mrówkowego (8:2), osiągając końcowe stężenie roztworu 5 mg/ml. Przygotowane roztwory przefiltrowano przez filtry strzykawkowe z membraną 0,45 µm.

Analizę LC-DAD-ESI-MS/MS przeprowadzono z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej UHPLC z detektorem z matrycą diodową (DAD) i spektrometrem mas typu pułapka jonowa oraz interfejsem ESI. Rozdział prowadzono na kolumnie Zorbax SB-C18 (150 mm × 2,1 mm, 1,9 µm). Fazę ruchomą stanowił 0,1% kwas mrówkowy w wodzie (A) i 0,1% kwas mrówkowy w acetonitrylu (B). Do rozdziału związków zastosowano gradient: 0-60 min, 5-40% B. Woda wchodząca w skład fazy ruchomej była przygotowana przy użyciu systemu oczyszczającego Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, MA, USA) (18.2 MΩ cm). Eluenty z chromatografu cieczowego były wprowadzane do interfejsu ESI bez dzielnika. Analizę prowadzono w trybie jonów ujemnych, z następującymi parametrami: ciśnienie nebulizatora - 40 psi; natężenie przepływu gazu suszącego - 9 l/min; temperatura azotu: 300°C; napięcie kapilarne - 4,5 kV. Masy jonów rejestrowano w zakresie 100 do 2200 m/z. Widma UV były rejestrowane przy długości fal 190-450 nm. Wielkość nastrzyku wynosiła 5 µl. Charakterystykę poszczególnych składników analizowanych wyciągów przeprowadzono na podstawie widm UV-VIS, jonów pseudomolekularnych i profili ich fragmentacji.

3.3.2. Chromatografia kolumnowa (CC) i cienkowarstwowa (TLC)

Scharakteryzowane fitochemicznie, octanowe ekstrakty roślinne, uprzednio odparowane do sucha rozpuszczono w odpowiedniej ilości rozpuszczalnika. Frakcjonowanie wyciągów przeprowadzono metodą chromatografii kolumnowej, z użyciem szklanych kolumn chromatograficznych, o wymiarach 80 × 2,5 cm, 40 × 3 cm. Jako fazę stacjonarną użyto Sephadex LH-20. Poszczególne frakcje o objętości 5 ml zbierano do probówek laboratoryjnych z wykorzystaniem kolektora frakcji, stosując grawitacyjny przepływ fazy ruchomej, niewymuszony dodatkowym ciśnieniem zewnętrznym. W zależności od stopnia polarności składników poszczególnych frakcji jako fazy ruchomej używano mieszanin wodno-metanolowych o różnej procentowości.

Analizę TLC prowadzono na płytkach szklanych (10 × 20 cm), pokrytych żelem krzemionkowym. Płytki rozwijano w komorze pionowej, uprzednio nasyconej parami fazy ruchomej, którą stanowiła mieszanina dichlorometanu i metanolu (93:7 v/v). Chromatogramy wywoływano poprzez ogrzanie płytek do temp. 105°C, uprzednio spryskanych odczynnikiem wywołującym – 1% roztworem waniliny w stężonym kwasie siarkowym (VI).

3.3.3. Chromatografia preparatywna (HPLC-PREP)

W celu izolacji jednorodnych związków, zliofilizowane frakcje wyciągów roślinnych rozpuszczono w DMSO, otrzymując końcowe stężenie w zakresie 50-200 mg/ml. Roztwory przefiltrowano przez filtry strzykawkowe z membraną 0,45 µm.

Izolację jednorodnych związków prowadzono z wykorzystaniem chromatografii preparatywnej (HPLC-PREP) w systemie LC20-AP. Rozdziału dokonano na kolumnie Zorbax SB-C18 (150 mm × 21,2 mm, 5 µm). Faza ruchoma składała się z mieszaniny 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (A) i 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B). Woda wchodząca w skład fazy ruchomej była przygotowana przy użyciu systemu oczyszczającego Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, MA, USA) (18.2 MΩ cm). Rozdział prowadzono z zastosowaniem gradientu: 0–60 min, 5–40% B, przy objętości nastrzyku: 400 µL i prędkości przepływu: 20 ml/min oraz stałej temperaturze kolumny, wynoszącej 25°C. Detekcję prowadzono przy długościach fali $\lambda_1=280$ nm oraz $\lambda_2=325$ nm. Struktury wyizolowanych związków ustalano w oparciu o widma NMR ^1H , ^{13}C i dwuwymiarowe.

3.3.4. Hydroliza enzymatyczna

W celu otrzymania aglikonów: filigeniny oraz epipinorezynolu, niezbędnych do badań biologicznych przeprowadzono proces hydrolizy enzymatycznej. Filirybę oraz 4'-*O*-glukozyd epipinorezynolu rozpuszczono w uprzednio przygotowanym buforze octanowym (50 nM, pH 4,5). Roztwory inkubowano w łaźni wodnej przez 24 godziny, w temperaturze 60°C, z dodatkiem odpowiednich ilości enzymów: β- glukozydazy oraz celulazy.

Po upływie czasu inkubacji roztwór ekstrahowano octanem etylu, odwirowano (4000 rpm, 15 min) w celu oddzielenia aglikonów od roztworu enzymów i pozostałych produktów reakcji enzymatycznej. Fazę organiczną odparowano i zachowano do dalszych oznaczeń. Struktury związków potwierdzono w oparciu o widma NMR ¹H, ¹³C i dwuwymiarowe.

3.3.5. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Analizy NMR wykonano w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, we współpracy z Panią dr hab. n. farm Martą Dudek. Widma NMR ¹H, ¹³C wraz z widmami dwuwymiarowymi (ROESY, COSY, HSQC, HMBC) rejestrowano przy użyciu spektrometru Bruker Avance III 500 odpowiednio przy częstotliwościach 500 i 126 MHz i wyposażonego w 5 mm głowicę sondy BBFO. Przesunięcia chemiczne odniesiono do sygnałów rozpuszczalnika: odpowiednio 3,31 i 49,50 ppm dla ¹H i ¹³C w metanolu-d₄.

3.3.6. Przygotowanie roztworów wyciągów oraz związków do badań biologicznych

Wyciągi roślinne rozpuszczono w odpowiedniej ilości roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanami, bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (DPBS), osiągając końcowe stężenie 1 mg/ml. Ocenę aktywności wyciągów *in vitro* prowadzono dla stężenia wyciągu – 50 µg/ml.

Roztwory związków (w tym kontroli pozytywnych, np. pitawastatyna, deksametazon) zostały przygotowane przez rozpuszczenie w sterylnym roztworze DMSO (tak aby jego końcowe stężenie nie przekraczało 0,1% całkowitej końcowej objętości), a następnie uzupełnione do odpowiedniej objętości roztworem DPBS. Ocenę aktywności związków *in vitro* prowadzono dla związków w zakresie stężeń 10-50 µM. Przygotowane roztwory wyciągów oraz związków przefiltrowano przez jałowe filtry strzykawkowe z membraną 0,2 µm do jałowych probówek typu Eppendorf.

3.4. Odczynniki do badań w warunkach *in vitro*

3.4.1. Odczynniki do izolacji i hodowli komórkowych

Tabela 10: Lista odczynników stosowanych do izolacji i hodowli komórkowych.

Nazwa	Pochodzenie
IZOLACJA PBMC	
DPBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pancoll human (1,077 g/ml) – medium do separacyjnej izolacji komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej	PAA Laboratories GmbH, Austria
HODOWLA PBMC ORAZ KOMÓREK LINII THP-1	
Antybiotyki: penicylina, streptomycyna, amfoterycyna B	PAA Laboratories GmbH, Austria
Gentamycyna	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Medium RPMI 1640 GlutaMAX, wzbogacone o HEPES (25 mM), z dodatkiem czerwieni fenolowej	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Medium RPMI 1640, z L-glutaminą (2 mM) oraz dodatkiem czerwieni fenolowej	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Medium RPMI 1640, z L-glutaminą (2 mM) bez dodatku czerwieni fenolowej	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Płodowa surowica bydlęca (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS) nieinaktywowana	Biowest, Rue de la Caille, Francja

3.4.2. Odczynniki do eksperymentów laboratoryjnych

Tabela 11: Lista odczynników stosowanych do eksperymentów laboratoryjnych.

Nazwa	Pochodzenie
2-merkaptioetanol, $\geq 99,0\%$	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
30% roztwór akrylamidu i N,N'-metyleno-bisakrylamidu w wodzie dejonizowanej, 29:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
4× Laemmli Sample Buffer (277,8 mM Tris-HCl, pH 6,8 + 44,4% (v/v) glicerol + 4,4% LDS + 0,02% błękit bromofenolowy)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Assay Diluent BD OptEIA (PBS + 10% FBS)	BD Biosciences, San Diego, USA
Azydek sodu, NaN_3 , $\geq 99,5\%$	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Albumina z surowicy bydlęcej (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Bufor RIPA do lizy komórek – RIPA Lysis buffer 10×	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Chloroform (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Coating Buffer BD OptEIA	BD Biosciences, San Diego, USA
Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences, San Diego, USA

Nazwa	Pochodzenie
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Bazylea, Szwajcaria
Dimetylosulfotlenek (DMSO), ≥ 99.9%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Fenozol	A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Human IL-1β ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human IL-10 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human TGF-β ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human TNF-α ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human MCP-1 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Izopropanol (cz.d.a.)	POCh, Gliwice, Polska
Jodek propidyny (PI)	BD Biosciences, San Diego, USA
Kwas aminooctowy (glicyna), ≥ 98.0%	ChemPur, Piekary Śląskie, Polska
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), ≥ 99,0%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Laurylosiarczan sodu (SDS), ≥ 99.9%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Lipopolisacharyd (z <i>Escherichia coli</i> 0111:B4)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Marker masy białka PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mieszanina inhibitorów fosfataz – Phosphatase inhibitor cocktail 2	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Mieszanina inhibitorów proteaz – Protease inhibitor cocktail	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Mirystyniano-octan forbolu (PMA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
MTT – bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolylo)-2,5-difenylo-2H-tetrazolium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Nieenzymatyczny roztwór do odklejania komórek	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Odtłuszczone mleko	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Oil Red O	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
BD OptEIA™ Reagent Set B	BD Biosciences, San Diego, USA
Pepstatyna (inhibitor proteaz aspartylowych)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Przeciwciało szczurze, przeciwko IL-10 znakowane fikoerytryną (PE Rat Anti-Human IL-10)	BD Biosciences, San Diego, USA
Przeciwciało mysie, przeciwko CD68 znakowane fluoresceiną (FITC Mouse Anti-Human CD68)	BD Biosciences, San Diego, USA
Przeciwciało mysie, przeciwko NF-κB p65 znakowane fikoerytryną (PE anti-NF-κB p65)	BD Biosciences, San Diego, USA
Przeciwciała I- rzędowe: anti-β-actin, anti-ERK 1/2, anti-phospho-ERK 1/2, anti-HO-1, anti-JNK, anti-phospho-JNK, anti-NF-κB (p65), anti-phospho-NF-κB (p65), I anti-KK, anti-phospho-IKK, anti-Nrf2	Abclonal, Woburn, USA

Nazwa	Pochodzenie
Przeciwciała I- rzędowe: anti-ABCA1, anti-CD36	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Przeciwciała II-rzędowe, Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Przeciwciała II-rzędowe, Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Abclonal, Woburn, USA
Roztwór Ponceau S (0,1%, w/v) w 5% kwasie octowym	Pol-Aura, Warszawa, Polska
RT ² Profiler PCR Array TLR, PAHS-018ZA	Qiagen, Hilden, Germany
RT ² SYBR Green qPCR Mastermix	Qiagen, Hilden, Germany
Stain Buffer	BD Biosciences, San Diego, USA
Stop Solution BD OptEIA	BD Biosciences, San Diego, USA
Substrate Reagents A+B BD OptEIA (TMB - tetrametylobenzzydina + nadtlenek wodoru)	BD Biosciences, San Diego, USA
SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ GAPDH; Hs03929097	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ IL-6; Hs00985639	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ MCP-1; Hs00234140	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ TNF-α; Hs01113624	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina), ≥ 99%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Total RNA Mini, Zestaw do izolacji całkowitego RNA	A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska
Tris base; bufor Tris; (2-amino-2-hydroksymetylopropano-1,3-diol), ≥ 99.9%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Trypsyna-EDTA (0,25 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Tween 20 (Polisobrat 20)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy
Wash Concentrate BD OptEIA (PBS + 0,05% Tween-20)	BD Biosciences, San Diego, USA
Zestaw High-Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.4.3. Sprzęt laboratoryjny

Tabela 12: Wykaz stosowanego sprzętu laboratoryjnego.

Nazwa	Pochodzenie
Aparat do rozdzielania elektroforetycznego białek i ich transferu	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Cytometr przepływowo FACSCalibur, oprogramowanie CellQuest Pro	BD Biosciences, USA
Czytnik mikroplątek, BioTek Synergy 4, oprogramowanie Gen5	BioTek Instruments Inc., USA
Fluorymetr Qubit® 2.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Inkubator do hodowli komórkowych	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kołyśka laboratoryjna – Mini Blot Mixer	VWR, Pensylwania, USA
Komora z nawiewem laminarnym Jouan MSC12	Jouan S.A., Francja
Mieszadło magnetyczne	ChemiLab, Tarnobrzeg, Polska
Mikroskop odwrócony, Nikon ECLIPSE TS100F z kamerą cyfrową Nikon Digital Sight DS-U2, oprogramowanie NIS-Elements BR 2.30	Nikon, Japonia
Orbitalna wstrząsarka do mikroplątek – Shaker DTS-2	ELMI, Kalifornia, USA
Plastik laboratoryjny: butelki do hodowli komórkowej nieadherentnej o powierzchni 75 cm ² , płytki do hodowli komórkowych adherentnych, 6-dołkowe, 12-dołkowe, 24-dołkowe, sterylne; pipety serologiczne, sterylne (25/10/5 ml), probówka typu Falcon (50 ml i 15 ml)	BD Falcon TM, USA
Płytki 96 dołkowe: MicroWell™ oraz Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Próbówki biochemiczne, podciśnieniowe, poj. 9 ml z przyspieszaczem wykrzepiania oraz próbówki biochemiczne, podciśnieniowe, poj. 9 ml z heparyną sodową	Medlab- products, Polska
Płuczka do mikroplątek EL×50 BioTek	Biokom systems, Janki, Polska
Spektrofotometr UV-Vis Q5000	Quawell, San Jose, USA
System do obrazowania żeli, ChemiDoc™ MP Imaging System, z programem do analizy densytometrycznej ImageLab 5.1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Termocykler LightCycler® 480 System	Roche Bazylea, Szwajcaria
Termocykler ViiA™7 Real-Time PCR System,	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wirówka laboratoryjna, MPW-350R	MPW, Warszawa, Polska
Wirówka laboratoryjna – Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Zestaw płytek szklanych do wylewania żeli	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

3.5. Modele komórkowe

I. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PMBC)

Komórki izolowano z krwi obwodowej zdrowych ochotników, płci męskiej, poniżej 35 roku życia, deklarujących się jako osoby niepalące i nieprzyjmujące stałej farmakoterapii. Krew pozyskano komercyjnie z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie (ul. Saska 63/75, Warszawa). Anonimowi dawcy wyrazili pisemną zgodę na wykorzystanie pobranej krwi do celów badawczych, o czym zostali poinformowani przez pracowników Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie. Praca z materiałem hematologicznym została zaaprobowana przez lokalną Komisję Bioetyczną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (numer zgody: AKBE/54/2023).

Biorąc pod uwagę krótki czas życia (około 8 dni) oraz niską procentową zawartość komórek jednojądrzastych we krwi obwodowej ($0,5 - 3 \times 10^6$ kom./ml), do każdego pojedynczego eksperymentu wykonywano osobną izolację komórek.

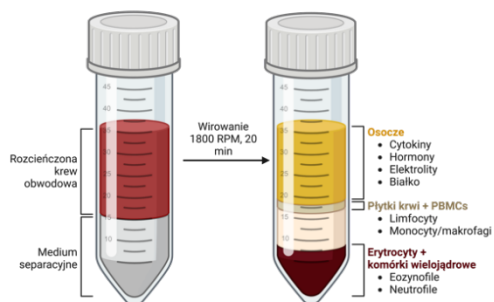
Izolacja komórek PBMC oraz hodowla komórek monocytów/makrofagów

Przygotowanie medium hodowlanego

- Medium RPMI 1640 GlutaMAX, wzbogacone o HEPES (25 mM), z dodatkiem czerwieni fenolowej, 500 ml
- Antybiotyki: penicylina (10 000 U/ml), streptomycyna (10 000 µg/ml), amfoterycyna B (25 000 U/ml) (5 ml), gentamycyna (10 000 µg/ml) (0,5 ml)
- Dla każdego indywidualnego pacjenta przygotowywano roztwór surowicy autologicznej w ilości 100 µl/ml, stanowiącej dodatek do medium hodowlanego (10%)

Próbki krwi były pobierane do probówek podciśnieniowych typu Vacutest z heparyną sodową, w ilości 2 sztuk od każdego dawcy (2×9 ml). Próbki krwi przeznaczone do otrzymania surowicy były pobierane do probówek z aktywatorem krzepnięcia (1×9 ml). Izolację komórek rozpoczynano w możliwie najkrótszym czasie po odebraniu próbek krwi (<1 godzina). Krew obwodową przenoszono do probówek typu Falcon i rozcieńczano ciepłym roztworem DPBS w stosunku 1:1. Następnie ostrożnie nawarstwiano po 18 ml rozcieńczonego roztworu krwi na każde 9 ml medium separacyjnego. Probówki typu Falcon wirowano przez 20 minut z prędkością 1800 rpm w 4°C.

Po zakończeniu wirowania powstały pierścień komórek jednojądrzastych zebrano do nowych probówek typu Falcon (50 ml), uzupełniając zawiesinę do objętości 40 ml zimnym roztworem DPBS. Probówki wirowano przez 20 minut z prędkością 1800 rpm w temp. 4°C. Czynność powtórzono dwukrotnie. Otrzymany pelet komórkowy delikatnie zawieszono w ogrzonym do 37°C roztworze medium hodowlanego i wysiano w



Rycina 10: Schemat izolacji komórek PBMC z ludzkiej krwi obwodowej. Opracowanie własne.

ilości 1 ml zawiesiny komórek (5×10^5 kom./ml) na 1 dołek płytki hodowlanej 12-dołkowej. Probówki na surowicę, z przyspieszaczem wykrzepiania wirowano przez 10 minut z prędkością 2800 rpm w temp. 4°C. Następnie do nowych, sterylnych probówek typu Falcon zebrano otrzymany supernatant (nie naruszając warstwy skrzepu). Do każdego dołka płytki 12-dołkowej dodano po 100 μ l surowicy autologicznej (10%), uzyskanej z krwi tożsamego dawcy. Według piśmiennictwa zawartość komórek PBMC w powstałych izolatach komórkowych wynosi 10-30% monocytów/makrofagów oraz 70-90% leukocytów [182,183]. Zgodnie z cytowaną metodyką, komórki pozostawiono na okres 2-godzinnej inkubacji w standardowych warunkach hodowli (37°C, 5% CO₂, 90-95% wilgotności), umożliwiając adhezję komórek monocytów/makrofagów do dna płytki hodowlanej [182]. Po upływie czasu inkubacji, usunięto medium hodowlane wraz z nieadherentnymi komórkami PBMC. Dno dołków z adherentnymi monocytami/makrofagami przepłukano roztworem ciepłego DPBS, a następnie dodano świeże medium hodowlane, z dodatkiem surowicy autologicznej. Komórki monocytów/makrofagów hodowano przez kolejnych 5 dni, zmieniając medium hodowlane co 48 godzin. Komórki monocytów/makrofagów w kolejnych częściach pracy nazywane będą „monocytami/makrofagami PBMC”. Schematyczny model izolacji komórek PBMC oraz hodowli komórek monocytów/makrofagów PBMC zaprezentowano na **rycinie 10** oraz **rycinie 11**.



Rycina 11: Schemat hodowli komórek monocytów/makrofagów PBMC. Opracowanie własne.

II. Linia komórkowa THP-1 (ATCC TIB 202)

THP-1 to monocytarna linia komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pacjenta z ostrą białaczką monocytarną, będąca powszechnie wykorzystywanym modelem badawczym, stosowanym podczas oceny właściwości immunomodulacyjnych związków syntetycznych oraz pochodzenia naturalnego. Powszechne zastosowanie powyższego modelu komórkowego do badania mechanizmów aktywności związków pochodzenia naturalnego wynika z relatywnie łatwej hodowli, odpowiedzi komórkowej zbliżonej do fizjologicznej odpowiedzi komórek monocytów i makrofagów, wyrażonej w ekspresji licznych receptorów specyficznych dla komórek makrofagów, a także wysokiej wrażliwości na czynniki różnicujące [184].

Hodowlę komórkową prowadzono w butelkach hodowlanych do hodowli nieadherentnej, o powierzchni wzrostu 75 cm², w standardowych warunkach hodowli (5% CO₂, 37°C, 90-95% wilgotności). Hodowlę prowadzono do momentu osiągnięcia 70 - 80% konfluencji, nie dopuszczając do przekroczenia stężenia komórek 1 × 10⁶ kom./ml. Medium hodowlane zmieniano co 2-3 dni. Liczbę komórek w zawieszynie oraz ich żywotność oceniano z użyciem komory Thoma, w roztworze barwionym 0,4% roztworem błękitu trypanu. Badania przeprowadzono z użyciem pasaży 4 – 22.

Przygotowanie medium hodowlanego

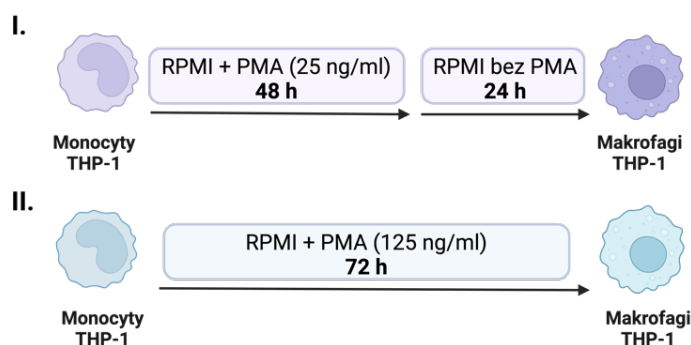
- Medium RPMI 1640, z L-glutaminą oraz z/bez dodatkiem/dodatku czerwieni fenolowej, 500 ml
- Antybiotyki: mieszanina penicyliny (10 000 U/ml) i streptomycyny (10 000 µg/ml), 5 ml (1%)
- Nieinaktywowana termicznie płodowa surowica bydlęca (FBS), 50 ml (10%)

Różnicowanie komórek

Znaczna część badań niniejszej pracy została wykonana z użyciem modelu komórek makrofagów powstałych w wyniku różnicowania monocytarnej linii THP-1 (ang. *THP-1 derived macrophages*, TDM). Komórki THP-1 oraz TDM w kolejnych częściach pracy nazywane będą odpowiednio „monocytami” oraz „makrofagami”.

Monocyty różnicowano na płytkach hodowlanych, w pełnym medium hodowlanym z dodatkiem octanu mirystynianu forbolu (PMA), według dwóch przyjętych protokołów różnicowania. Schemat I zakładał 48-godziną stymulację komórek z roztworem PMA (25 ng/ml), z dodatkową 24-godziną inkubacją w pełnym medium hodowlanym, bez czynnika różnicującego. Schemat II zakładał ciągłą, 72-godziną inkubację z PMA (125 ng/ml). Sposoby

różnicowania komórek THP-1 według przyjętych schematów różnicowania przedstawiono na poniższej rycinie (**rycina 12**).



Rycina 12: Metody różnicowania monocytarnej linii komórek THP-1. Opracowanie własne.

W zależności od przyjętego modelu badawczego komórki różnicowano w ilości niezbędnej do przeprowadzenia określonych procedur, stosując się do założeń podsumowanych w poniższej tabeli (**tabela 13**). Etapy oceniające stopień wpływu związków/wyciągów na poszczególne czynniki rozwoju stanu zapalnego realizowano z wykorzystaniem modeli 1, 4. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [185], w celu oceny wpływu związków na procesy związane z akumulacją cholesterolu w komórkach makrofagów użyto modeli 2, 3.

Tabela 13: Charakterystyka przyjętych modeli badawczych.

Model badawczy	Rodzaj płytki	Schemat różnicowania	Ilość kom. / ml medium hodowlanego
1.	6 - dołkowa	I	1×10^6
2.		II	1×10^6
3.	12 - dołkowa	II	6×10^5
4.	24 - dołkowa	I	4×10^5

Każdy eksperyment badawczy przygotowano uwzględniając następujące elementy doświadczenia:

- Kontrola niestymulowana (KNST), z dodatkiem równoważnej ilości DMSO (nie przekraczającej 0,1% całkowitej objętości roztworu) oraz dodatkiem DPBS (w ilości równoważnej z ilością dodawaną do kontroli stymulowanej oraz prób badanych).
- Kontrola stymulowana (KST), uwzględniająca dodatek równoważnej ilości DMSO (nie przekraczającej 0,1% całkowitej objętości roztworu) oraz dodatek roztworu LPS w DPBS.

- Kontrola pozytywna, uwzględniająca dodatek związku rozpuszczonego w DMSO oraz dodatek roztworu LPS w DPBS.
- Próby badane, uwzględniające dodatek wyciągu/związku badanego rozpuszczonego w DMSO/DPBS oraz dodatek roztworu LPS w DPBS.

3.6. Metody badawcze

3.6.1. Określenie stopnia ekspresji receptora CD68

Ekspresja receptora CD68 jest minimalna w monocytach, jednakże obserwuje się jej wyraźny wzrost w zróżnicowanych makrofagach [186]. Z uwagi na rozbieżne doniesienia dotyczące długości inkubacji z PMA niezbędnej do zmiany profilu komórek, dla modelu różnicowania nr I oceniono profil ekspresji markera powierzchniowego CD68, w zależności od czasu różnicowania [187,188]. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, a także uwzględniając obserwację wyglądu morfologicznego komórek, dla modelu różnicowania komórek nr II, zakładającego nieprzerwaną, 72-godziną inkubację z odczynnikiem różnicującym nie wykonywano pomiaru ekspresji receptora CD68 [185].

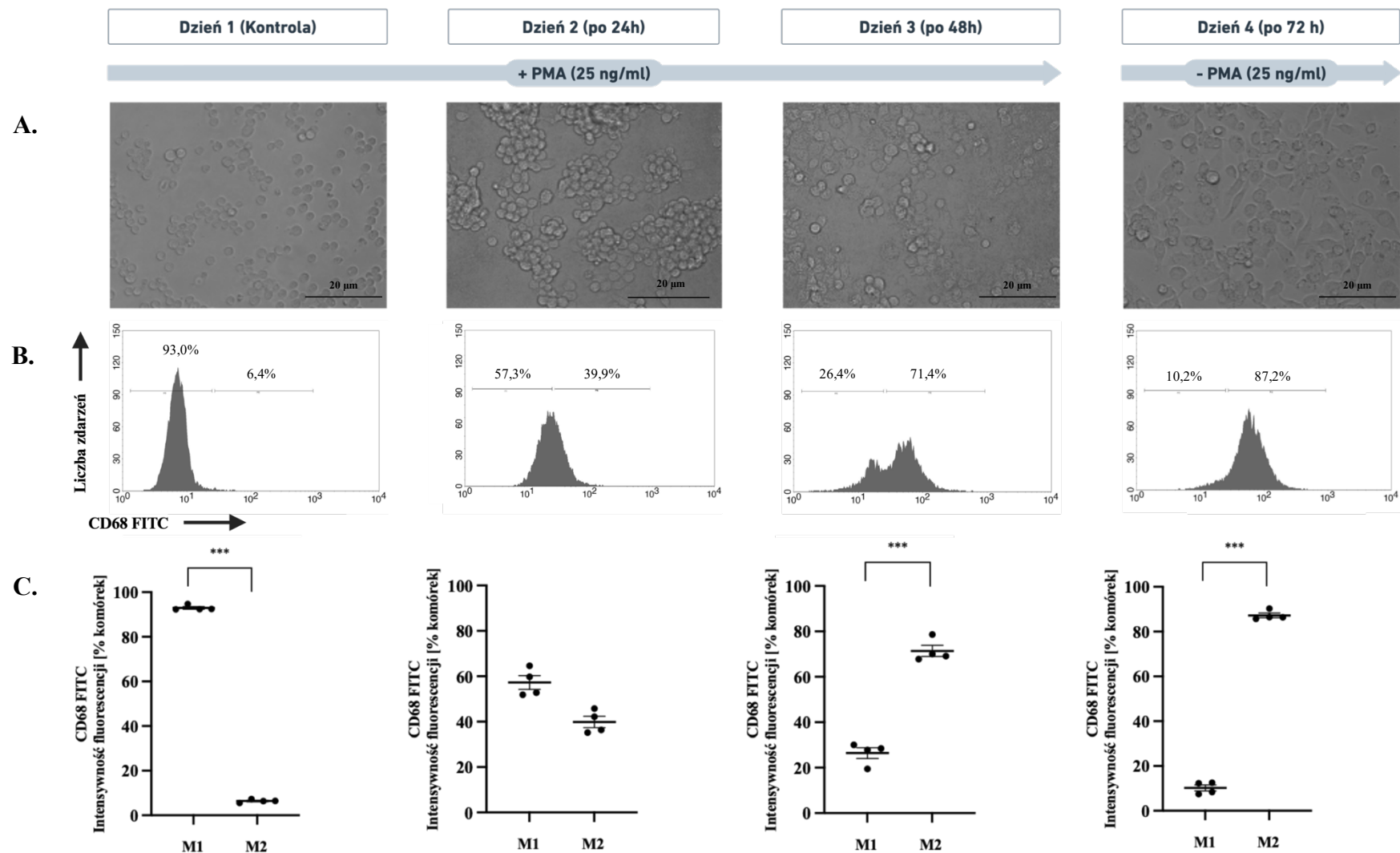
Komórki linii THP-1 w ilości 4×10^5 kom./ml wysiano na płytce 24 dołkowe zgodnie z I schematem różnicowania, opisanym w **rozdziale 3.5**. W każdym dniu różnicowania do komórek dodawano 200 μ l 0,25% roztworu trypsyny na każdy dołek płytki hodowlanej, w celu odklejenia komórek od podłoża. Płytkę inkubowano przez 5-7 minut w standardowych warunkach hodowli, kontrolując stopień odklejenia komórek. Komórki zebrano do probówek typu Eppendorf, neutralizując roztwór trypsyny dwukrotną ilością pełnego medium hodowlanego. Probówki wirowano (1500 rpm, 10 minut). Pelet komórkowy zawieszono w 100 μ l roztworu DPBS, z dodatkiem 10 μ l roztworu przeciwciała CD68 FITC. Komórki inkubowano na lodzie przez 20 minut, bez dostępu światła. Zawiesinę komórek przeniesiono do probówek cytometrycznych i uzupełniono roztworem DPBS do objętości 400 μ l. Pomiaru stopnia ekspresji receptora dokonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, dla reprezentatywnej próby 10 000 komórek w każdej próbie badanej, wyznaczając na histogramie za pomocą markerów (M1 i M2) populację komórek wykazujących ekspresję białka powierzchniowego CD68.

Komórki monocytarnej linii THP-1 w dniu wysiania na płytkę hodowlaną (Dzień I – próba kontrola) wykazywały niewielką ekspresję receptora CD68, co było podstawą do

potwierdzenia znamiennej różnicy stopnia ekspresji receptora w badanych zakresach bramkowania (M1 i M2) (**p < 0,001). Po 24-godzinnej inkubacji z odczynnikiem różnicującym (PMA) średnie, procentowe zawartości komórek w badanych zakresach wynosiły: dla zakresu M1 – 57,3% oraz dla zakresu M2 – 39,9%. Ponadto znaczna większość komórek przyjęła cechy hodowli adherentnej. 48-godzinna inkubacja komórek z czynnikiem różnicującym inicjowała znamiennej różnicę w zakresie ekspresji badanego receptora 26,4% vs. 71,4%, wraz z widocznymi zmianami w ich wyglądzie morfologicznym, co zaprezentowano na poniższej rycinie (**rycina 13**). Hodowla w medium hodowlanym, niezawierającym czynnika różnicującego, przez kolejne 24 godziny, zainicjowała kolejne zmiany w stopniu ekspresji receptora CD68, wpływając na stopień ekspresji w badanych zakresach, wynoszący M1: 10,2% oraz M2: 87,2%.

Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na jednoznaczne potwierdzenie zmian stopnia ekspresji markera CD68, zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi, potwierdzając, że zastosowanie 24-godzinnej inkubacji w medium hodowlanym bez dodatku PMA, poprzedzone 48-godzinną inkubacją z czynnikiem różnicującym jest wystarczające do przeprowadzenia procesu konwersji monocytów w komórki makrofagów.

Różnice zaobserwowane w morfologii komórek, a także cytogramy odpowiadające badanym poziomom ekspresji receptora CD68 właściwego dla komórek makrofagów, otrzymanych w poszczególnych dniach procesu różnicowania przedstawiono na poniższej rycinie (**rycina 13**).



Rycina 13: Wizualizacja zmian wynikających z procesu różnicowania komórek monocytów do komórek makrofagów, pod wpływem czynnika różnicującego PMA. **A.** Mikroskopowa prezentacja wyglądu morfologicznego komórek. Skala na zdjęciu odpowiada 20 μm. **B.** Analiza cytometryczna ekspresji markera różnicowania monocytów w niespolaryzowane makrofagi, CD68; wykresy uwzględniają zastosowane bramkowanie M1 oraz M2. Obrazy przedstawiają reprezentatywne histogramy. **C.** Intensywność fluorescencji markera CD68 przedstawiono jako średnią ± SEM (istotność statystyczną różnicy intensywności fluorescencji pomiędzy grupami oszacowano niesparowanym testem t-Studenta; ***p < 0,001).

3.6.2. Ocena stopnia wydzielania dehydrogenazy mleczanowej

Cytotoksyczność badanych wyciągów/związków wobec komórek monocytów/makrofagów PBMC, izolowanych z krwi obwodowej oceniono testem kolorymetrycznym na obecność wydzielonej dehydrogenazy mleczanowej (ang. *lactate dehydrogenase*, LDH). Dehydrogenaza mleczanowa jest stabilnym enzymem cytoplazmatycznym uwalnianym do medium hodowlanego w odpowiedzi na postępujące uszkodzenie błony komórkowej. Zawartość uwolnionego enzymu można określić ilościowo w badanej próbie za pomocą sprzężonej reakcji enzymatycznej w której LDH katalizuje konwersję mleczanu do pirogronianu poprzez redukcję NAD^+ do NADH. W drugim etapie diaforaza wykorzystuje powstały NADH do redukcji soli tetrazoliowej do formazanu, którego poziom jest wprost proporcjonalny do ilości LDH uwolnionej do medium hodowlanego. Towarzyszy temu powstanie czerwonego zabarwienia roztworu, którego natężenie barwy oznacza się spektrofotometrycznie.

Przygotowanie odczynników

- Mieszaninę reakcyjną przygotowano tuż przed dodaniem na płytkę 96-dołkową, poprzez zmieszanie 250 μl roztworu katalizatora i 11,25 ml roztworu barwnika.

Komórki monocytów/makrofagów PMBC wyizolowane z krwi obwodowej, wysiano na płytki 12-dołkowe (jak opisano w **rozdziale 3.5**) i inkubowano z roztworami badanych związków. Po 24-godzinnej inkubacji supernatanty komórkowe zebrano i odwirowano (1500 rpm, 4°C, 6 minut), a następnie przeniesiono na płytkę 96-dołkową, w 2 powtórzeniach dla każdej próby badanej. Mieszaninę reakcyjną złożoną z katalizatora (diaforaza/ NAD^+) i roztworu barwnika (chlorek tetrazoliowy; mleczan sodu) dodawano w ilości po 100 μl do każdego dołka (z wyjątkiem *background control*) i inkubowano w ciemności przez 30 minut. Po upływie czasu inkubacji, reakcję zastopowano, dodając 50 μl roztworu odczynnika *Stop solution*, zawierającego 0,16M roztwór kwasu siarkowego. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali $\lambda = 490 \text{ nm}$. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki inkubowane z 2% roztworem Tritonu X-100 w DPBS. Pomiaru dokonano także dla próby komórek inkubowanych z roztworem LPS o końcowym stężeniu 100 ng/ml. Procentową zawartość wydzielonej dehydrogenazy mleczanowej wyliczono ze wzoru:

Cytotoksyczność (%) = $(\text{Experimental value} - \text{Low control}) / (\text{High control} - \text{Low control}) \times 100\%$

Background control – absorbancja tła – absorbancja pełnego medium hodowlanego

Experimental value – absorbancja próby badanej zawierającej wyciąg roślinny/związek -
background control

Low control – absorbancja próby bez dodatku badanego wyciągu roślinnego/związku

High control – absorbancja próby z 2% roztworem Tritonu-X100

3.6.3. Ocena ilości komórek barwionych jodkiem propidyny (PI)

Komórki linii THP-1 wysiewano na płytki 24-dołkowe w ilości 4×10^5 kom./ml, w celu różnicowania do komórek makrofagów, zgodnie ze schematem I, opisanym w **rozdziale 3.5**. Po upływie czasu inkubacji komórki odklejono od płytki hodowlanej, zebrano i odwirowano (1500 rpm, 4°C, 6 minut), zawieszając pelet komórkowy w 50 µl DPBS z dodatkiem 5 µl roztworu jodku propidyny (50 µg/ml), pozostawiono na 15 min w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Zawiesinę komórek przeniesiono do probówek cytometrycznych, uzupełniono roztworem DPBS do łącznej objętości 400 µl. Pomiaru intensywności fluorescencji dokonano przy użyciu cytometrii przepływowej, co pozwoliło na wyodrębnienie odsetka komórek żywych oraz komórek martwych/nekrotycznych z wybarwionym jądrem komórkowym. Warunki analizy (wyjściowe stężenie roztworu jodku propidyny względem ilości komórek) ustalono doświadczalnie, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Kontrolę pozytywną (100% komórek nekrotycznych) stanowiły komórki inkubowane z 0,1% roztworem Tritonu X-100 w DPBS. Pomiaru dokonano także dla próby komórek inkubowanych z roztworem LPS w zakresie stężeń stosowanych w ramach realizacji poszczególnych etapów niniejszej pracy (10 - 1000 ng/ml). Pomiaru dokonano dla reprezentatywnej próby 10 000 komórek w każdej próbie badanej.

3.6.4. Ocena aktywności metabolicznej komórek w teście MTT

Podstawą testu MTT jest aktywność enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej inicjująca przekształcanie rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) o zabarwieniu żółtym do formy zredukowanej, występującej w postaci nierozpuszczalnych, fioletowych kryształów formazanu. Po rozpuszczeniu kryształów w DMSO lub izopropanolu powstaje barwny produkt, którego intensywność zabarwienia mierzona spektrofotometrycznie jest proporcjonalna do aktywności

oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. W komórkach uszkodzonych, nekrotycznych lub upośledzonych metabolicznie zawartość powstałego formazanu jest wyraźnie mniejsza w odniesieniu do grupy kontrolnej [189].

Przygotowanie odczynników

- Mieszaninę reakcyjną przygotowano przez rozpuszczenie 12 mg bromku tetrazoliowego w 24 ml roztworu RPMI 1640 bez dodatku czerwieni fenolowej uzyskując końcowe stężenie roztworu 0,5 mg/ml. Dodatek roztworu do komórek poprzedzono ogrzaniem mieszaniny do temp. 37°C, bez bezpośredniego dostępu światła.

Komórki linii THP-1 wysiewano na płytki 24-dołkowe w ilości 4×10^5 kom./ml, w celu różnicowania do komórek makrofagów, zgodnie ze schematem I, opisanym w **rozdziale 3.5**. Supernatanty komórkowe odrzucono, a warstwę komórek przepłukano ciepłym roztworem DPBS. Do komórek dodano roztwór MTT w RPMI 1640 (500 μ l/dołek), uzyskując końcowe stężenie roztworu 0,5 mg/ml. Komórki inkubowano w standardowych warunkach hodowli przez 30 minut. Po upływie wyznaczonego czasu inkubacji do każdego dołka hodowlanego dodano DMSO w ilości 400 μ l. W celu dokładnego rozpuszczenia kryształów formazanu płytkę umieszczono na 15 minut na wytrząsarce orbitalnej. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 570 nm i 630 nm, przyjmując różnicę między otrzymanymi wartościami jako podstawę do dalszych obliczeń. Kontrolę pozytywną (100% komórek nekrotycznych) stanowiły komórki inkubowane z 0,1% roztworem Tritonu X-100 w DPBS. Pomiaru dokonano także dla próby komórek inkubowanych z roztworem LPS w zakresie stężeń stosowanych w ramach realizacji poszczególnych etapów niniejszej pracy (10 - 1000 ng/ml). Wyniki przedstawiono w formie wartości procentowych przyjmując średnią absorbancji kontroli niestymulowanej jako wartość odniesienia.

3.6.5. Ocena stopnia wydzielanie mediatorów zapalnych metodą ELISA

Ocenę wpływu badanych wyciągów/związków na modulację wydzielania mediatorów zapalnych przez komórki monocytów/makrofagów PMBC, izolowanych z ludzkiej krwi obwodowej oraz komórki makrofagów TDM (różnicowanych z monocytarnej linii THP-1), określono przy użyciu gotowych zestawów immunoenzymatycznych typu ELISA (ang.

Enzyme-linked immunosorbent assay). Metoda opiera się na tworzeniu połączeń pomiędzy antygenem i przeciwciałem, których ilość jest wprost proporcjonalna do natężenia barwy powstałej dzięki połączeniu skoniugowanego z immunoglobulinami enzymu (peroksydazy chrzanowej, HRP) i odpowiednich substratów (tetrametylobenzydyny, TMB), mierzonej spektrofotometrycznie.

Przygotowanie materiału do badań

I. Komórki monocytów/makrofagów PMBC wyizolowane z krwi obwodowej, wysiano na płytki 12-dołkowe (jak opisano w **rozdziale 3.5**) i inkubowano przez 1 godzinę z roztworem LPS w DPBS, o końcowym stężeniu 100 ng/ml. Po upływie czasu inkubacji do komórek dodano badane wyciągi/związki, pozostawiając na okres 24-godzinnej inkubacji w standardowych warunkach hodowli. Po upływie wyznaczonego czasu supernatanty zebrano, odwirowano (1500 rpm, 4°C, 10 minut) i zabezpieczono do dalszych oznaczeń.

II. Komórki linii THP-1 wysiewano na płytki 24-dołkowe w ilości 4×10^5 kom./ml, w celu różnicowania do komórek makrofagów, zgodnie ze schematem I, opisanym w **rozdziale 3.5**. Komórki stymulowano roztworem LPS w DPBS o końcowym stężeniu 10 ng/ml, co zostało poprzedzone 1-godzinną inkubacją komórek z badanymi związkami. Po upływie 24-godzinnego czasu inkubacji supernatanty komórkowe zebrano, odwirowano (1500 rpm, 4°C, 10 minut) i zabezpieczono do dalszych oznaczeń.

Testy ELISA dla wybranych cytokin i chemokin zapalnych wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta, wykorzystując gotowe odczynniki, zakupione komercyjnie. Absorbancję mierzono przy długościach fali 450 nm oraz 540 nm, przy użyciu czytnika mikropłytek.

Ilości wydzielonych cytokin oraz chemokin obliczano względem krzywych wzorcowych, a następnie przeliczono masę na wartości procentowe zgodnie z poniższym wzorem:

$$\text{Sekrecja (\%)} = (C/C_{\text{LPS}}) \times 100$$

C - ilość wydzielonego czynnika przez komórki inkubowane z wyciągiem lub związkiem badanym

C_{LPS} – ilość wydzielonego czynnika przez komórki inkubowane z roztworem LPS

3.6.6. Ocena stopnia ekspresji IL-10R, metodą cytometrii przepływowej

Stopień ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC oceniono poprzez pomiar zmian intensywności fluorescencji komórek znakowanych przeciwciałem monoklonalnym przeciwko IL-10 sprzężonym z fluorochromem fikoerytryną (PE), z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Komórki monocytów/makrofagów PBMC wyizolowane z krwi obwodowej (jak opisano w **rozdziale 3.5**) inkubowano przez 1 godzinę z 10 µl roztworu LPS, o końcowym stężeniu 100 ng/ml. Po upływie czasu inkubacji do komórek dodano badane wyciągi/związki, pozostawiając na okres 24-godzinnej inkubacji w standardowych warunkach hodowli. Po upływie wyznaczonego czasu inkubacji supernatanty komórkowe zebrano, odwirowano (1500 rpm, 4°C, 10 minut) i zabezpieczono do dalszych oznaczeń. Komórki przemyto ciepłym roztworem DPBS, a następnie do każdego dołka płytki 12-dołkowej dodano po 500 µl roztworu nieenzymatycznego płynu do oddzielania od podłoża komórek adherentnych. Całość inkubowano przez 20 minut w standardowych warunkach hodowli, kontrolując stopień odklejenia komórek od dna płytki hodowlanej za pomocą obserwacji mikroskopowej. Po upływie wyznaczonego czasu inkubacji zawiesinę komórek przeniesiono do probówek typu Eppendorf, odwirowano (1500 rpm, 4°C, 10 minut). Pelet komórkowy inkubowano na lodzie (20 minut) z 10 µl przeciwciała PE Rat Anti-Human IL-10 w 100 µl roztworu DPBS. W celu wykonania oznaczeń roztwór komórek przeniesiono do probówek cytometrycznych i zawieszono w 1 ml roztworu DPBS. Analizę pomiaru zmian intensywności fluorescencji dla barwy pomarańczowej przeprowadzono w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS. Pomiaru dokonano dla reprezentatywnej próby 10 000 komórek w każdej próbie badanej, wyznaczając na histogramie za pomocą markera (M1) populację komórek wykazujących ekspresję receptora dla IL-10.

3.6.7. Ocena translokacji jądrowej NF-κB p65 metodą cytometrii przepływowej

Komórki monocytarnej linii THP-1 wysiano na płytki 24-dołkowe w ilości 1×10^5 kom./ml i różnicowano zgodnie ze schematem I opisanym w **rozdziale 3.5**. Makrofagi inkubowano przez 1 godzinę z badanymi związkami. Po upływie czasu inkubacji komórki stymulowano dodatkiem 10 µl bakteryjnego LPS uzyskując końcowe stężenie 1 µg/ml, w celu indukcji odpowiedzi zapalnej. Po upływie czasu inkubacji (1 godzina) w standardowych warunkach hodowli komórki odklejono od powierzchni płytki hodowlanej i zebrano do probówek typu Eppendorf. Zawiesinę komórek odwirowano (1200 rpm, 10 minut, 4°C). Pelet

komórkowy zawieszono w 250 μ l roztworu *Fixation/Permeabilization Solution*, bardzo delikatnie zworteksowano, aby zapobiec agregacji komórek i pozostawiono na lodzie przez 20 minut w celu utrwalenia. Następnie komórki odwirowano, pelet zawieszono w 100 μ l komercyjnego roztworu *Permeabilization/Wash buffer* z dodatkiem 20 μ l przeciwciała PE anti-NF- κ B p65. Komórki inkubowano w temperaturze 4°C przez 15 minut, bez dostępu światła. Po upływie czasu inkubacji komórki dwukrotnie przemyto roztworem *Permeabilization/Wash buffer* w celu odplukania pozostałości przeciwciała, każdorazowo odwirowując (1500 rpm, 5 minut, 4°C). Pelet komórkowy zawieszono w 400 μ l roztworu *Staining buffer*, a następnie przystąpiono do analizy cytometrycznej. Pomiaru dokonano dla reprezentatywnej próby 10 000 komórek w każdej próbie badanej, wyznaczając na histogramie za pomocą markera (M1) populację komórek wykazujących ekspresję białka NF- κ B p65.

3.6.8. Immunochemiczna detekcja białek metodą western blot

Przygotowanie odczynników

- Bufor lizujący:
10 ml roztworu 10 \times RIPA
90 ml wody dejonizowanej
30 μ l inhibitorów proteaz
120 μ l inhibitorów fosfataz
Całość dokładnie wymieszano. Przygotowano tuż przed użyciem.
- Bufor do elektroforezy (10 \times):
60,5 g Tris base
292 g glicyny
20 g SDS
Rozpuszczono w 1 800 ml. wody dejonizowanej. Roztwór doprowadzono do pH równego 8,3. Uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 2 000 ml. W celu przeprowadzenia procesu elektroforezy, bufor należy rozcieńczyć wodą dejonizowaną 10-krotnie.
- Bufor do transferu:
6,05 g Tris base
28,82 g glicyny
400 ml 20% roztworu metanolu
Rozpuszczono w 1 800 ml. wody dejonizowanej. Roztwór doprowadzono do pH równego 8,3. Uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 2 000 ml.

- Bufor TBS (10×):
12,1 g Tris base
88 g NaCl
Rozpuszczono w 900 ml wody dejonizowanej. Roztwór doprowadzono do pH równego 8,3. Uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 1 000 ml.

- Bufor TBST:
100 ml roztworu 10× TBS
900 ml wody dejonizowanej
1 ml Tween 20
Całość połączono i dokładnie wymieszano.

- Roztwór blokujący I:
10 ml TBST
0,5 g odtłuszczonego mleka
Całość połączono i dokładnie wymieszano.

- Roztwór blokujący II:
10 ml TBST
0,25 g BSA
Całość połączono i dokładnie wymieszano.

- 5% roztwór BSA do przygotowania roztworu przeciwciała I-rzędowego w TBST:
10 ml TBST
0,5 g BSA
Całość połączono i dokładnie wymieszano.

Immunochemiczną metodą Western blot oznaczano obecność następujących białek w badanych lizatach komórkowych: ABCA1, CD36, HO-1, Nrf2, a także białek ERK 1/2, IKK α/β , JNK 1/2, p38, NF- κ B p65 w formie ufosforylowanej i całkowitej. Stopień rozcieńczeń oraz specyficzność gatunkową użytych przeciwciał określono w poniższej tabeli (**tabela 14**).

Tabela 14: Wykaz przeciwciał użytych do przeprowadzenia oznaczeń z użyciem metody western blot.

Przeciwciało I-rzędowe *	Specyficzność	Rozcieńczenie	Przeciwciało II-rzędowe **	Rozcieńczenie
β-aktyna	Rabbit	1:1000	Goat, anti-rabbit	1:1500
ABCA1	Rabbit	1:1000		
CD36	Rabbit	1:1000	Goat, anti-rabbit	1:1500
Heme Oxygenase 1 (HO-1/HMOX1)	Rabbit	1:1000		
ERK 1/2	Mouse	1:750	Rabbit, anti-mouse	1:1000
Phospho-ERK 1/2	Mouse	1:750		
IKKα/β	Rabbit	1:1000		
Phospho-IKKα/β	Rabbit	1:1000		
JNK 1/2	Rabbit	1:1000		
Phospho-JNK 1/2	Rabbit	1:1000	Goat, anti-rabbit	1:1500
NF-κB p65/RelA	Rabbit	1:1000		
Phospho- NF- κB p65/RelA	Rabbit	1:1000		
Nrf2	Rabbit	1:1000		
p-38	Mouse	1:750	Rabbit, anti-mouse	1:1000
p-p-38	Mouse	1:750		

*Przeciwciała I-rzędowe rozpuszczano w 5% roztworze BSA w TBST.

**Przeciwciała II-rzędowe rozpuszczano w 5% roztworze mleka w TBST.

3.6.9. Przygotowanie materiału komórkowego do oznaczeń immunochemicznych

a) materiał do oceny wpływu związków na ścieżki sygnalizacji MAPK, NF- κ B

Komórki monocytarnej linii THP-1 wysiano na płytce 24-dołkowej, w ilości 4×10^5 kom./ml i różnicowano zgodnie ze schematem I, opisanym w **rozdziale 3.5**. Po upływie określonego czasu inkubacji z czynnikiem różnicującym/medium hodowlanym do komórek dodano roztwory badanych związków. Po upływie 24-godzinnej czasu inkubacji

w standardowych warunkach hodowli do komórek dodano roztwór bakteryjnego LPS, osiągając końcowe stężenie 10 ng/ml. Po upływie 25-minutowego czasu inkubacji komórki poddano działaniu 100 µl roztworu lizującego / dołek zawierającego inhibitory proteaz i fosfataz. Proces lizy komórek prowadzono na lodzie przez okres 20 minut. Zebrane lizaty komórkowe wirowano przez 15 minut, 10 000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant przeniesiono do probówek typu Eppendorf, schłodzonych uprzednio w lodzie. Do pomiaru stężenia białka całkowitego użyto 10 µl uzyskanego lizatu białkowego, pozostałą część połączono z odpowiednią ilością 4× stężonego buforu Laemmli'ego. Otrzymane roztwory zwirowano (1000 rpm, 1 minuta, 4°C) i zachowano do dalszych oznaczeń w temperaturze -80°C.

b) materiał do oceny wpływu związków na ekspresję białka CD36

Komórki monocytarnej linii THP-1 wysiano na płytce 6-dołkowej, w ilości 1×10^6 kom./ml i różnicowano zgodnie ze schematem II, opisanym w **rozdziale 3.5**. Po upływie określonego czasu inkubacji z czynnikiem różnicującym/medium hodowlanym do komórek dodano roztwory badanych związków. Po 24-godzinnym okresie inkubacji supernatanty odrzucono, komórki przepłukano roztworem ciepłego DPBS. Do komórek dodano świeże medium hodowlane wraz z roztworem cholesterolu, osiągając jego końcowe stężenie 20 µg/ml. Po 24 godzinach komórki przepłukano ciepłym roztworem DPBS i poddano działaniu 100 µl roztworu lizującego / dołek zawierającego inhibitory proteaz i fosfataz. Proces lizy komórek prowadzono na lodzie przez okres 20 minut. Zebrane lizaty komórkowe wirowano przez 15 minut, 10 000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant przeniesiono do probówek typu Eppendorf, schłodzonych uprzednio w lodzie. Do pomiaru stężenia białka całkowitego użyto 10 µl uzyskanego lizatu białkowego, pozostałą część połączono z odpowiednią ilością 4× stężonego buforu Laemmli'ego. Otrzymane roztwory zwirowano (1000 rpm, 1 minuta, 4°C) i zachowano do dalszych oznaczeń w temperaturze -80°C.

c) materiał do oceny wpływu związków na ekspresję białek ABCA1, HO-1, Nrf2

Komórki monocytarnej linii THP-1 wysiano na płytce 6-dołkowej, w ilości 1×10^6 kom./ml i różnicowano zgodnie ze schematem II, opisanym w **rozdziale 3.5**. Po upływie określonego czasu inkubacji z czynnikiem różnicującym/medium hodowlanym do komórek dodano roztwór cholesterolu, osiągając końcowe stężenie 20 µg/ml. Po 24-godzinnym okresie inkubacji supernatanty odrzucono, komórki przepłukano roztworem ciepłego DPBS. Do

komórek dodano świeże medium hodowlane wraz z roztworami badanych związków. Po 24-godzinnej inkubacji komórki przepłukano ciepłym roztworem DPBS i poddano działaniu 100 µl roztworu lizującego / dołek zawierającego inhibitory proteaz i fosfataz. Proces lizy komórek prowadzono na lodzie przez okres 20 minut. Zebrane lizaty komórkowe wirowano przez 15 minut, 10 000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant przeniesiono do probówek typu Eppendorf, schłodzonych uprzednio w lodzie. Do pomiaru stężenia białka całkowitego użyto 10 µl uzyskanego lizatu białkowego, pozostałą część połączono z odpowiednią ilością 4× stężonego buforu Laemmli'ego. Otrzymane roztwory zwirowano (1000 rpm, 1 minuta, 4°C) i zachowano do dalszych oznaczeń w temperaturze -80°C.

Oznaczenie stężenia białka w lizatach komórkowych

Stężenie białka w uzyskanych lizatach komórkowych oznaczono komercyjnym zestawem do kolorymetrycznego oznaczania całkowitego stężenia białek (ang. *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit*, BCA). Metoda łączy znaną reakcję redukcji jonów miedzi Cu^{2+} do Cu^{+} przez białko w środowisku alkalicznym, z kolorymetrycznym wykrywaniem kationu Cu^{+} przy użyciu odczynnika zawierającego kwas bicynchoniowy. Powstały kompleks jest efektem chelatowania dwóch cząstek BCA z jedną cząstką Cu^{+} , którego zabarwienie jest wprost proporcjonalne do stężenia białka w badanej próbce.

W celu dokonania pomiaru zawartości białka, do 10 µl lizatu białkowego dodano 200 µl mieszaniny reakcyjnej substratu A i B (połączonych w stosunku 50:1). Przed wykonaniem oznaczenia przygotowano 9-punktową krzywą kalibracyjną z BSA; współczynnik rozcieńczenia 2; zakres stężeń 20 – 2000 µg/ml). Przygotowaną próbę inkubowano 30 minut w 37°C bez dostępu światła. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali $\lambda = 562 \text{ nm}$. Stężenie białka obliczono z krzywej kalibracyjnej, na podstawie trzech kolejnych powtórzeń.

Stężenie białka obliczono ze wzoru:

$$[\text{Zawartość białka}] = (x \times R) / V$$

x - stężenie białka w µg/ml

R - rozcieńczenie lizatu białkowego

V - oznacza objętość końcową próby użytej do pomiaru spektrofotometrycznego

Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

Procentowość żelu rozdzielającego była dobrana wg. masy oznaczanego białka (8-12%). Żel rozdzielający był przygotowywany przez zmieszanie odpowiednich ilości: 30% roztworu akrylamidu/bisakrylamidu, wody dejonizowanej, roztworu TEMEDu, roztworu Tris base w wodzie dejonizowanej (1,5 M), 10% roztworu APS-u w wodzie dejonizowanej. Mieszaninę wylewano pomiędzy szklane, 1 mm płytki i pozostawiano do spolimeryzowania na okres 40 minut. Po upływie wyznaczonego czasu przygotowano roztwór żelu zagęszczającego, który wylano na warstwę żelu rozdzielającego. W żelu zagęszczającym umieszczono grzebień, pozostawiono do spolimeryzowania na okres 40 minut.

Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym

Eppendorfy z lizatami białkowymi rozmrożono na lodzie, a następnie zwirowano (1000 rpm, 1 minuta, 4°C). W celu denaturacji białek próbki ogrzewano w 95°C przez 6 minut, co poprzedziło ich ponowne wirowanie (1000 rpm, 1 minuta, 4°C). Na żel nanoszono po 22,5 µg (w objętości 30 µl) białka oraz 5 µl markera masy białka. Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym przeprowadzano w 1× stężonym buforze do elektroforezy, schłodzonym uprzednio do temperatury 4°C (1,5 - 2 godziny, 50-100 V). Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym umożliwia rozdzielenie białek na podstawie ich mas cząsteczkowych oraz wędrówkę w kierunku elektrody dodatniej. Dodatek SDSu do buforu do elektroforezy powoduje denaturację białek oraz nadanie im ładunku ujemnego.

Transfer białek na membranę nitrocelulozową, blokowanie membrany

Białka rozdzielone na żelu poliakrylamidowym przeniesiono na membranę nitrocelulozową o wielkości porów 0,45 µm, z zastosowaniem transferu mokrego (1,5 - 2,5 godziny, 200-250 mA), na mieszadle magnetycznym. W celu oceny jakości i wydajności transferu, białka immobilizowane na błonie nitrocelulozowej barwiono w roztworze czerwieni Ponceau S. Po wybarwieniu błonę płukano buforem TBST i inkubowano w roztworze blokującym (5% mleko w TBST lub 2,5% roztworem BSA w TBST) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał.

Inkubacja membrany z przeciwciałem I i II rzędowym, detekcja białek

Membranę nitrocelulozową przemyto buforem TBST (3 × 10 min). Następnie membranę inkubowano z roztworem przeciwciała I-rzędowego, przygotowanego zgodnie z warunkami podanymi w tabeli 14, przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, lub

pozostawiono na całonocną immunodetekcję w temperaturze 4°C (na kołyszce laboratoryjnej). Po trzykrotnym płukaniu w buforze TBST (3×10 min), membranę inkubowano z roztworem przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z peroksydazą chrzanową (1 godzina, temp. pokojowa). Niezwiązane specyficznymi przeciwciała usuwano poprzez 3-krotnie płukanie membrany w buforze TBST (3×10 min).

Detekcję sygnału prowadzono w aparacie ChemiDoc, z wykorzystaniem zestawu chemiluminescencyjnego Super Signal West Dura, zgodnie z zaleceniami producenta. Wizualizację oraz analizę densytometryczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania ImageLab 5.1. Lista przeciwciał i rozcieńczeń została przedstawiona w **tabeli 14**. Analizę densytometryczną przeprowadzono w oparciu o wartości densytometryczne kontroli ilości nałożonego białka (β -aktyny).

3.6.10. Izolacja mRNA z materiału komórkowego

Izolację całkowitego RNA prowadzono wykorzystując zestaw Total RNA Mini (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), zgodnie z instrukcją producenta. Komórki linii THP-1 wysiano na płytki 6-dołkowe w ilości 1×10^6 kom./ml i różnicowano zgodnie ze schematem I opisanym w **rozdziale 3.5** Makrofagi poddano 6-godzinnej inkubacji z badanymi związkami, poprzedzonej 1-godziną stymulacją roztworem LPS o końcowym stężeniu 10 ng/ml. Po upływie wyznaczonego czasu warstwę komórek przepłukano ciepłym roztworem DPBS. Komórki doprowadzono do całkowitej lizy, z użyciem roztworu fenozolu (800 μ l/dołek).

W celu izolacji całkowitego RNA lizaty inkubowano przez 5 minut w temperaturze 50°C. Do lizatu dodano 200 μ l roztworu chloroformu, dokładnie wymieszano. Mieszaninę inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej, zwirowano (10 minut, 10 000 – 12 000 rpm). Do nowych probówek typu Eppendorf przeniesiono 450 μ l supernatantu, a następnie dodano 250 μ l izopropanolu, dokładnie wymieszano. Roztwór nakładano na minikolumnę zawierającą złożę krzemionkowe, a następnie wirowano (1 minuta, 10 000 - 12 000 rpm). Po usunięciu przesączu na kolumnę dodano 200 μ l roztworu płuczącego A1, wirowano 2 minuty przy 10 000 - 12 000 rpm. Kolumnę przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf, dodając 100 μ l ultraczystej wody, wolnej od RNA-azy. Próbkę inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 minutę (10 000 - 12 000 rpm). Czystość i stężenie całkowitego kwasu nukleinowego (RNA) mierzono za pomocą nanospektrofotometru (Spektrofotometr UV-Vis Q5000, Quawell), dokonując pomiaru absorbancji przy długościach

fali 260 oraz 280 nm. Uzyskane próbki uznano za czyste, ponieważ stosunek absorbancji uzyskanych dla obu długości fali, w każdej próbce wynosił $>1,8$.

3.6.11. Przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji

Reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription PCR*, RT-PCR) jest procesem polegającym na przepisaniu informacji genetycznej z jednoniciowego RNA na komplementarną, dwuniciową cząsteczkę cDNA (wykorzystywaną do ilościowej oceny ekspresji genów) z użyciem enzymu odwrotnej transkryptazy. Proces odwrotnej transkrypcji przeprowadzono, z wykorzystaniem zestawu High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), zgodnie z zaleceniami producenta, używając następujących odczynników dołączonych do zestawu: 10× stężony bufor, 10× stężony roztwór starterów losowych, 25× stężony dNTP Mix (100 mM), odwrotna transkryptaza o stężeniu 50 U/ μ l.

Wyizolowany mRNA (którego izolację opisano w **rozdziale 3.6.10**) rozcieńczono dodatkiem 75 μ l jałowej wody. Następnie, pracując na lodzie przygotowano mieszaninę reakcyjną złożoną z następujących odczynników: woda wolna od RNAz (10 μ l), Reaction Buffer (4 μ l), Primer (1 μ l), dNTP Mix (2 μ l), RevertAid Reverse Transcriptase (1 μ l). Mieszaninę zwirowano i dodano do probówek typu Eppendorf (po 18 μ l), zawierających uprzednio rozcieńczony roztwór mRNA (2 μ l). Po dokładnym wymieszaniu i zwirowaniu próbówki umieszczono w termocyklerze, stosując warunki inkubacji podane w poniższej tabeli (**tabela 15**). Zabezpieczone cDNA przechowywano w temperaturze -25°C do momentu dalszych oznaczeń.

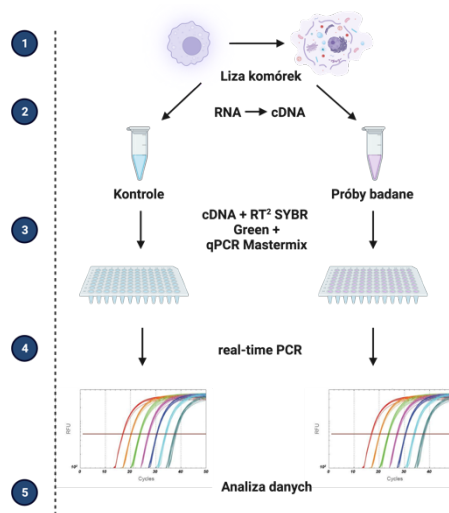
Tabela 15: Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

ETAP PARAMETR	Wstępna inkubacja	Aktywność odwrotnej transkryptazy	Denaturacja	Zakończenie procesu
Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	25	37	85	4
Czas [min]	10	120	5	-

3.6.12. Zastosowanie metody real-time PCR do oznaczenia ekspresji panelu 84 genów z wykorzystaniem mikromacierzy RT2 Profiler PCR Array TLR

W celu oceny wpływu wybranych związków na stopień ekspresji panelu 84 genów związanych z przekaznictwem sygnału za pośrednictwem receptorów TLR wykorzystano narzędzie RT2 Profiler PCR Array TLR, PAHS-018ZA (Qiagen, Hilden, Germany), zawierające płytki 96-dołkowe z naniesionymi sondami molekularnymi (analogicznymi do sond opisywanych w **rozdziale 3.6.13**). Każda z płytek zawiera również sondy dla genów stanowiących kontrole endogenne, niezbędne podczas późniejszej analizy ekspresji.

Przygotowanie materiału do analizy wykonano w sposób analogiczny jak opisano w **rozdziałach 3.6.10 i 3.6.11**. Przygotowany roztwór cDNA (102 μ l) wymieszano z roztworem RT² qPCR Master Mix (1350 μ l) zawierającym fluorescencyjny związek interkalujący do dwuniciowego DNA – SYBR Green oraz wodą wolną od RNAz (1248 μ l), w zgodzie z zaleceniami producenta. Pipetą wielokanałową nałożono po 25 μ l mieszaniny do każdego dołka płytki 96-dołkowej. Płytkę reakcyjną zabezpieczono folią, odwirowano (1 minuta, 2000 rpm). Reakcję łańcuchową polimerazy DNA wraz z analizą w czasie rzeczywistym (real-time PCR) przeprowadzono, używając aparaturę Roche Light Cycler 480. Etapy annealingu oraz elongacji powtarzane były w 40 cyklach, zgodnie z warunkami podanymi w poniższej tabeli (**tabela 16**). Emitowany przez barwnik poziom fluorescencji był proporcjonalny do stężenia mRNA dla poszczególnych genów w badanych próbach.



Rycina 14: Przebieg analizy z użyciem zestawu RT² Profiler PCR Array TLR. Opracowanie własne.

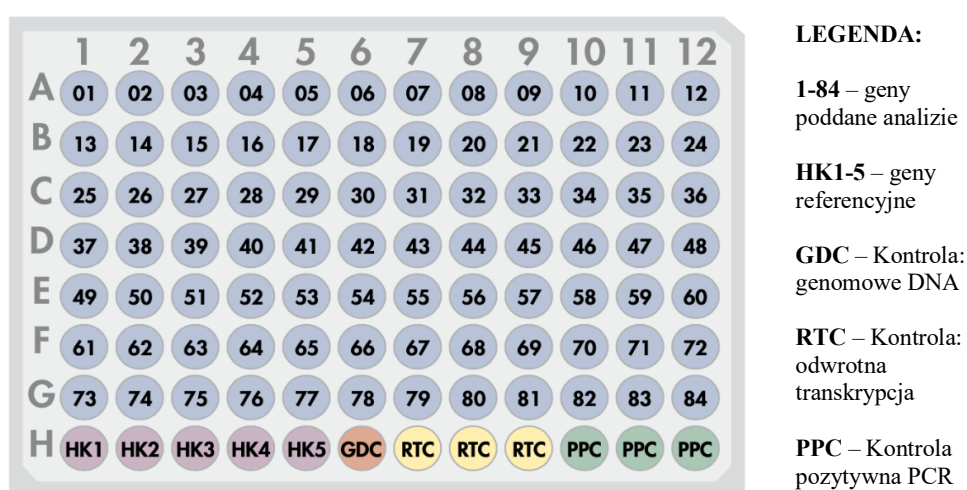
Tabela 16: Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem pojedynczych sond.

ETAP PARAMETR	Aktywacja polimerazy	PCR 40 cykli	
		Denaturacja	Anneling/Elongacja
Temperatura [°C]	95	95	60
Czas [min:sek]	10:00	00:15	1:00

Otrzymane względne poziomy ekspresji genów związanych z sygnalizacją TLR z danej płytki były znormalizowane w stosunku do ekspresji genów referencyjnych – β -aktyny (ACTB), β 2-mikroglobuliny (B2M), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HPRT1) oraz kwaśnego białka rybosomalnego 60S P0 (RPLP0). Poziomy ekspresji obliczono metodą ΔCt ($2^{-\Delta\text{Ct}}$), przy użyciu oprogramowania RT² Profiler PCR Array Data Analysis oraz GraphPad Prism 9.

Otrzymane wyniki zaprezentowano przy pomocy m.in. mapy ciepła oraz wykresów słupkowych prezentujących krotność ekspresji obliczoną dla średnich wartości, uzyskanych dla danego genu w poszczególnych próbach badanych, w odniesieniu do średniej wartości otrzymanej dla próby kontrolnej (kontrola stymulowana LPS), zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [190], [191]. Zgodnie z ogólnie przyjętą nomenklaturą, nazwy genów w toku omówienia otrzymanych wyników będą pisane kursywą np. *BTK*. Nazwy białek będą pisane normalną czcionką np. BTK.

Schematyczny przebieg analizy przedstawiono na rycinie 14 (**rycina 14**). Rozkład genów na płycie zilustrowano na poniższej rycinie (**rycina 15**).



Rycina 15: Schemat rozkładu genów na płycie RT2 Profiler PCR Array TLR.

Listę genów, których ekspresję oceniono z użyciem narzędzia RT² Profiler PCR Array TLR, wraz z informacją na temat białek przez nie kodowanych, podano w poniższej tabeli (**tabela 17**). W kolumnie pierwszej (Nr) uwzględniono pozycję poszczególnych sond na płycie 96-dółkowej.

Tabela 17: Charakterystyka genów analizowanych w ramach RT2 Profiler PCR Array TLR oraz białek przez nie kodowanych.

Nr	Symbol genu	Kodowane białko	
A01	<i>BTK</i>	BTK	Białkowa kinaza tyrozynowa BTK
A02	<i>CASP8</i>	Kaspaza 8	Kaspaza-8
A03	<i>CCL2</i>	MCP-1	Białko chemotaktyczne monocytów MCP-1
A04	<i>CD14</i>	CD14	Antygen różnicowania monocytów CD14
A05	<i>CD180</i>	CD180	Antygen CD180
A06	<i>CD80</i>	CD80	Antygen aktywacji limfocytów T CD80
A07	<i>CD86</i>	CD86	Antygen aktywacji limfocytów T CD86
A08	<i>CHUK</i>	IKK- α	Inhibitor podjednostki α kinazy jądrowego czynnika κ -B (IKK α)
A09	<i>CLEC4E</i>	CLEC4E	Receptor lektynowy zależny od Ca ²⁺ indukowany makrofagami
A10	<i>CSF2</i>	GM-CSF	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
A11	<i>CSF3</i>	G-CSF	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
A12	<i>CXCL10</i>	CXCL10/ IP-10	Białko 10 indukowane interferonem gamma
B01	<i>ECSIT</i>	ECSIT	Pośrednik sygnałowy w szlaku Toll podobnym
B02	<i>EIF2AK2</i>	EIF2AK2	Kinaza białkowa aktywowana RNA
B03	<i>ELK1</i>	Elk-1	Czynnik transkrypcyjny ETS
B04	<i>FADD</i>	FADD	Białko domeny śmierci związanej z FAS
B05	<i>FOS</i>	c-Fos	Protoonkogen c-Fos (podjednostka czynnika transkrypcyjnego AP-1)
B06	<i>HMGB1</i>	HMG-1	Białko grupy 1 o wysokiej mobilności
B07	<i>HRAS</i>	H-Ras	GTPaza H-Ras
B08	<i>HSPA1A</i>	Hsp72	Członek rodziny białek szoku cieplnego A, członek 1A (Hsp70)
B09	<i>HSPD1</i>	Hsp60	Członek rodziny białek szoku cieplnego D, członek 1 (Hsp60)
B10	<i>IFNA1</i>	IFN- α	Interferon alfa-1
B11	<i>IFNB1</i>	IFN- β	Interferon beta-1
B12	<i>IFNG</i>	IFN- γ	Interferon gamma
C01	<i>IKKKB</i>	IKK-B	Inhibitor czynnika jądrowego podjednostka kinazy kappa-B
C02	<i>IL10</i>	IL-10	Interleukina 10
C03	<i>IL12A</i>	IL-12	Podjednostka alfa interleukiny 12
C04	<i>IL1A</i>	IL-1 α	Interleukina 1 alfa
C05	<i>IL1B</i>	IL-1 β	Interleukina 1 beta
C06	<i>IL2</i>	IL-2	Interleukina 2
C07	<i>IL6</i>	IL-6	Interleukina 6
C08	<i>IL8</i>	IL-8	Interleukina 8 (CXCL8)
C09	<i>IRAK1</i>	IRAK-1	Kinaza 1 związana z receptorem interleukiny 1
C10	<i>IRAK2</i>	IRAK-2	Kinaza podobna do kinazy 2 związanej z receptorem interleukiny 1
C11	<i>IRAK4</i>	IRAK-4	Kinaza 4 związana z receptorem interleukiny 1
C12	<i>IRF1</i>	IRF-1	Czynnik regulatorowy interferonu 1
D01	<i>IRF3</i>	IRF-3	Czynnik regulatorowy interferonu 3
D02	<i>JUN</i>	c-Jun	Czynnik transkrypcyjny Jun (podjednostka czynnika transkrypcyjnego AP-1)
D03	<i>LTA</i>	LT- α	Limfotoksyna-alfa, czynnik martwicy nowotworów beta TNF- β
D04	<i>LY86</i>	MD-1	Antygen limfocytów 86
D05	<i>LY96</i>	MD-2	Antygen limfocytów 96
D06	<i>MAP2K3</i>	MAP2K3	Kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem 3 o podwójnej specyficzności
D07	<i>MAP2K4</i>	MAP2K4	Kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem 4 o podwójnej specyficzności
D08	<i>MAP3K1</i>	MAP3K1	Kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem 1
D09	<i>MAP3K7</i>	MAP3K7	Kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem 7

Nr	Symbol genu	Kodowane białko	
D10	<i>MAP4K4</i>	MAP4K4	Kinaza kinazy kinazy aktywowanej mitogenem 4
D11	<i>MAPK8</i>	MAPK8	Aktywowana mitogenem kinaza białkowa 8
D12	<i>MAPK8IP3</i>	MAPK8IP3	Aktywowana mitogenem kinaza białkowa 8 oddziałująca z białkiem 3
E01	<i>MYD88</i>	MyD88	Wrodzony adapter transdukcji sygnału immunologicznego MyD88
E02	<i>NFKB1</i>	NF- κ B (p105/p50)	Czynnik jądrowy NF- κ B podjednostka p105
E03	<i>NFKB2</i>	NF- κ B (p100/p52)	Czynnik jądrowy NF- κ B podjednostka p100
E04	<i>NFKBIA</i>	I κ B α	Inhibitor NF- κ B α (I κ B α)
E05	<i>NFKBIL1</i>	-	Białko podobne do inhibitora NF- κ -B 1
E06	<i>NFRKB</i>	-	Czynnik jądrowy związany z białkiem wiążącym κ -B
E07	<i>NR2C2</i>	NR2C2	Podrodzina receptorów jądrowych 2, grupa C, członek 2
E08	<i>PEL1</i>	-	Homolog 1 białka pellino
E09	<i>PPARA</i>	PPAR- α / NR1C1	Receptor α aktywowany przez proliferatory peroksyosomów
E10	<i>PRKRA</i>	PACT	Indukowany interferonem dwuniciowy aktywator kinazy białkowej zależnej od RNA
E11	<i>PTGS2</i>	COX-2	Cyklooksigenaza 2
E12	<i>REL</i>	c-Rel	Protoonkogen c-Rel, podjednostki NF- κ -B
F01	<i>RELA</i>	Czynnik p65	Czynnik jądrowy NF-kappa-B, podjednostka p65
F02	<i>RIPK2</i>	-	Kinaza białkowa seryny/reoniny oddziałująca z receptorem (RIP)
F03	<i>SARM1</i>	SARM1	Białko adaptorowe receptora Toll-podobnego
F04	<i>SIGIRR</i>	SIGIRR	Pojedyncza immunoglobulina i domena receptora Toll-interleukiny 1
F05	<i>TAB1</i>	-	Białko wiążące kinazę TAK1
F06	<i>TBK1</i>	TBK1	Białkowa kinaza serynowo/reoninowa TBK1
F07	<i>TICAM1</i>	TICAM1	Cząstka adaptorowa zawierająca domenę TIR 1
F08	<i>TICAM2</i>	TICAM2	Cząstka adaptorowa zawierająca domenę TIR 2
F09	<i>TIRAP</i>	TIRAP	Białko adaptorowe zawierające domenę TIR
F10	<i>TLR1</i>	TLR1	Receptor Toll-podobny 1
F11	<i>TLR10</i>	TLR10	Receptor Toll-podobny 10
F12	<i>TLR2</i>	TLR2	Receptor Toll-podobny 2
G01	<i>TLR3</i>	TLR3	Receptor Toll-podobny 3
G02	<i>TLR4</i>	TLR4	Receptor Toll-podobny 4
G03	<i>TLR5</i>	TLR5	Receptor Toll-podobny 5
G04	<i>TLR6</i>	TLR6	Receptor Toll-podobny 6
G05	<i>TLR7</i>	TLR7	Receptor Toll-podobny 7
G06	<i>TLR8</i>	TLR8	Receptor Toll-podobny 8
G07	<i>TLR9</i>	TLR9	Receptor Toll-podobny 9
G08	<i>TNFA</i>	TNF- α	Czynnik martwicy nowotworu α
G09	<i>TNFRSF1A</i>	TNFR1	Receptor czynnika martwicy nowotworu α
G10	<i>TOLLIP</i>	TOLLIP	Białko adaptorowe receptorów Toll-podobnych
G11	<i>TRAF6</i>	TRAF6	Czynnik 6 związany z receptorem TNF- α
G12	<i>UBE2N</i>	UBE2N	Enzym sprzęgający ubikwitynę E2 N
H01	<i>ACTB</i>	-	β -aktyna
H02	<i>B2M</i>	B2M	β_2 -mikroglobulina
H03	<i>GAPDH</i>	GAPDH	Dehydrogenaza 3-fosforanowa aldehydu glicerynowego
H04	<i>HPRT1</i>	HGPRT	Fosforybozyltransferaza hipoksantynowo-guaninowa
H05	<i>RPLP0</i>	RPLP0	Kwaśne białko rybosomalne 60S P0

3.6.13. Zastosowanie metody real-time PCR do oznaczenia ekspresji TNF- α , IL-6, MCP-1 z użyciem pojedynczych sond

W poprzednich doniesieniach zidentyfikowano zbliżone wzorce ekspresji genów pomiędzy mikromacierzą (RT2 Profiler PCR Array), a analizą PCR w czasie rzeczywistym z użyciem pojedynczych sond po zastosowaniu określonych czynników stymulujących [191]. Ze względu na większą czułość stwierdzoną w przypadku użycia pojedynczych sond, obserwuje się większą zmianę w ekspresji genów przez nie ocenianych, w stosunku do wyników uzyskanych przy użyciu mikromacierzy [192]. W związku z powyższym dokonano potwierdzenia wyników dla kluczowych czynników badanych ścieżek uzyskanych z mikromacierzy RT2 Profiler PCR Array z wynikami, ocenianymi przy użyciu sond TaqMan.

Reakcję łańcuchową polimerazy DNA wraz z analizą w czasie rzeczywistym (real-time PCR) przeprowadzono z wykorzystaniem aparatury ViiA™7 Real-Time PCR System firmy Applied Biosystems, z użyciem odczynników z zestawu TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems), a także pojedynczych sond: dla IL-6, znakowanej VIC (4,7,2'-trichloro-7'-fenylo-6- karboksylfluoresceina) (Hs00985639), TNF- α , znakowanego VIC (Hs01113624, MCP-1, znakowanego FAM (6-karboksylfluoresceina) (Hs00234140), a także sondy TaqMan dla genu wzorcowego – GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) znakowanej FAM (Hs03929097). Mieszanki reakcyjne sporządzono przez zmieszanie TaqMan Universal Master Mix II, odpowiedniej sondy oraz wody wolnej od RNA-az. Do każdego dołka płytki 96-dołkowej dodano w kilku powtórzeniach 10 μ l mieszaniny oraz 3 μ l odpowiedniego cDNA otrzymanego w wyniku przeprowadzenia procesu reakcji odwrotnej transkrypcji, opisanego w **rozdziale 3.6.11**. Płytkę reakcyjną zabezpieczono folią, odwirowano (10 minut, 2000 rpm). Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z warunkami reakcji podanymi w poniższej tabeli (**tabela 18**) na takiej samej ilości wejściowego RNA dla każdej próby. Otrzymane poziomy ekspresji dla IL-6, TNF- α , MCP-1 były znormalizowane w stosunku do ekspresji genu referencyjnego GAPDH, ponieważ na podstawie wcześniejszych doniesień gen ten ulegał stabilnej ekspresji w makrofagach TDM, zarówno w komórkach stymulowanych, jak również niepoddanych stymulacji [193]. Poziomy ekspresji obliczono metodą Δ Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). FAM i VIC – znaczniki fluorescencyjne.

Tabela 18: Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem pojedynczych sond.

ETAP PARAMETR	Aktywacja polimerazy	PCR 40 cykli	
		Denaturacja	Anneling/Elongacja
Temperatura [°C]	95	95	60
Czas [min:sek]	10:00	00:15	1:00

3.6.14. Ocena stopnia akumulacji cholesterolu metodą barwienia Oil Red O

Przygotowanie odczynników

- **Roztwór wyjściowy Oil Red O:** 0,5 g sproszkowanego barwnika Oil Red O rozpuszczono w 80 ml izopropanolu. Roztwór ogrzewano w łaźni wodnej (56°C) i pozostawiono na noc, chroniąc od światła. Następnie roztwór uzupełniono do objętości 100 ml izopropanolem i pozostawiono do dokładnego rozpuszczenia kryształów na łaźni ultradźwiękowej przez 15 minut, przechowywano w lodówce, w ciemnym naczyniu, chroniąc od światła. Tuż przed wykonywaniem barwienia roztwór ogrzano do temperatury 60°C. Potrzebną ilość roztworu barwnika przefiltrowano przez bibułę filtracyjną i rozcieńczono roztworem wody dejonizowanej w stosunku 6:4. Roztwór pozostawiono na 10 minut w temp. pokojowej, przefiltrowano przez filtr strzykawkowy o wielkości porów 0,45 µm. Przygotowany roztwór roboczy należało użyć w ciągu 2 godzin od momentu przygotowania.
- **60% roztwór izopropanolu:** 60 ml izopropanolu zmieszano z 40 ml wody dejonizowanej.
- **10% roztwór formaldehydu:** 27 g 36-38% roztworu formaldehydu zmieszano z 73 g wody dejonizowanej.

Komórki monocytarnej linii THP-1 wysiewano na płytki hodowlane 12-dołkowe w ilości 6×10^5 kom./ml i różnicowano zgodnie ze schematem różnicowania nr II, opisanym w **rozdziale 3.5**. Komórki makrofagów inkubowano z badanymi związkami przez 24 godziny. Po upływie czasu inkubacji do komórek dodano 10 µl roztworu cholesterolu o końcowym stężeniu 20 µg/ml. Po 24-godzinnym okresie inkubacji supernatanty komórkowe odrzucono. Komórki przemyto dwukrotnie roztworem ciepłego DPBS, a następnie utrwalano roztworem 10% formaldehydu w ilości 1 ml roztworu na dołek i pozostawiono na okres 30 minut w temperaturze pokojowej. W celu ułatwienia wybarwienia lipidów wewnątrz komórek, komórki przemyto roztworem DPBS (1 minuta) oraz roztworem 60% izopropanolu (15 sekund). Do każdego dołka dodano świeżo przygotowany roztwór barwnika Oil Red O i inkubowano przez 30 minut bez dostępu światła, w temperaturze 37°C. Po upływie czasu inkubacji dołki ponownie przepłukano roztworem 60% izopropanolu oraz DPBS w celu usunięcia resztek barwnika ze ścian płytki hodowlanej, niezwiązanych z komórkami lipidów. Stopień pochłaniania lipidów przez komórki makrofagów oceniono za pomocą mikroskopu odwróconego z systemem fluorescencji, z użyciem oprogramowania Nis-Elements BR 2.30.

3.6.15. Analiza statystyczna oraz oprawa graficzna

Ocenę statystyczną otrzymanych wyników wykonano w programie Statistica v. 13.1.PL, (Statsoft, Polska). Wykresy do poszczególnych analiz sporządzono w programie GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA). Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej ze wszystkich zebranych pomiarów, z odchyleniami w postaci błędu standardowego średniej (SEM).

Analiza statystyczna została przeprowadzona w kilku etapach, rozpoczynając od oceny zgodności wyników z rozkładem normalnym za pomocą testów Shapiro-Wilka, testu Lillieforsa, przyjmując wartości dla rozkładu normalnego $p > 0,05$. Do oceny jednorodności wariancji użyto testu Levene'a. Ocena istotności różnic dla cech ilościowych pomiędzy dwiema grupami spełniającymi założenia testu parametrycznego została przeprowadzona przy użyciu testu t-Studenta. Do porównań wielokrotnych zastosowano analizę wariancji (ANOVA) lub w przypadku niespełnienia założeń dotyczących testów parametrycznych – test Kruskala-Wallisa.

Dla wartości spełniających kryteria normalności rozkładu i jednorodności wariancji wykonano testy post hoc Dunnetta lub w przypadku niespełnienia powyższych założeń, test porównań wielokrotnych – test Dunn. Różnice w porównywanych wynikach uznano za istotne statystycznie przy założeniu, że $p < 0,05$. Na wykresach w poniższej pracy przedstawiono trzy stopnie istotności statystycznej, dla których $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ i $***p < 0,001$. # – znamienność statystyczna kontroli stymulowanej wobec kontroli niestymulowanej.

Wszystkie oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach, dla trzech lub więcej niezależnych eksperymentów. Ryciny, schematy, wykresy zamieszczone w niniejszej pracy wykonano z użyciem oprogramowania BioRender oraz z wykorzystaniem biblioteki Lets-Plot wersja 4.0.0. Wzory chemiczne sporządzono z użyciem oprogramowania ChemeDoodle 12.1.0.

4. Omówienie wyników

4.1. Analiza fitochemiczna wyciągów *F. suspensa*, *F. × intermedia*, *F. europaea*

Pierwszym etapem badań była szczegółowa analiza fitochemiczna wyciągów metanolowo-wodnych (75:25 v/v), przygotowanych z liści 3 gatunków należących do rodzaju *Forsythia*.

Wyciągi przygotowane z liści forsycji zwisłej oraz forsycji pośredniej, zebranych w dwóch różnych porach wegetacji, otrzymano w ramach współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi. Dodatkowo, w ramach współpracy z Ogrodem Botanicznym w Warszawie analizie fitochemicznej poddano liście forsycji europejskiej – jedyne przedstawiciela rodzaju *Forsythia*, endemicznie występującego na terenie Europy.

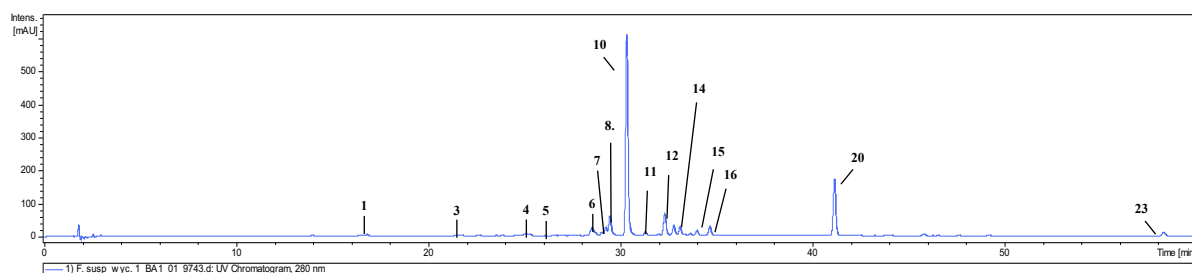
W **tabeli 19** przedstawiono krótką charakterystykę składu wyciągów, uwzględniając okres zbioru surowca oraz główne związki w nim dominujące, zidentyfikowane w toku analizy LC-DAD-ESI-MS/MS.

Tabela 19: Charakterystyka wyciągów przygotowanych z trzech gatunków liści forsycji, zebranych w różnych okresach wegetacji.

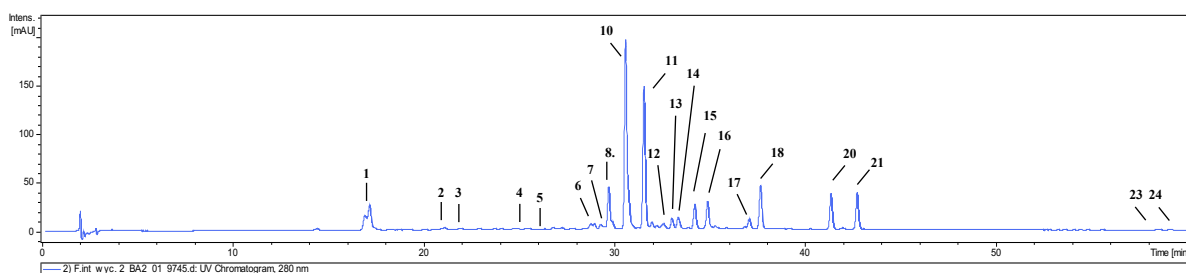
Nr wyciągu	Gatunek	Czas zbioru	Związki dominujące	
I.	<i>Forsythia suspensa</i>	Wrzesień	Forsytozyd A	Filiryna
II.	<i>Forsythia × intermedia</i>	Wrzesień	Forsytozyd A	Werbaskozyd
III.	<i>Forsythia suspensa</i>	Maj	Forsytozyd A	Filiryna
IV.	<i>Forsythia × intermedia</i>	Maj	Forsytozyd A	Arktyina
V.	<i>Forsythia europaea</i>	Maj	Werbaskozyd	Glukozyd – eteru monometylowego pinorezynolu

W toku analizy składu fitochemicznego badanych wyciągów zidentyfikowano **24 związki**, należące m.in. do grupy **lignanów** (11 związków), **fenyloetanoloidów** (6 związków), **kwasów fenolowych** (2 związki) oraz **flawonoidów** (3 związki). Na poniższej rycinie (**rycina 16**) przedstawiono reprezentatywne chromatogramy pięciu analizowanych wyciągów z liści forsycji, co stanowi wprowadzenie do szczegółowej analizy ich składu, opisaną w kolejnych akapitach niniejszej pracy.

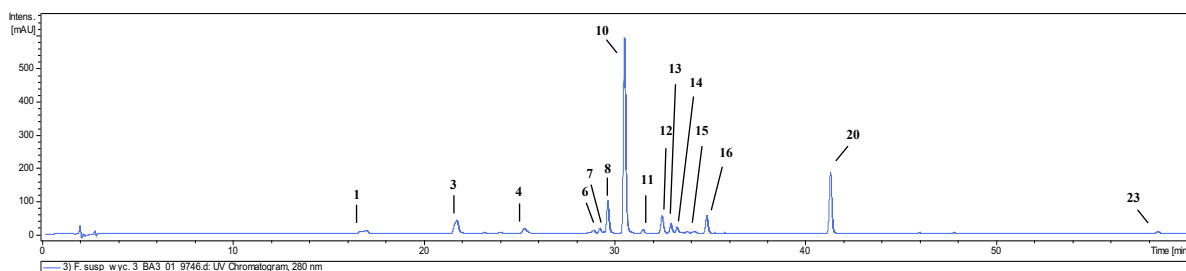
Wyciąg I - *Forsythia suspensa*, czas zbioru: wrzesień



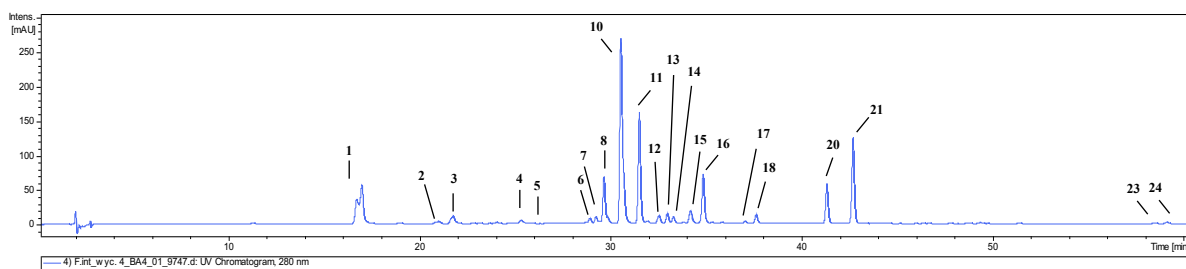
Wyciąg II - *Forsythia* × *intermedia*, czas zbioru: wrzesień



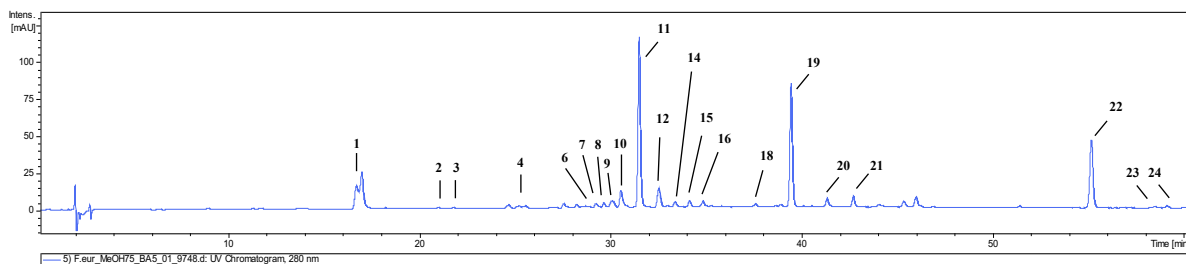
Wyciąg III - *Forsythia suspensa*, czas zbioru: maj



Wyciąg IV - *Forsythia* × *intermedia*, czas zbioru: maj



Wyciąg V - *Forsythia europaea*, czas zbioru: maj



Rycina 16: Reprezentatywne chromatogramy wyciągów przygotowanych z 3 gatunków liści forsycji, zebranych w dwóch różnych porach wegetacji. Chromatogramy zarejestrowano przy dł. fali 280 nm.

W wyciągu I, przygotowanym z liści forsycji zwisłej, zebranych we wrześniu głównym przedstawicielem grupy fenyloetanoidów był forsytozyd A ($t_R = 30,7$ min) – związek **10** - m/z 623 [M-H]⁻, zidentyfikowany na podstawie fragmentacji jonu molekularnego: m/z 477, 315 oraz 135 [M-H]⁻ powstałych w wyniku kolejnych ubytków fragmentów cząsteczki: kawoilowej, ramnozy, heksozy oraz wody. Forsytozyd A był związkiem dominującym we wszystkich badanych wyciągach, z wyjątkiem wyciągu z liści forsycji europejskiej. Związkiem dominującym w wyciągu I była także filiryna ($t_R = 40,6$ min) – związek **20**, której obecność była również charakterystyczna dla wyciągów II-IV, przy jedynie śladowej obecności tego lignanu w wyciągu z liści gatunku *F. europaea*. W związku z obecnością filiryny, w składzie wyciągów I-IV zaobserwowano także obecność jej aglikonu – filigeniny, związek **23** ($t_R = 58,5$ min), zidentyfikowanego na podstawie fragmentacji m/z 356, 341, 326 (-15 kDa), co wskazywało na obecność trzech grup metoksylowych. We wszystkich badanych wyciągach potwierdzono także obecność związku **6** ($t_R = 28,9$ min) – kalceolariozydu C (609 [M-H]⁻), o widmie masowym analogicznym do widma zidentyfikowanego dla forsytozydu A (fragmentacja: m/z 447, 315 [M-H]⁻). Różnicą zaobserwowaną w toku analizy fragmentacji jonów molekularnych obu związków, była utrata ramnozy w przypadku forsytozydu A, oraz pentozy w przypadku kalceolariozydu C, co było zgodne z poprzednimi doniesieniami [27].

W wyciągu III, przygotowanym z liści tego samego gatunku, zebranych w maju, zaobserwowano porównywalną do wyciągu I (na podstawie wysokości pików) dominację związku **10** i **20**. Strukturami, których obecność potwierdzono w analizowanych ekstraktach gatunku *F. suspensa* były także: 3-*O*-rutynozyd kwercetyny (rutozyd, rutyna) ($t_R = 29,7$ min) – związek **8**, m/z 609 [M-H]⁻ oraz jony fragmentacyjne m/z 301, 179, 151), a także izomer rutyny – ramnozyloheksozyd kwercetyny. Innym przedstawicielem związków z grupy flawonoli zidentyfikowanym w wyciągu z liści *F. suspensa* oraz *F. intermedia* był związek **13** ($t_R = 33,0$ min), wykazujący fragmentację charakterystyczną dla pochodnych kemferolu – m/z 285. Utrata cząsteczki 308 Da w wyniku fragmentacji jonu molekularnego m/z 593 [M-H]⁻, zgodnie z poprzednimi doniesieniami [27] mogła świadczyć o utracie ramnozy oraz heksozy [M-H⁻ - 146 – 162] w toku rozpadu cząsteczki ramnozyloheksozydu kemferolu.

W toku analizy składu wyciągu III potwierdzono także obecność związków z grupy lignanów: glukozydu pinorezynolu ($t_R = 32,5$ min) – związek **12** oraz dwóch pochodnych glukozydu epipinorezynolu występujących w formie adduktów z kwasem mrówkowym [M-HCOO]⁻ - m/z 565 – związek **15** ($t_R = 34,2$ min), związek **16** ($t_R = 34,9$ min).

W przypadku wyciągów przygotowanych z liści forsycji pośredniej zaobserwowano dominującą obecność pochodnych fenyloetanoidowych – forsytozydu A, a także werbaskozydu (akteozydu) ($t_R = 31,6$ min) – związek **11**, o zbliżonych profilach widm masowych, m/z 623 $[M-H]^-$, oraz jonów fragmentacyjnych m/z 461, 315 i 135. Ponadto, w przeciwieństwie do wyciągów przygotowanych z liści forsycji zwisłej, w wyciągu II i IV, zidentyfikowano obecność połączeń glikozydowych związków z grupy lignanów – arktyiny ($t_R = 42,7$ min) – związek **21**, a także śladowych ilości jej aglikonu – arktygeniny ($t_R = 59,1$ min) – związek **24**, które były także obecne w niewielkich ilościach w wyciągu z liści forsycji europejskiej. W porównaniu do pozostałych ekstraktów, w wyciągu II zaobserwowano obecność jonu o m/z 519 odpowiadającego glikozydowi matairezynolu – związek **18** ($t_R = 37,6$ min) nieobecnego w wyciągach przygotowanych z liści forsycji zwisłej, o charakterystycznym jonie fragmentacyjnym m/z 357 $[M-H]^-$ powstałym w wyniku utraty cząsteczki heksozy $[M-H-162]$, a także m/z 342 związanej z utratą podstawnika $-CH_3$.

Z uwagi na dominującą obecność werbaskozydu, wyciągi z liści forsycji europejskiej, zebranych w maju wykazywały większy stopień podobieństwa profilu fitochemicznego do wyciągów z liści forsycji pośredniej, w porównaniu do wyciągów liści forsycji zwisłej. Związkami nie w pełni zidentyfikowanymi w toku analizy wyciągu z liści forsycji europejskiej, były także 2 związki wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali w zakresie 225 – 280 nm, oraz fragmentację dla związku **19** ($t_R = 39,3$ min), m/z 533, 371, 357, oraz związku **22** ($t_R = 55,1$ min) m/z 337, 285 (w jonizacji dodatniej) może wskazywać na obecność struktur z grupy lignanów. Związek **19** wstępnie zidentyfikowano jako glikozyd - eteru monometylowego pinorezynolu (izomer filiryny), identyfikowany w liściach forsycji zgodnie z poprzednimi doniesieniami [194].

Szczegółowa analiza fitochemiczna powyższych chromatogramów, bazująca na analizie czasów retencji, widm UV oraz fragmentacji 24 związków zawartych w badanych wyciągach alkoholowo-wodnych, została zaprezentowana w **tabeli 20**.

Tabela 20: Analiza fitochemiczna wyciągów alkoholowo-wodnych przygotowanych z liści forsycji zwisłej, forsycji pośredniej oraz forsycji europejskiej, zebranych w 2 różnych okresach wegetacji. Analiza przeprowadzona na podstawie czasów retencji, widm UV oraz fragmentacji MS/MS.

	Związek	t _R	UV _{max} [nm]	[M-H]-	MS ²	MS ³	I	II	III	IV	V
1.	Kwas chlorogenowy	17,0	325	353	191	-	+	++	+	++	++
2.	Niezidentyfikowany	21,1	215	583*	537, 375,327	-	-	+	-	+	+
3.	Kwas <i>p</i> -kumaroilo- chinowy	21,8	310	337	191, 163,	-	+	+	+	+	+
4.	Suspensazyd	25,3	216	639	621, 487, 427	-	+	+	+	+	+
5.	Niezidentyfikowany	25,6	220	449	315, 253, 175	-	+	+	-	+	-
6.	Kalceolariozyd C	28,9	325	609	447, 315	-	+	+	+	+	+
7.	Ramnoheksozyd kwerceiny	29,3	255, 350	609	343, 301	-	++	++	++	++	++
8.	Rutozyd	29,7	257, 353	609	301, 179, 151	-	+	+	++	+	+
9.	β- metoksywərbaskozyd	30,2	218	653	621, 459	-	-	-	-	-	+
10.	Forsytozyd A	30,7	217, 326	623	477, 461, 315	161, 135	+++	++	+++	++	+
11.	Wərbaskozyd	31,6	217, 329	623	461, 315	315, 161,	+	++	+	++	++
12.	Glukozyd pinorezynolu	32,5	225, 278	565	519, 357	-	++	+	++	+	++
13.	Ramnoheksozyd kemferolu	33,0	265, 343	593	285, 255	-	+	+	+	+	-
14.	Izomer wərbaskozydu	33,4	226, 321	623	477, 461	315, 161,	+	+	+	+	+
15.	Glukozyd epipinorezynolu (I)	34,2	220, 279	565*	519, 357	-	+	++	+	++	+
16.	Glukozyd epipinorezynolu (II)	34,9	219, 278	565*	519, 357	-	+	+	+	++	+
17.	Glukozyd matairezynolu (I)	37,1	226, 279	519	357	-	-	+	-	+	-
18.	Glukozyd matairezynolu (II)	37,6	226, 279	519	357	342, 313,	+	+++	-	+	+
19.	Glukozyd -eteru monometylowego pinorezynolu	39,3	225, 277	579*	533, 371, 357	-	-	-	-	-	++
20.	Filiryna	41,3	227, 278	579*	533, 371	-	+++	++	+++	++	+
21.	Arktyina	42,7	227, 278	579*	371, 357	-	-	++	-	+++	++
22.	Niezidentyfikowany lignan	55,1	228, 280	355***	337, 285	-	-	-	-	-	+++
23.	Filigenina	58,5	220, 280	371	356, 241, 326	-	+	+	+	+	+
24.	Arktygenina	59,1	220, 280	371	356, 295, 209	-	-	+	-	+	+

* addukt z kwasem mrówkowym*** jonizacja dodatnia [M+H]⁺

- - związek nieobecny

+ - obecne śladowe ilości związku

++ - obecność związku na poziomie umiarkowanym

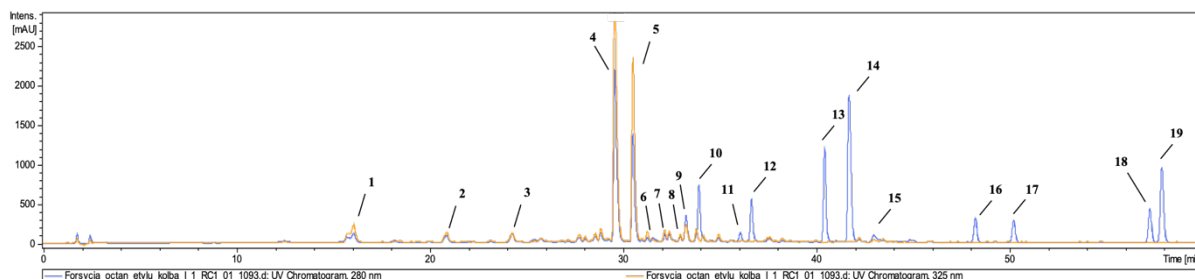
+++ - związek dominujący

4.2. Analiza fitochemiczna wyciągów oraz izolacja jednorodnych związków z roślin z rodziny Oleaceae

Na podstawie powyższej analizy fitochemicznej do dalszych badań wytypowano liście **forsycji zwisłej** oraz **liście forsycji pośredniej** zebrane w maju, jako obiecujące źródła związków biologicznie czynnych. Szczegółowe etapy prowadzące do izolacji związków z grup lignanów, fenyloetanoidów i sekoirydoidów przedstawiono w poniższych rozdziałach.

4.2.1. Frakcjonowanie i analiza fitochemiczna wyciągu metanolowego z liści gatunku *Forsythia × intermedia*

Materiał roślinny przygotowano zgodnie z metodyką scharakteryzowaną w **rozdziale 3.2.1**. Ekstrakcja octanem etylu pozwoliła na wstępne oczyszczenie wyciągów oraz zagęszczenie związków z grupy lignanów i fenyloetanoidów. Dokładna analiza LC-DAD-ESI-MS/MS składu wyciągu octanowego, przygotowanego z liści forsycji pośredniej pozwoliła na identyfikację lub częściową identyfikację związków w nim dominujących, ustaloną na podstawie czasów retencji (t_R), widm UV oraz jonów pseudomolekularnych i ich fragmentacji, co zostało zaprezentowane poniżej (**rycina 17** oraz **tabela 21**).



Rycina 17: Chromatogramy LC-DAD-MS, wyciągu octanowego z liści forsycji pośredniej (*Forsythia × intermedia*). Chromatogramy zarejestrowano przy długości fali 280 nm (kolor niebieski- lignany) oraz 325 nm (kolor pomarańczowy- kwasy fenolowe i fenyloetanoidy).

W toku analizy wyciągu octanowego zidentyfikowano 18 związków z grupy lignanów (12 związków), fenyloetanoidów (3 związki) oraz kwasów fenolowych (3 związki) (**Tabela 20**). Związkami z grupy fenyloetanoidów, o wyraźnie dominującym udziale w składzie analizowanego wyciągu był forsytozyd A ($t_R = 29,5$ min) – związek **4** oraz werbaskozyd ($t_R = 30,7$ min) – związek **5**. Zidentyfikowanymi przedstawicielami kwasów fenolowych był kwas chlorogenowy ($t_R = 16,3$ min) – związek **1**, oraz dwie izoformy kwasu *p*-kumaroilochinowego ($t_R = 21,1 - 24,5$ min) – związek **2** i **3**. Na podstawie oceny wysokości pików w badanym wyciągu octanowym zidentyfikowano także znaczną zawartość filiryny ($t_R = 40,6$ min) –

związek **11**, jej aglikonu filigeniny ($t_R = 57,4$ min) – związek **17**, arktyiny ($t_R = 41,9$ min) – związek **12** jej aglikonu – arktygeniny ($t_R = 58,0$ min) – związek **18**.

Tabela 21: Analiza składu frakcji octanowej wyciągu z liści forsycji pośredniej (*Forsyhia × intermedia*).

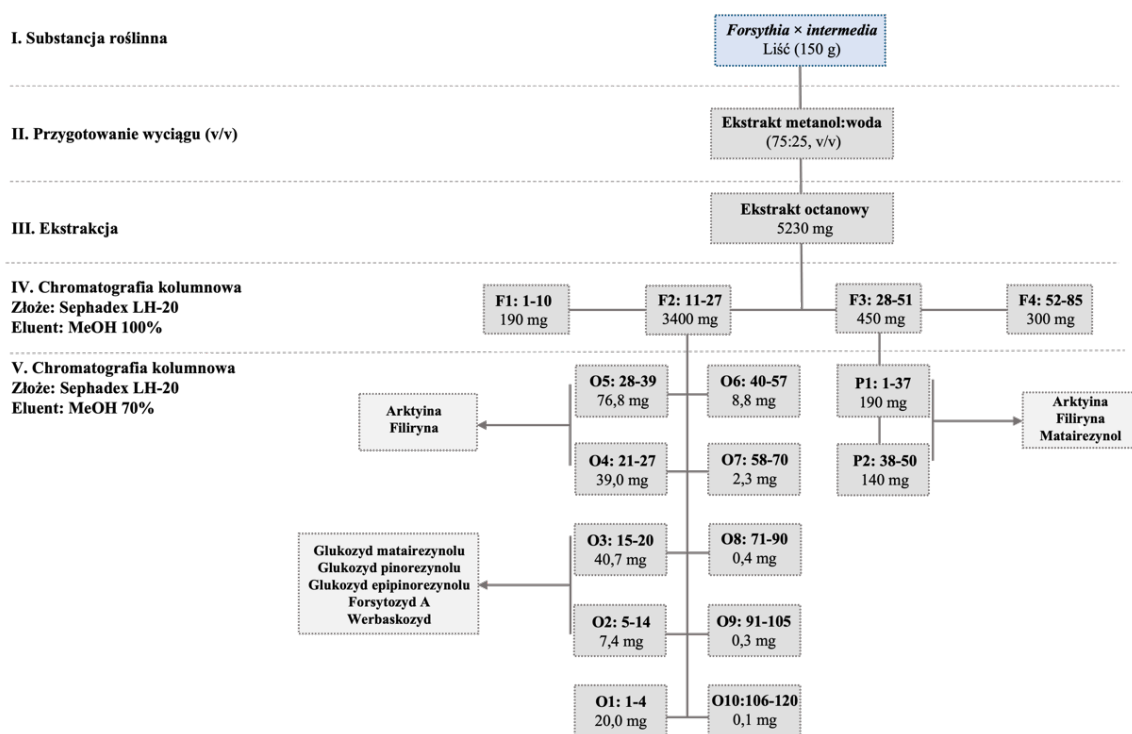
Nr	Związek	t_R	UV_{max} [nm]	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³	Grupa związków
1.	Kwas chlorogenowy	16,3	323	353	191	-	Kwasy fenolowe
2.	Kwas <i>p</i> -kumaroilochinowy (I)	21,1	312	337	191 163	-	Kwasy fenolowe
3.	Kwas <i>p</i> -kumaroilochinowy (II)	24,5	309	337	191, 163	-	Kwasy fenolowe
4.	Forsytozyd A	29,8	221, 324	623	477, 443, 461	315, 135, 161	Fenyloetanoidy
5.	Werbaskozyd	30,7	221, 329	623	461	315, 161, 135	Fenyloetanoidy
6.	Rutynozyd kemferolu	32,4	199, 280	593	477, 461, 315	-	Flawonoidy
7.	Izomer werbaskozydu	32,6	198, 322	623	461, 415	315, 135	Fenyloetanoidy
8.	Lipidozyd A	33,2	198, 313	607	461, 443	315, 205, 163, 135	Fenyloetanoidy
9.	Glukozyd epipinorezynolu (I)	34,1	228, 278	565	357, 519	-	Lignany
10.	Glukozyd epipinorezynolu (II)	36,2	223, 279	519	357	341, 313,	Lignany
11.	Glukozyd matairezynolu	36,8	226, 279	519	357, 341	-	Lignany
12.	Filiryina	40,6	222, 278	579	371, 533	-	Lignany
13.	Arktyina	41,9	228, 279	579	371, 533	-	Lignany
14.	Niezidentyfikowany	43,1	224, 279	579	371, 533	-	Lignany
15.	Pinorezynol	48,4	228, 280	357	151, 311, 341,	-	Lignany
16.	Epipinorezynol	48,4	227, 280	357	151, 311, 342	-	Lignany
17.	Matairezynol	50,3	224, 281	357	147, 298, 313, 342	-	Lignany
18.	Filigenina	57,4	229, 279	371	356	-	Lignany
19.	Arktygenina	58,0	230, 280	371	356, 311	-	Lignany

W celu izolacji poszczególnych związków, wyciąg octanowy rozpuszczono w 100% metanolu, a następnie poddano rozdzielaniu na poszczególne frakcje z zastosowaniem chromatografii kolumnowej (CC, kolumna 40 × 3 cm, Sephadex LH-20), jak opisano w **rozdziale 3.3.2**. Składy poszczególnych frakcji oceniono metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC, szczegółowo opisanej w **rozdziale 3.3.2**) oraz metodą LC-DAD-ESI-MS/MS.

W wyniku przeprowadzonego rozdzielania uzyskano 85 frakcji (po 8 ml każda), które na postawie analizy składu połączono w 4 główne frakcje zbiorcze (**F1-F4**). Frakcję F2 oraz

frakcję F3 poddano dalszemu rozdzielaniu metodą CC (złóże: Sephadex LH-20, kolumna 80 × 2,5 cm), z zastosowaniem 70% roztworu metanolu jako eluentu. W wyniku przeprowadzonego rozdzielania frakcji F2 otrzymano 80 frakcji cząstkowych (po 8 ml każda), które połączono w 10 głównych subfrakcji (**O1-O10**) na podstawie ich profilu TLC oraz LC-MS. W toku analizy, w subfrakcjach O2 i O3, zidentyfikowano obecność glikozydów: **epipinorezynolu**, **matairezynolu** oraz **pinorezynolu**, a także związków z grupy fenyloetanoidów, **werbaskozydu** i **forsytozydu A**. Analiza profilu LC-DAD-ESI-MS/MS subfrakcji O4 i O5, potwierdziła obecność znamiennej ilości **arktyiny** i **filiryny**.

W wyniku rozdzielania frakcji F3 metodą chromatografii kolumnowej (80 × 2,5 cm), uzyskano 2 subfrakcje (**P1-P2**), w których stwierdzono obecność **arktyiny**, **filiryny** oraz **matairezynolu**. Szczegółowy schemat prezentujący poszczególne kroki przeprowadzonej analizy przedstawiono na **rycynie 18**.

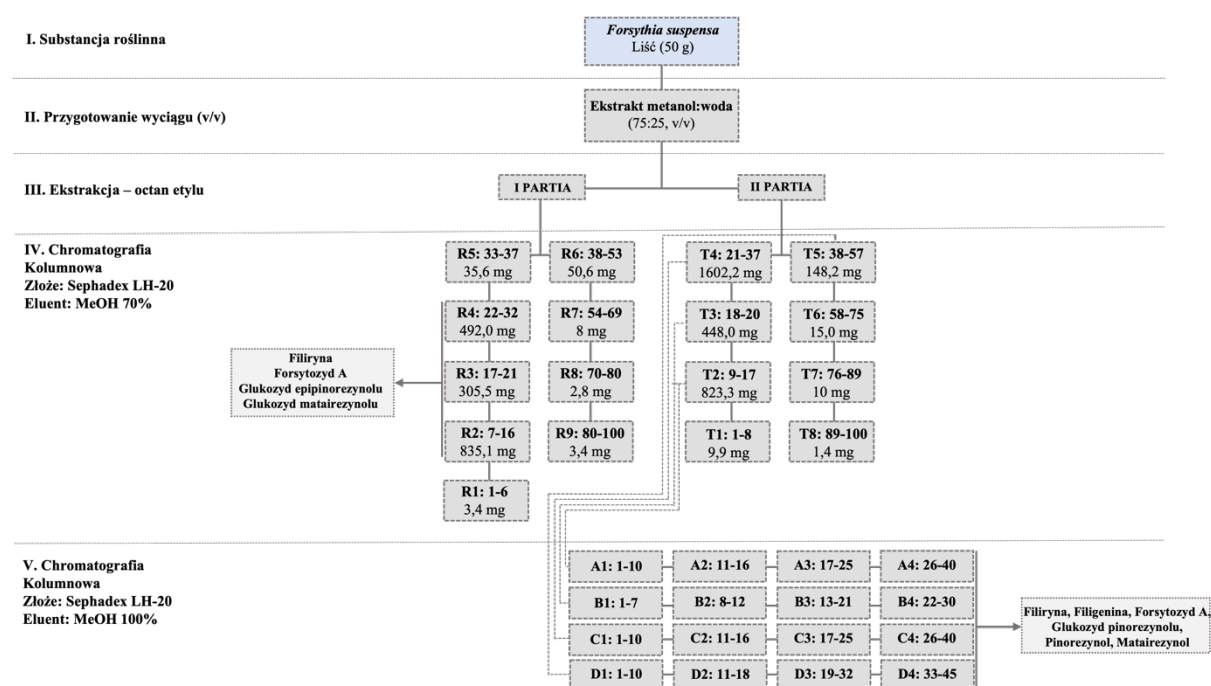


Rycina 18: Schemat frakcjonowania i analizy fitochemicznej wyciągu metanolowo-wodnego (75:25 v/v) przygotowanego z liści forsycji pośredniej (*Forsythia × intermedia*) zebranych w maju.

4.2.2. Frakcjonowanie i analiza fitochemiczna wyciągu metanolowego z liści gatunku *Forsythia suspensa*

Materiał roślinny przygotowano zgodnie z metodyką scharakteryzowaną w **rozdziale 3.2.1**. Dokładna analiza LC-DAD-ESI-MS/MS składu wyciągu octanowego, przygotowanego z liści forsycji zwisłej pozwoliła na wytypowanie związków do izolacji. Ekstrakt octanowy rozpuszczono w 20 ml 70% metanolu i podzielono na 2 równe części (Partia I-II). Każdą z czterech części otrzymanego wyciągu poddano rozdziałowi z zastosowaniem chromatografii kolumnowej (kolumna 40 × 3 cm, Sephadex LH-20) z zastosowaniem 70% metanolu jako eluentu. W toku prowadzonej analizy, dla każdej porcji wyciągu otrzymano 100 pojedynczych frakcji (po 8 ml każda), które na podstawie analizy TLC i LC-MS połączono w poszczególne frakcje zbiorcze (**R1-R9; T1-T8**), jak przedstawiono na poniższej rycinie (**rycina 19**).

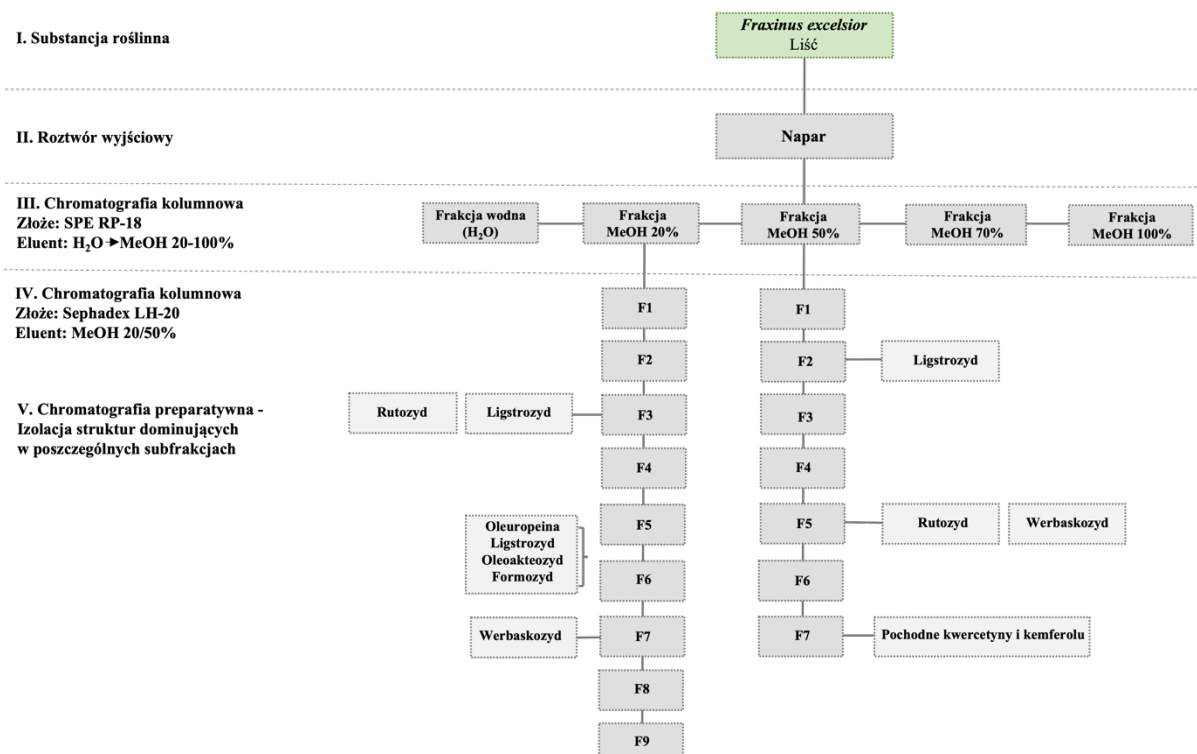
Szczegółowa analiza składu poszczególnych subfrakcji pozwoliła na identyfikację obecności **forsytozydu A**, **filiryny**, **glukozydów epipinorezynolu** oraz **matairezynolu** w subfrakcjach **R2-R4**. Subfrakcje T1-T4 otrzymane z drugiej partii wyciągu zostały poddane dalszemu rozdziałowi z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej, stosując 100% MeOH jako eluent (kolumna 80 × 2,5 cm, Sephadex LH-20). Analiza składu poszczególnych subfrakcji (A-D 1 – A-D 4) pozwoliła na identyfikację **glukozydu pinorezynolu**, **filiryny**, **filigeniny**, **pinorezynolu**, **matairezynolu** oraz **forsytozydu A** w ich składzie. Szczegółowy schemat prezentujący poszczególne kroki przeprowadzonej analizy przedstawiono na **rycinie 19**.



Rycina 19: Schemat frakcjonowania i analizy fitochemicznej wyciągu metanolowo-wodnego (75:25 v/v) przygotowanego z liści forsycji zwisłej (*Forsythia suspensa*) zebranych w maju.

4.2.3. Analiza fitochemiczna wyciągu wodnego (naparu) przygotowanego z liści gatunku *Fraxinus excelsior* i jego frakcji

Kolejnym surowcem z rodziny Oleaceae, poddanym analizie były liście jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*). Zgodnie z tradycyjną formą stosowania surowca rekomendowaną m.in. przez Europejską Agencję Leków, w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej, z wysuszonego materiału roślinnego przygotowano napar, z którego następnie pozyskano frakcję wodną oraz frakcje metanolowe o stopniowo rosnącej procentowości (20%, 50%, 70%, 100%) z zastosowaniem chromatografii kolumnowej (SPE RP-18). Frakcje metanolowe (20% i 50%) podzielono dodatkowo na poszczególne subfrakcje (chromatografia kolumnowa, złożo: Sephadex LH-20). Aktywność biologiczna naparu, frakcji oraz poszczególnych subfrakcji została oceniona w toku niniejszych badań. Wstępna analiza aktywności przeciwzapalnej poszczególnych frakcji wyciągu (zaprezentowana w **rozdziale 4.4**) była podstawą do późniejszej izolacji związków dominujących w poszczególnych subfrakcjach, potencjalnie odpowiedzialnych za aktywność biologiczną całego surowca. Tok analizy fitochemicznej naparu, wraz z zaznaczeniem związków dominujących w poszczególnych subfrakcjach przedstawiono na poniższej rycinie (**rycina 20**).



Rycina 20: Schemat analizy fitochemicznej naparu z liści jesionu wyniosłego i jego frakcji wraz ze wskazaniem związków dominujących w poszczególnych subfrakcjach wyciągów metanolowych 20% i 50%.

Zgodnie z analizą chromatogramu dla naparu z liści jesionu (**rycina 21**) (dł. fali 240 nm) strukturami dominującymi w jego składzie są związki z grupy pochodnych flawonoidów, sekoirydoidów i fenyloetanoidów. Strukturą wiodącą w analizowanym naparze był fenyloetanoid, werbaskozyd ($t_R = 31,1$ min) – związek **4**, zidentyfikowany na podstawie wartości jonu pseudomolekularnego przy m/z 623 $[M-H]^-$ oraz jonów fragmentacyjnych m/z 461 oraz m/z 315. Związkiem o znamiennej zawartości w analizowanym naparze (na podstawie wysokości pików) była także pochodna kwercetyny – rutynozyd - związek **3** ($t_R = 29,3$ min). W toku analizy zidentyfikowano także obecność 3 związków z grupy sekoirydoidów, nieobecnych we wcześniej analizowanym rodzaju *Forsythia* – oleuropeinę ($t_R = 38,0$ min, związek **6**), 8E-formozyd ($t_R = 39,6$ min, związek **6**) oraz 8E- ligstrozyd ($t_R = 43,0$ min, związek **9**), spójnie z wcześniejszymi doniesieniami [195]. Związek **8** ($t_R = 39,9$ min), który został uprzednio zidentyfikowany także w kwiatach lilaka pospolitego [180] został scharakteryzowany jako oleoakteozyd. Szczegółową analizę składu (**rycina 21**) na podstawie czasów retencji, widm UV, jonów pseudomolekularnych oraz ich fragmentacji zaprezentowano w poniższej tabeli (**tabela 22**).

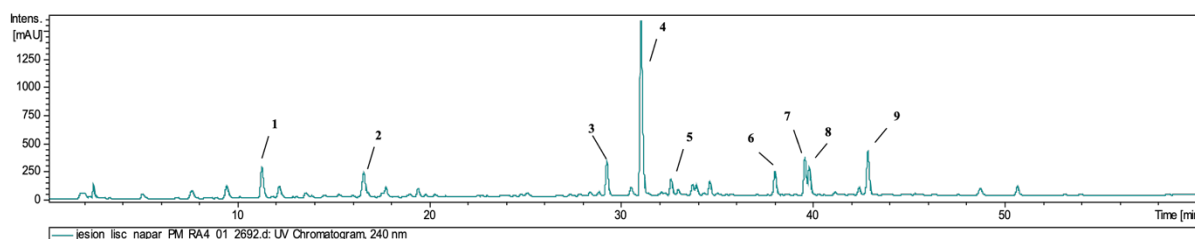


Tabela 22: Analiza fitochemiczna naparu przygotowanego z liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*). Chromatogram zarejestrowano przy długości fali 240 nm.

Rycina 21: Chromatogram LC-DAD, naparu przygotowanego z liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*). Chromatogram zarejestrowano przy długości fali 240 nm.

Nr	Związek	t_R [min]	UV_{max} [nm]	$[M-H]^-$	$[MS^2]$	Grupa związków
1.	Kwas 3-O-kawoilochinowy	11,4	325	353	191, 179	Kwasy fenolowe
2.	Kwas 5-O-kawoilochinowy	16,6	325	353	191	Kwasy fenolowe
3.	Rutynozyd kwercetyny	29,2	256, 355	609	301	Flawonole
4.	^b Werbaskozyd	31,1	215, 330	623	461, 315, 161, 315	Fenyloetanoidy
5.	Heksozyloramnozyd kemferolu	32,7	264, 343	539	285	Flawonole
6.	^b Oleuropeina	38,0	222, 275	539	377, 307, 275	Sekoirydoidy
7.	^b 8E-formozyd	39,6	218	^a 569	523, 385, 299, 223	Sekoirydoidy
8.	^b Oleoakteozyd	39,9	216, 325	1009	847, 623, 461	Fenyloetanoidy
9.	^b 8E-ligstrozyd	43,0	216, 280	523	523, 361	Sekoirydoidy

^a $[M-H+HCOOH]^-$

^bStruktura potwierdzona na podstawie analizy NMR

4.2.4. Izolacja związków z grupy lignanów, fenyloetanoidów i sekoirydoidów

Dokładna analiza LC-DAD-ESI-MS/MS pozwoliła na klasyfikację i połączenie subfrakcji o zbliżonym profilu fitochemicznym, otrzymanych w ramach frakcjonowania wyciągów przygotowanych z liści *F. suspensa*, *F. × intermedia*, a także na wytypowanie frakcji naparu przygotowanego z liści *F. excelsior* do izolacji jednorodnych związków chemicznych.

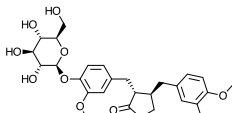
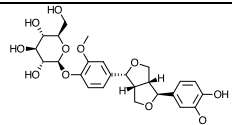
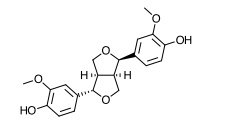
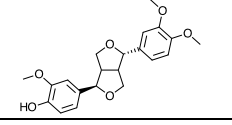
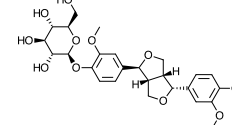
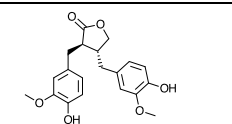
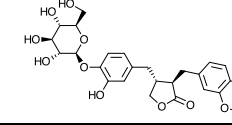
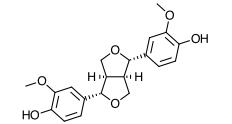
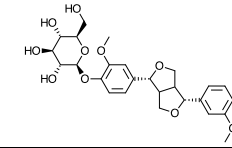
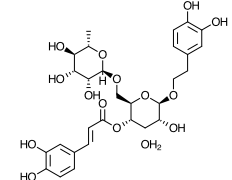
Jednorodne związki chemiczne wyizolowano za pomocą chromatografii preparatywnej, zgodnie z warunkami rozdziału określonymi w **rozdziale 3.3.3**. Z liści forsycji i jesionu wyizolowano 9 związków z grupy lignanów, 3 fenyloetanoidy oraz 2 sekoirydoidy.

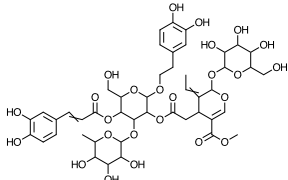
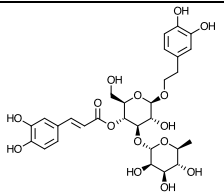
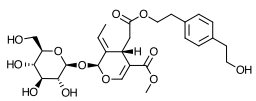
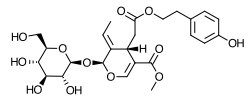
Związkami, wyizolowanymi w największych ilościach z liści rodzaju *Forsythia* były **forsytozyd A** (10257,8 mg) oraz **filiryna** (479,4 mg). W toku analizy wyizolowano także znaczne ilości innych związków z grupy lignanów – **arktyinę** (202,3 mg), **4-O-β-glukopiranozyd pinorezynolu** (184,0 mg) oraz **4'-O-β-glukopiranozyd epipinorezynolu** (217,1 mg), który został następnie poddany hydrolizie enzymatycznej, w celu uzyskania **epipinorezynolu** (9,2 mg z 40 mg 4'-O-β-glukopiranozydu epipinorezynolu poddanych hydrolizie). W wyniku izolacji otrzymano także niewielkie ilości jednorodnych związków wolnych aglikonów: **matairezynolu** (2,0 mg), **filigeniny** (28,0 mg – sumaryczna ilość otrzymana po izolacji oraz w ramach hydrolizy enzymatycznej) oraz **pinorezynolu** (10,0 mg).

Izolacja związków z liści jesionu wyniosłego pozwoliła na izolację związków z grupy sekoirydoidów – **8E-ligstrozydu** (214 mg) oraz **8E-formozydu** (6,6 mg), a także przedstawiciela fenyloetanoidów – **oleoaktozydu** (54 mg).

W poniższej tabeli (**tabela 23**) przedstawiono kompleksowe podsumowanie otrzymanych po izolacji metodą chromatografii preparatywnej związków, uwzględniając ich ilości oraz wzory sumaryczne i strukturalne. Struktury związków zostały potwierdzone metodą LC-DAD-ESI-MS/MS oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (widma ¹H, ¹³C i dwuwymiarowe).

Tabela 23: Jednorodne związki chemiczne wyizolowane z roślin rodziny Oleaceae lub pozyskane w ramach hydrolizy enzymatycznej.

Nr	Związek	Wzór sumaryczny	Źródło występowania	Wzór strukturalny	Ilość wyizolowanego związku [mg]
Lignany					
1.	^b Arktyina	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	Liście <i>Forsythia</i> × <i>intermedia</i>		202,3
2.	^b 4'- <i>O</i> -β-glukopiranozyd epipinorezynolu	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		217,1
3.	^{a,b} Epipinorezynol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		9,2
4.	^{a,b} Filigenina	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		28,0
5.	^b Filiryna	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		479,4
6.	^b Matairezynol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		2,0
7.	^b 4'- <i>O</i> -β-glukopiranozyd matairezynolu	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		10,2
8.	^b Pinorezynol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		10,0
9.	^b 4- <i>O</i> -β-glukopiranozyd pinorezynolu	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		184,0
Fenyloetanoidy					
10.	^b Forsytozyd A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	^c Liście <i>Forsythia</i> spp.		10257,8

Nr	Związek	Wzór sumaryczny	Źródło występowania	Wzór strukturalny	Ilość wyizolowanego związku [mg]
Fenyloetanoidy					
11.	^b Oleoakteozyd	C ₄₆ H ₅₈ O ₂₅	Liście <i>Fraxinus excelsior</i>		54,0
12.	^b Werbaskozyd	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	Liście <i>Forsythia</i> × <i>intermedia</i>		25,0
Sekoirydoidy					
13.	^b 8E-Formozyd	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	Liście <i>Fraxinus excelsior</i>		6,6
14.	^b 8E-Ligstrozyd	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	Liście <i>Fraxinus excelsior</i>		214

^apozyskano częściowo w ramach hydrolizy enzymatycznej

^bidentyfikacja na podstawie analizy NMR

^cpozyskano z obu gatunków: *F. × intermedia* oraz *F. suspensa*

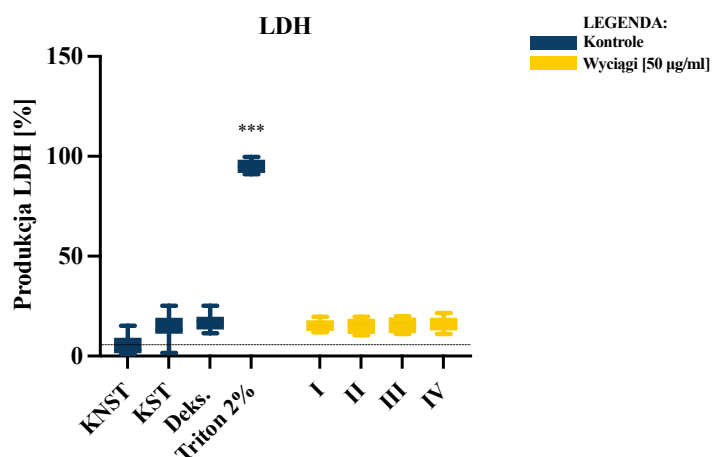
4.3. Określenie właściwości przeciwzapalnych wyciągów metanolowych, przygotowanych z liści dwóch gatunków forsycji

Ocenę aktywności przeciwzapalnej wyciągów pozyskanych z dwóch gatunków liści forsycji, zebranych w różnych porach wegetacji przeprowadzono na modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC, stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS.

Badania prowadzono w trzech etapach:

- I. Ocena cytotoksyczności wyciągów, wobec komórek monocytów/makrofagów PBMC.
- II. Ocena wpływu wyciągów na uwalnianie mediatorów prozapalnych: TNF- α , IL-6 oraz przeciwzapalnego, transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β), w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC.
- III. Ocena wpływu wyciągów na ekspresję receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC.

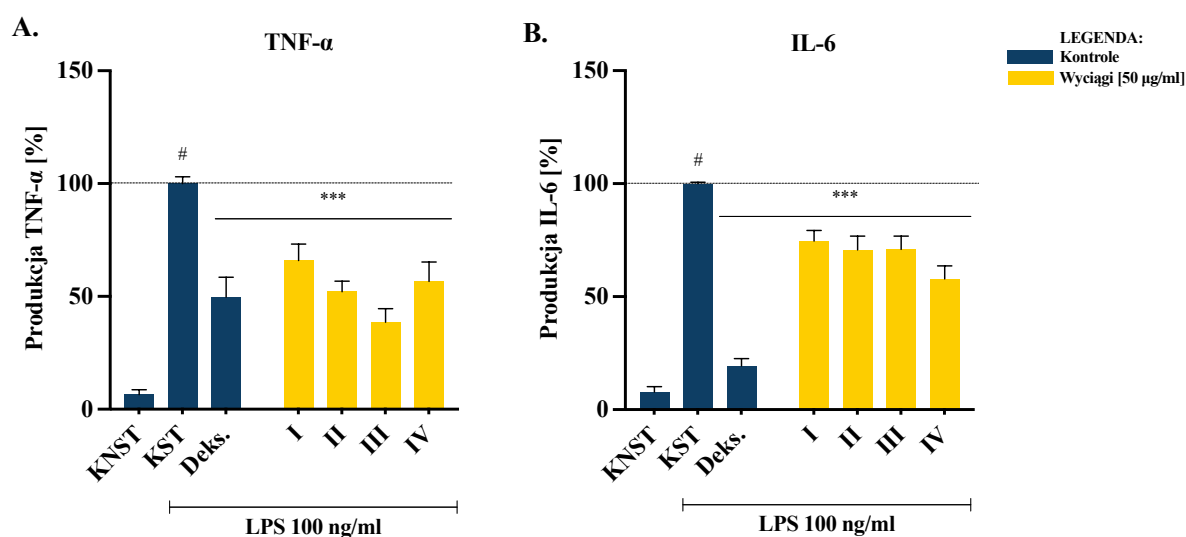
I. Roślinne wyciągi alkoholowo-wodne, badane w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ nie wykazywały cytotoksyczności wobec komórek monocytów/makrofagów PBMC, co zostało określone metodą pomiaru zawartości procentowej dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w badanych supernatantach komórkowych (rycina 22). Kontrolę pozytywną stanowiły komórki inkubowane z 2% roztworem Tritonu X-100.



Rycina 22: Wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji (50 $\mu\text{g/ml}$). Wyniki przeliczone na wartości procentowe przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max. Istotność statystyczną pomiędzy średnią wartością otrzymaną dla grupy kontrolnej (KNST- kontrola niestymulowana, linia przerywana na wykresie), a poszczególnymi próbami oszacowano testem ANOVA z testem post hoc Dunnetta, *** $p < 0,001$. KST- kontrola stymulowana z dodatkiem LPS (100 ng/ml). Oznaczenia wyciągów: I. *F. suspensa*, wrzesień, II. *Forsythia* \times *intermedia*, wrzesień, III. *F. suspensa*, maj, IV. *Forsythia* \times *intermedia*, maj.

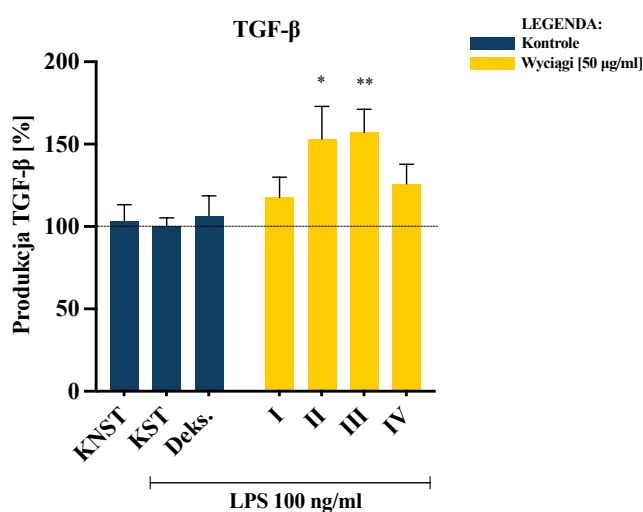
II. Ekstrakty z liści forsycji, badane w stężeniu 50 µg/ml, bez względu na okres zbioru oraz gatunek macierzysty wykazywały znamiennej statystycznie inhibicję wydzielania cytokin prozapalnych (TNF-α oraz IL-6).

W przypadku oceny stopnia sekrecji TNF-α najskuteczniejszy okazał się wyciąg III, przygotowany z liści forsycji zwisłej, zebranych w maju, hamujący wydzielanie TNF-α do poziomu $38,6 \pm 5,9\%$ ($***p < 0,001$), działając porównywalnie do kontroli pozytywnej-deksametazonu (powodującej spadek wydzielania TNF-α do wartości $49,7 \pm 8,9\%$, w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS - 100%). Hamowanie sekrecji TNF-α przez trzy pozostałe wyciągi mieściło się w zakresie od $56,7 \pm 8,6$ do $65,9 \pm 7,3\%$ (w stosunku do kontroli stymulowanej LPS, 100%). Inhibicja wydzielania IL-6 przez komórki monocytów/makrofagów PBMC była także znamiennej statystycznie po zastosowaniu wszystkich czterech badanych wyciągów, przy wyraźnej najskuteczniejszej hamowaniu sekrecji IL-6, określonej dla wyciągu IV (liście forsycji pośredniej zebrane w maju) na poziomie $57,9 \pm 5,8\%$ ($***p < 0,001$). Zastosowanie trzech pozostałych wyciągów hamowało wydzielanie IL-6 do wartości w zakresie od $70,6 \pm 6,1$ do $74,6 \pm 4,7\%$, w stosunku do kontroli stymulowanej LPS. Najskuteczniejszą inhibicję sekrecji obu badanych mediatorów zapalnych zaobserwowano dla wyciągów przygotowanych z liści forsycji obu gatunków, zebranych w porze wiosennej. Na poniższych wykresach słupkowych przedstawiono analizę stopnia sekrecji TNF-α i IL-6, po 24-godzinnej inkubacji komórek z badanymi wyciągami (**rycina 23 A, B**).



Rycina 23: Sekrecja **A.** TNF-α oraz **B.** IL-6 przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji (50 µg/ml). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią ± SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 µM. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem *post hoc* Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), $***p < 0,001$. Oznaczenia wyciągów: I. *F. suspensa*, wrzesień, II. *Forsythia × intermedia*, wrzesień, III. *F. suspensa*, maj, IV. *Forsythia × intermedia*, maj.

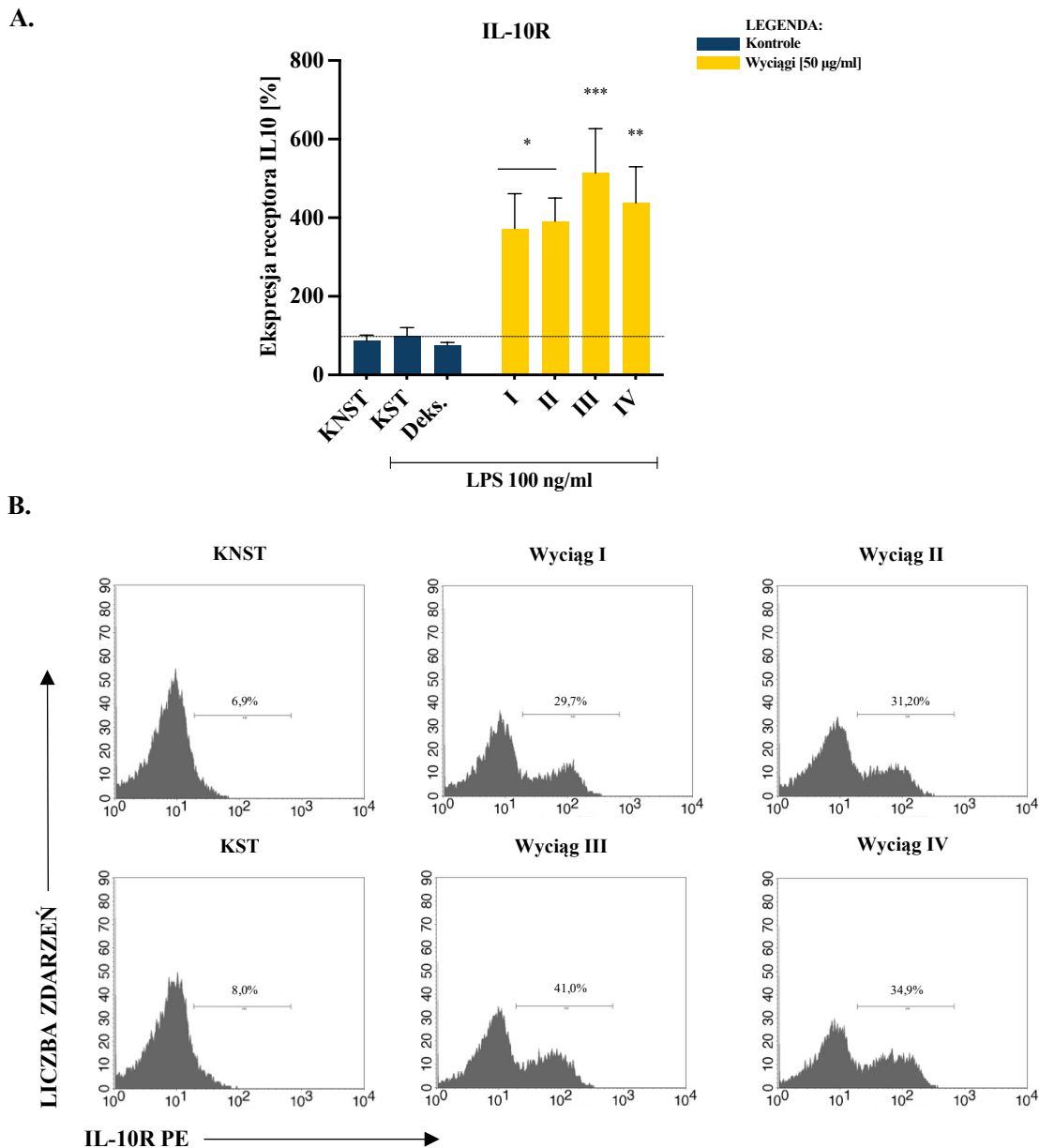
Ocena wpływu wyciągów z liści forsycji na uwalnianie mediatorów przeciwzapalnych wykazała znamiennej wpływ wyciągów II i III na wydzielanie transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β) (rycina 24). Wyciąg z liści forsycji pośredniej, zebranych we wrześniu (wyciąg II) indukował wzrost sekrecji TGF- β w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC do wartości $153,1 \pm 19,9\%$ (* $p < 0,05$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS (100% wydzielania). Podobną wartość, wynoszącą $157,1 \pm 14,2\%$ (** $p < 0,01$) zaobserwowano po 24- godzinnej inkubacji komórek z wyciągiem III (liście forsycji zwiślej, zebrane w maju). Wartości osiągnięte po zastosowaniu wyciągu I oraz wyciągu IV wynosiły odpowiednio $117,7 \pm 12,4\%$ oraz $125,9 \pm 11,8\%$, w stosunku do kontroli stymulowanej (100% sekrecji).



Rycina 24: Sekrecja transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β), przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji (50 $\mu\text{g/ml}$). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μM . Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. KNST – kontrola niestymulowana. Oznaczenia wyciągów: I. *F. suspensa*, wrzesień, II. *Forsythia \times intermedia*, wrzesień, III. *F. suspensa*, maj, IV. *Forsythia \times intermedia*, maj.

III. Ostatnim etapem analizy aktywności biologicznej, czterech badanych wyciągów z liści forsycji była ocena ich wpływu na wzrost ekspresji receptora dla IL-10, na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC, określona metodą cytometrii przepływowej. Receptor IL-10 jest powierzchniowym, homodimerycznym receptorem komórkowym wykazującym ekspresję na powierzchni komórek monocytów, makrofagów, komórek dendrytycznych oraz komórek NK. Aktywacja kompleksu receptora IL-10 na powierzchni komórki jest pierwszym krokiem w inicjowaniu szlaków sygnałowych IL-10, a upośledzenie tych mechanizmów związane jest z patomechanizmem wielu chorób, w tym schorzeń o podłożu zapalnym. Wszystkie z badanych wyciągów znamiennej statystycznie zwiększały ekspresję receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC. Najwyższy,

około 5-krotny wzrost ekspresji receptora dla IL-10, w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS, stanowiącej wartość odniesienia (100% ekspresji), zaobserwowano dla wyciągu numer III. Wartości odnotowane dla trzech pozostałych wyciągów wskazywały na porównywalny, niemal 4-krotny wzrost aktywności badanego receptora, mieszczący się w zakresie od $372 \pm 88,7\%$ do $437 \pm 92,1\%$. Analizę stopnia ekspresji IL-10R, oraz reprezentatywne histogramy zaprezentowano na poniższej rycinie (rycina 25 A, B).



Rycina 25: A. Ekspresja receptora IL-10R na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji (50 µg/ml). Wyniki przedstawiono jako procent ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS (KST, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią ± SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 µM. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. KNST – kontrola niestymulowana B. Analiza cytometryczna stopnia ekspresji receptora IL-10; reprezentatywne histogramy. Marker M1 wyznacza poziom ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS. Oznaczenia wyciągów: I. *F. suspensa*, wrzesień, II. *Forsythia × intermedia*, wrzesień, III. *F. suspensa*, maj, IV. *Forsythia × intermedia*, maj.

II. Napar z liści jesionu wyniosłego cechował się znaczącym działaniem przeciwzapalnym, ograniczając wydzielanie TNF- α do poziomu $33,2 \pm 4,3\%$ ($***p < 0,001$), oraz IL-6 do poziomu $57,8 \pm 7,3\%$ ($**p < 0,01$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS - 100% wydzielania, przy niemal całkowitym braku efektywności wobec sekrecji IL-1 β ($94,8 \pm 13,8\%$, $p > 0,05$).

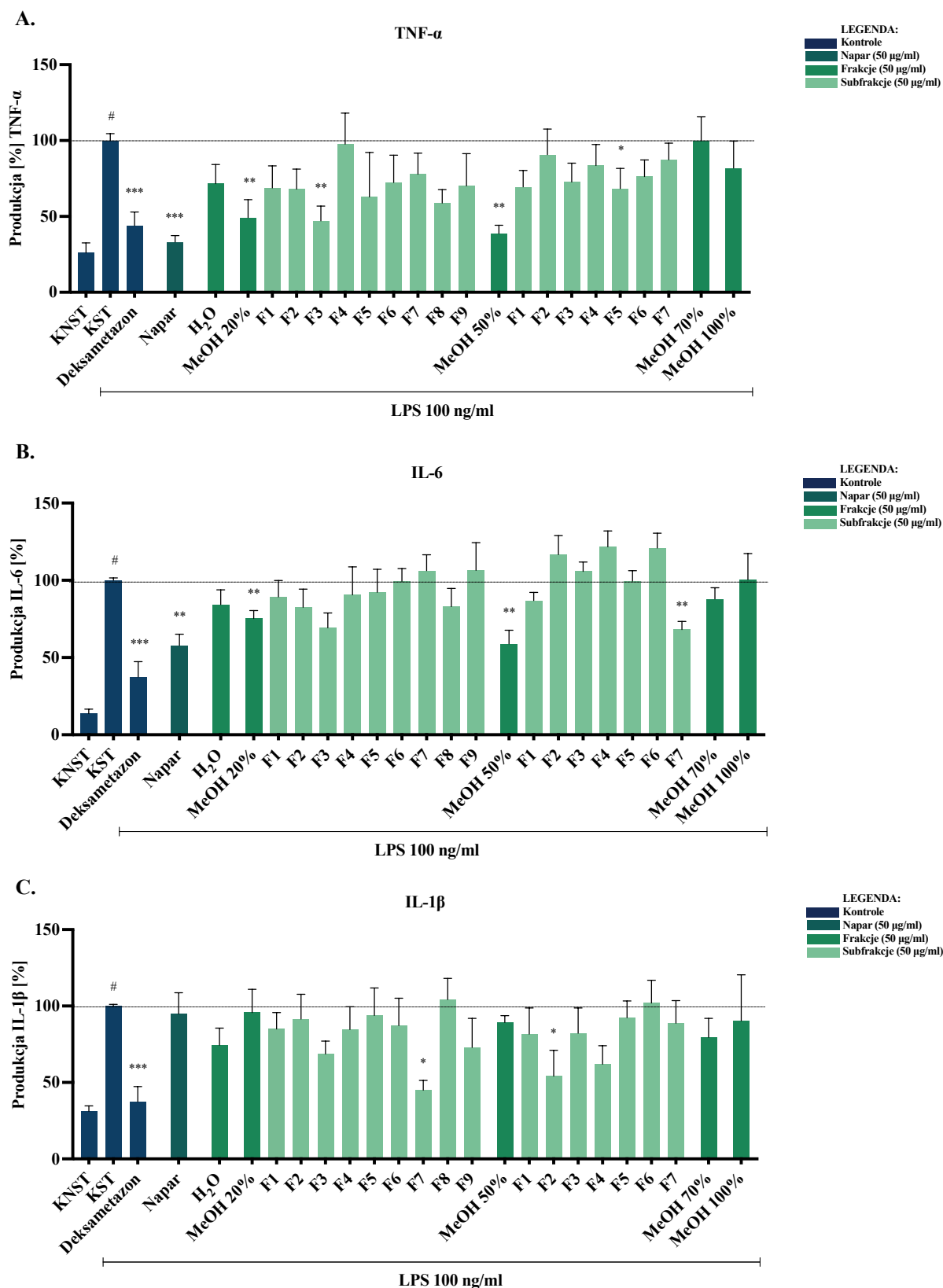
Otrzymane frakcje, w szczególności frakcje metanolowe 20% i 50% równie silnie hamowały sekrecję cytokin prozapalnych (IL-6, oraz TNF- α), przy czym frakcja metanolowa 50% hamowała wydzielanie TNF- α w stopniu zbliżonym ($38,8 \pm 5,4\%$, $**p < 0,01$) do kontroli pozytywnej z deksametazonem ($43,3 \pm 6,0\%$, $***p < 0,001$). Średni stopień wydzielania IL-6, w badanych supernatantach komórkowych po zastosowaniu badanych frakcji wynosił odpowiednio, po zastosowaniu frakcji metanolowej 20% - $75,3 \pm 5,1\%$ ($**p < 0,01$) oraz frakcji metanolowej 50% - $58,9 \pm 8,8\%$ ($**p < 0,01$). Pozostałe frakcje metanolowe, tj. 70 i 100% nie wykazywały znamiennej zmiany wpływu wobec hamowania wydzielania badanych mediatorów zapalnych (TNF- α , IL-6, IL-1 β).

Z uwagi na znamienne hamowanie sekrecji TNF- α oraz IL-6 po zastosowaniu frakcji metanolowych 20 i 50%, w kolejnym kroku przeanalizowano wpływ ich subfrakcji, w celu identyfikacji partii odpowiedzialnych za obserwowane efekty działania. Najsilniejszą inhibicję wydzielania TNF- α zaobserwowano po inkubacji komórek z subfrakcją nr 3, wyciągu metanolowego 20% ($47,1 \pm 9,7\%$, $**p < 0,01$). Za inhibicję wydzielania TNF- α przez wyciąg metanolowy 50%, była odpowiedzialna subfrakcja nr 5, dla której zaobserwowano znamienne hamowanie produkcji badanej cytokiny na poziomie $68,3 \pm 13,3\%$ ($*p < 0,05$), w stosunku do kontroli stymulowanej (100% produkcji).

W przypadku inhibicji wydzielania IL-6 przez badane subfrakcje wyciągów metanolowych 20 i 50% znamienne hamowanie sekrecji badanej cytokiny zaobserwowano jedynie dla subfrakcji nr 7, wyciągu metanolowego 50% - $68,1 \pm 5,2\%$ ($**p < 0,01$).

Analiza wpływu badanych frakcji oraz ich subfrakcji na stopień wydzielania IL-1 β , wykazała aktywność subfrakcji nr 7, wyciągu metanolowego 20% oraz subfrakcji nr 2 wyciągu metanolowego 50%, które hamowały sekrecję IL-1 β w sposób znamienne hamowanie statystycznie, odpowiednio do poziomu $45,0 \pm 6,4\%$ oraz $54,2 \pm 16,8\%$ ($*p < 0,05$), w stosunku do kontroli stymulowanej LPS (100% wydzielania).

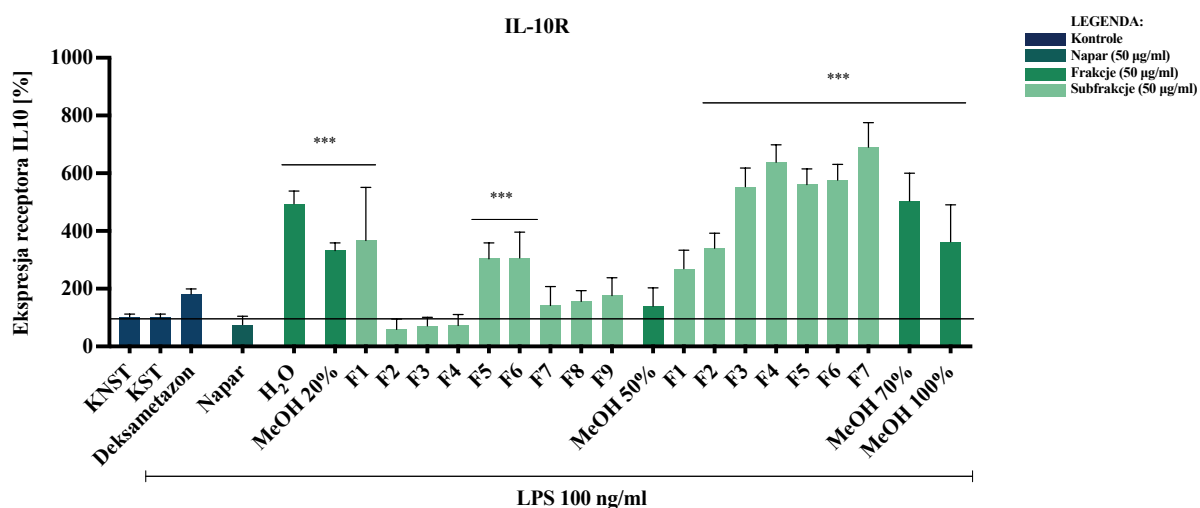
Analizę wpływu badanych ekstraktów na stopień wydzielania TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β zaprezentowano na poniższych wykresach słupkowych (**rycina 27 A, B, C**).



Rycina 27: Sekrecja **A. TNF- α** , **B. IL-6** oraz **C. IL-1 β** w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC, po 24-godzinnej inkubacji z naparem, frakcjami i subfrakcjami z liści jesionu wyniosłego (50 µg/ml). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 µM. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

III. Ostatnim etapem oceny mechanizmów działania przeciwzapalnego liści jesionu wyniosłego była ocena wpływu badanych wyciągów na ekspresję receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC.

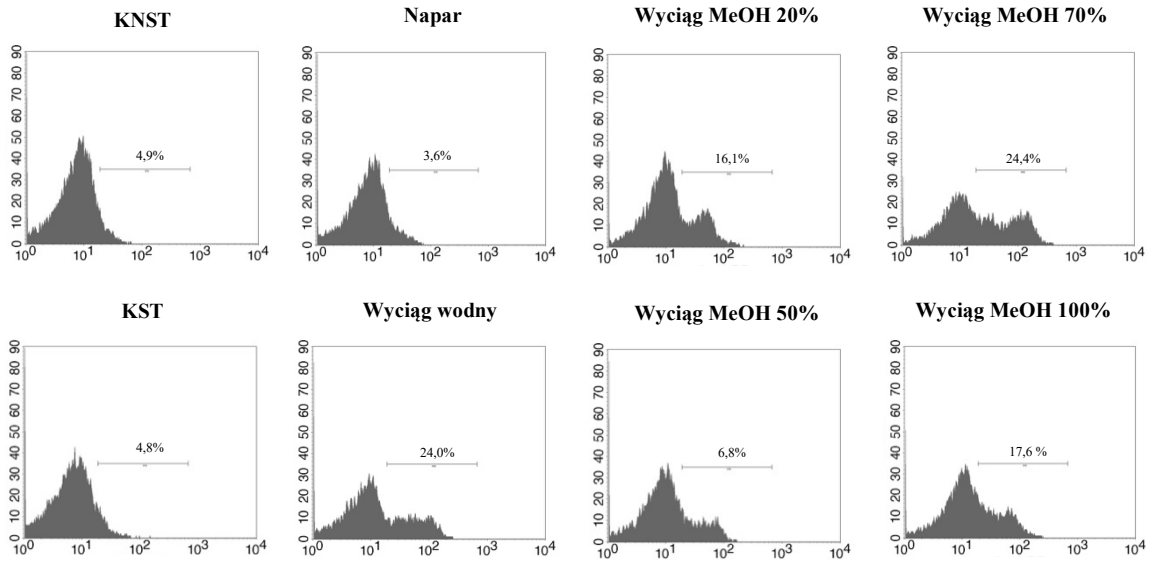
Napar, pozyskane z niego frakcje oraz poszczególne subfrakcje uzyskane z liści jesionu wyniosłego wykazywały znamiennej statystycznie, stymulujący wpływ na wzrost ekspresji IL-10R na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC, co zostało zaprezentowane na poniższych rycinach (**rycina 28, 29**). Najefektywniejszy wzrost ekspresji zaobserwowano po inkubacji komórek z subfrakcjami 3 - 7 wyciągu metanolowego 50%, przy najlepszej efektywności działania subfrakcji nr 7 ($690,0 \pm 85,2\%$, $***p < 0,001$). Analizując aktywność subfrakcji metanolowych wyciągu 20%, najwyższy wzrost ekspresji receptora dla IL-10 zaobserwowano po inkubacji komórek z subfrakcjami nr 5 i 6, bogatych w oleuropeinę, co znalazło przełożenie na wzrost ekspresji IL-10R, osiągając wartości odpowiednio $303,0 \pm 55,3\%$ oraz $307,0 \pm 89,7\%$ ($***p < 0,001$) (w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS - 100% ekspresji). Co ciekawe, znamiennej statystycznie wzrost ekspresji IL-10R zaobserwowano także w przypadku inkubacji komórek z frakcjami metanolowymi 70 i 100% (odpowiednio $504,0 \pm 95,6\%$ oraz $362,6 \pm 128,8\%$, $***p < 0,001$), nieaktywnymi wobec modulacji wydzielania cytokin prozapalnych. Zaskakująco napar z liści jesionu nie wykazywał znamiennej statystycznie aktywności wobec wzrostu ekspresji receptora dla IL-10.



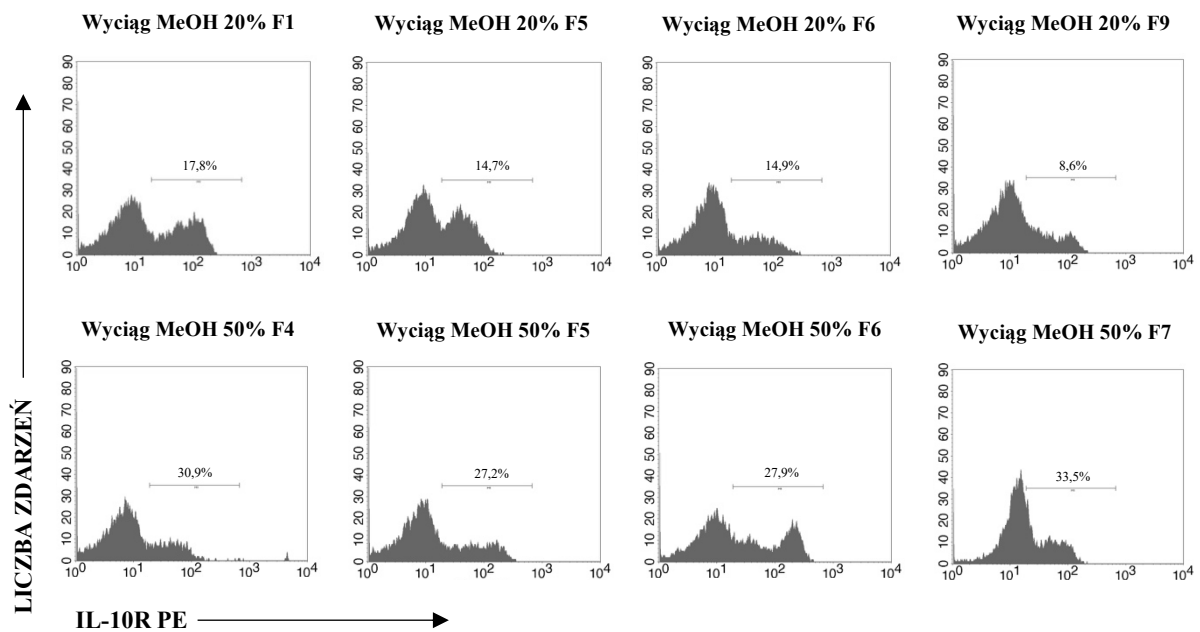
Rycina 28: Ekspresja receptora IL-10R w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z naparem, frakcjami i subfrakcjami z liści jesionu wyniosłego (50 µg/ml). Wyniki przedstawiono jako procent ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią ± SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 µM. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; $***p < 0,001$. KNST – kontrola niestymulowana.

GRUPY KONTROLNE

WYCIĄGI PODSTAWOWE



SUBFRAKCJE



Rycina 29: Ekspresja receptora IL-10R po 24-godzinnej inkubacji z naparem, frakcjami oraz najaktywniejszych subfrakcji wyciągów 20% i 50% z liści jesionu wyniosłego (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$); reprezentatywne histogramy. Marker M1 wyznacza zakres ekspresji receptora, wyznaczony względem wartości dla kontroli stymulowanej LPS (KST). KNST – kontrola niestymulowana.

4.5. Ocena właściwości przeciwzapalnych związków z grupy sekoirydoidów, fenyloetanoloidów, glikozydów fenylopropanoidowych oraz flawonoidów w modelu monocytów/makrofagów PBMC

Z uwagi na obiecujące wyniki dotyczące aktywności przeciwzapalnej wyciągów przygotowanych z liści roślin z rodziny Oleaceae, zaprezentowane w poprzednich rozdziałach, kolejnym etapem przeprowadzonych badań była analiza aktywności przeciwzapalnej jednorodnych związków w nich dominujących. Omówienie wyników otrzymanych dla poszczególnych grup metabolitów wyspecjalizowanych zostanie przedstawione w kolejnych rozdziałach z podziałem na grupę: sekoirydoidów, fenyloetanoloidów, lignanów i ich metabolitów oraz przedstawicieli związków flawonoidowych – rutozydu (rutyny), a także glikozydów fenylopropanoidowych – syringiny.

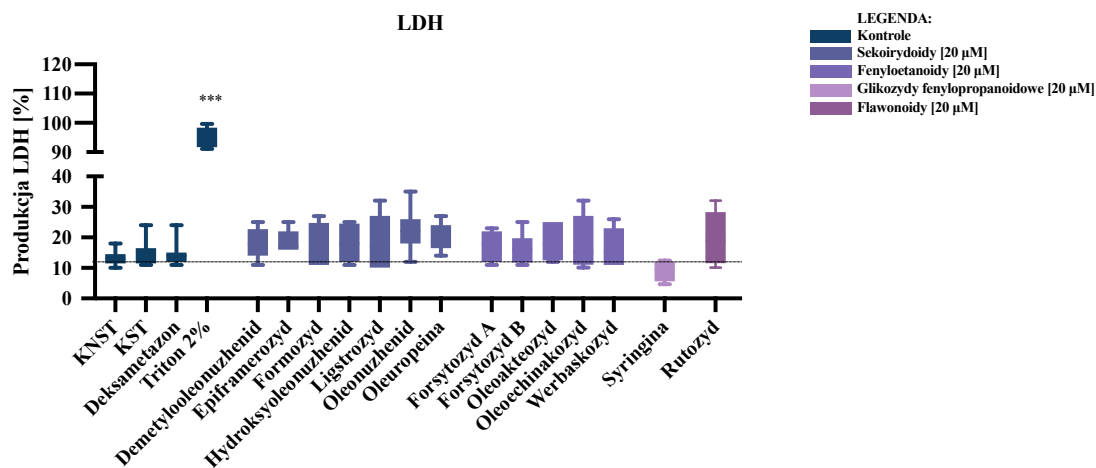
Analizę aktywności jednorodnych związków z wyżej wymienionych grup poszerzono o panel związków zidentyfikowanych również w innych roślinach (m.in. z rodziny Oleaceae), w ramach wcześniejszych analiz przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, jak podano w **tabeli 9** w **rozdziale 3.2**.

Ocenę aktywności przeciwzapalnej związków, z poszczególnych grup przeprowadzono na modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC, stymulowanych uprzednio roztworem bakteryjnego LPS.

Badania prowadzono w trzech etapach:

- I.** Ocena cytotoksyczności związków, wobec komórek monocytów/makrofagów PBMC.
- II.** Ocena wpływu związków na uwalnianie cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-6, IL-1 β , w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC.
- III.** Ocena wpływu badanych związków na ekspresję receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC.

I. Poszczególne związki w stężeniu 20 μ M nie wykazywały toksyczności w stosunku do komórek monocytów/makrofagów PBMC, co zostało określone testem kolorymetrycznym oceniającym zawartość procentową dehydrogenazy mleczanowej w badanych supernatantach komórkowych. Średnie wartości cytotoksyczności, zaprezentowane na poniższej rycinie (**rycina 30**), ocenione dla poszczególnych związków nie przekraczały 25% świadcząc o braku cytotoksyczności tych związków w przyjętym modelu komórkowym.



Rycina 30: Wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (20 μ M). Wyniki przeliczone na wartości procentowe przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max. Istotność statystyczną pomiędzy średnią wartością dla kontroli niestymulowanej (KNST- kontrola niestymulowana, linia przerywana na wykresie), a poszczególnymi próbami oszacowano testem ANOVA z testem post hoc Dunnetta, *** $p < 0,001$. KST- kontrola stymulowana z dodatkiem LPS (100 ng/ml).

II. W grupie badanych sekoirydoidów najwyższy potencjał przeciwzapalny wykazywała oleuropeina, pełniąc funkcje efektywnego inhibitora sekrecji badanych cytokin prozapalnych, w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC, stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS (100 ng/ml). Stopień inhibicji wydzielania badanych mediatorów zapalnych po inkubacji z roztworem oleuropeiny określono na poziomie, odpowiednio dla TNF- α – $36,9 \pm 6,3\%$ (*** $p < 0,001$), IL-6 – $45,6 \pm 4,7\%$ (*** $p < 0,001$), IL-1 β – $47,3 \pm 4,2\%$ (*** $p < 0,001$), w stosunku do kontroli stymulowanej – 100% wydzielania. Zbliżony potencjał hamujący sekrecję TNF- α , do poziomu $44,5 \pm 6,0\%$ (*** $p < 0,001$), IL-6 do wartości $59,2 \pm 12,1\%$ (* $p < 0,05$) oraz IL-1 β , w granicach $47,5 \pm 13,4\%$ (*** $p < 0,001$) wykazywał hydroksyoleonuzhenid. Podobne właściwości wykazywał związek o zbliżonej budowie chemicznej – oleonuzhenid, który ograniczał wydzielanie TNF- α do poziomu $51,7 \pm 5,1\%$ (*** $p < 0,001$) oraz IL-1 β – $67,0 \pm 7,0\%$ (** $p < 0,01$), w porównaniu z grupą kontrolną (stymulowaną LPS). Znamiennej statystycznie inhibicję wydzielania TNF- α zaobserwowano także po inkubacji komórek z jednym z przedstawicieli grupy sekoirydoidów, wyizolowanym z wyciągów przygotowanych z liści jesionu wyniosłego – ligstrozydem. Po inkubacji komórek z ligstrozydem, stopień wydzielania TNF- α , w badanych supernatantach komórkowych oceniono na poziomie $58,3 \pm 11,3\%$ (*** $p < 0,001$), przy wartości $65,7 \pm 12,5\%$ (** $p < 0,01$) dla IL-6, w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS (100% sekrecji). Ligstrozyd aktywnie hamował także produkcję IL-1 β , o czym świadczył stopień sekrecji tej cytokiny, oceniony na poziomie $62,5 \pm 7,3\%$ (*** $p < 0,001$).

Najefektywniejszym inhibitorem wydzielania IL-6 w grupie sekoirydoidów był epiframerozyd, obniżając poziom sekrecji tej cytokiny do wartości $30,4 \pm 8,2\%$ (**p < 0,001), w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (100% produkcji). Inkubacja komórek z roztworem epiframerozydu powodowała także znamiennej statystycznie spadek wydzielania IL-1 β , który oceniono na poziomie $66,0 \pm 10,9\%$ (*p < 0,05).

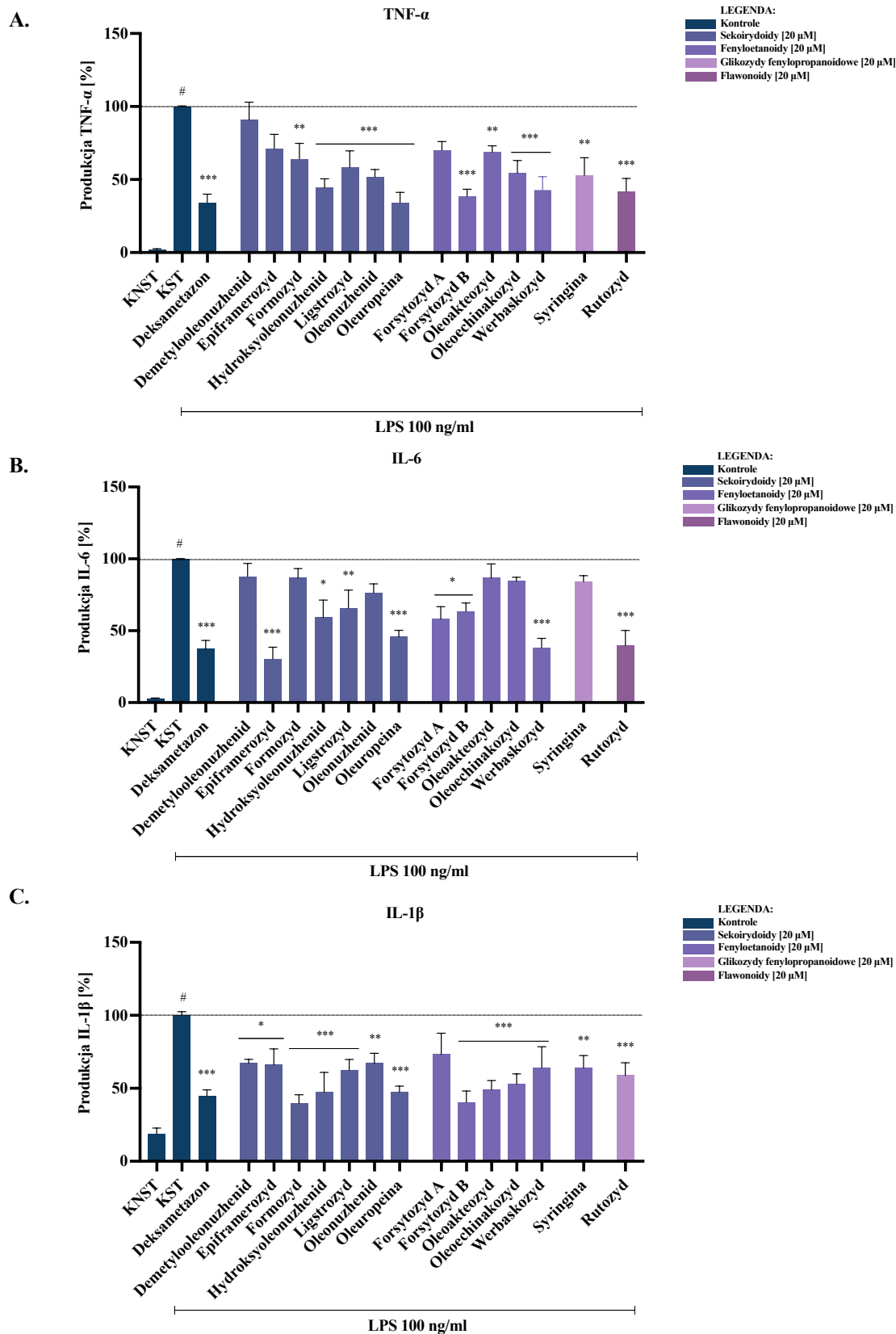
W grupie fenyloetanoidów najskuteczniejszym inhibitorem sekrecji cytokin prozapalnych był forsytozyd B hamujący wydzielanie TNF- α do poziomu $38,6 \pm 4,8\%$ (**p < 0,001), a także oleoechinakozyd i werbaskozyd, które obniżały poziom sekrecji TNF- α do wartości, odpowiednio $54,3 \pm 8,7\%$ oraz $42,8 \pm 9,2\%$ (**p < 0,001), w stosunku do kontroli stymulowanej LPS – 100% wydzielania. Znamiennej aktywność hamującą uwalnianie mediatorów zapalnych wykazywała także syringina, której zastosowanie prowadziło do zahamowania sekrecji TNF- α do poziomu $52,9 \pm 12,1\%$ (**p < 0,01), w odniesieniu do kontroli stymulowanej (100%).

Wszystkie badane związki z grupy fenyloetanoidów, z wyjątkiem forsytozydu A, znamiennej statystycznie obniżały poziom wydzielanej IL-1 β , przy najwyższej aktywności osiągniętej po inkubacji z roztworem forsytozydu B ($40,4 \pm 7,8\%$, **p < 0,001), oleoakteozydu ($50,3 \pm 6,5\%$, **p < 0,001) lub oleoechinakozydu ($52,9 \pm 7,1\%$, **p < 0,001). Znaczną aktywnością w tym obszarze wykazywała się także syringina ograniczając wydzielanie IL-1 β do wartości $63,9 \pm 8,51\%$ (**p < 0,01).

Związkiem z grupy fenyloetanoidów najsilniej obniżającym sekrecję IL-6 był werbaskozyd, który zmniejszał wydzielanie badanej cytokiny do wartości $38,1 \pm 6,5\%$ (**p < 0,001), osiągając wartości porównywalne do kontroli pozytywnej, deksametazonu ($37,2 \pm 6,1\%$, **p < 0,001). Inkubacja komórek z roztworem forsytozydu A, a także forsytozydu B również inicjowała zahamowanie wydzielania tej cytokiny w sposób znamiennej statystycznie (*p < 0,05).

W przypadku przedstawiciela grupy flawonoidów – rutozydu zaobserwowano wysoką skuteczność związku w hamowaniu wydzielania wszystkich trzech badanych mediatorów zapalnych: TNF- α ($42,0 \pm 8,8\%$, **p < 0,001), IL-6 ($39,6 \pm 10,6\%$, **p < 0,001) oraz IL-1 β ($58,5 \pm 8,7\%$, **p < 0,001).

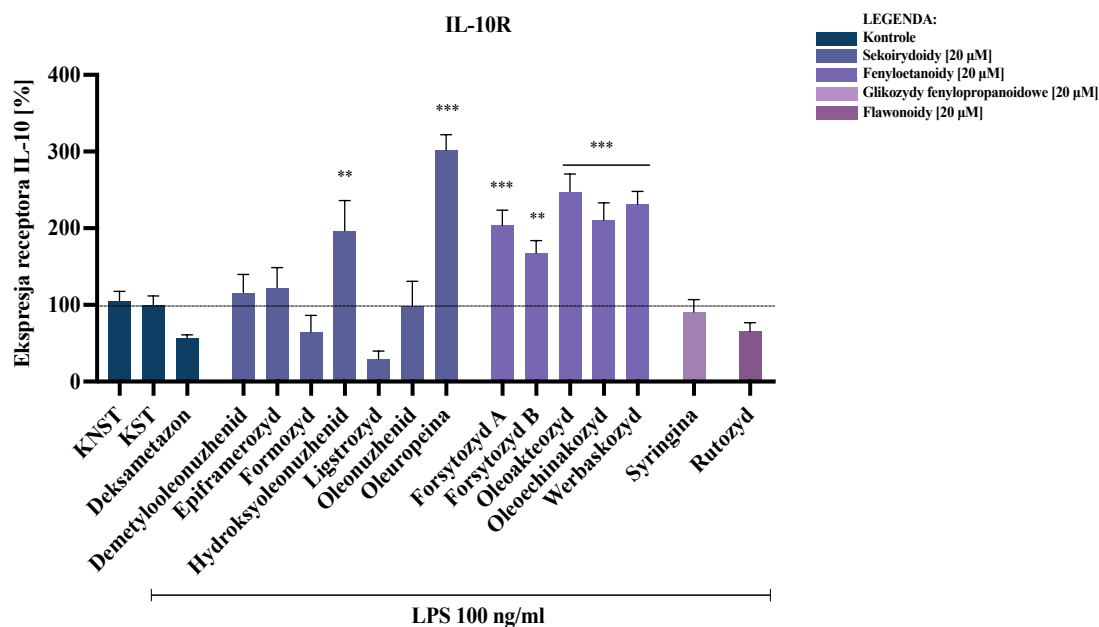
Analizę wpływu badanych związków na stopień wydzielania TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β zaprezentowano na poniższych wykresach słupkowych (**rycina 31 A, B, C**).



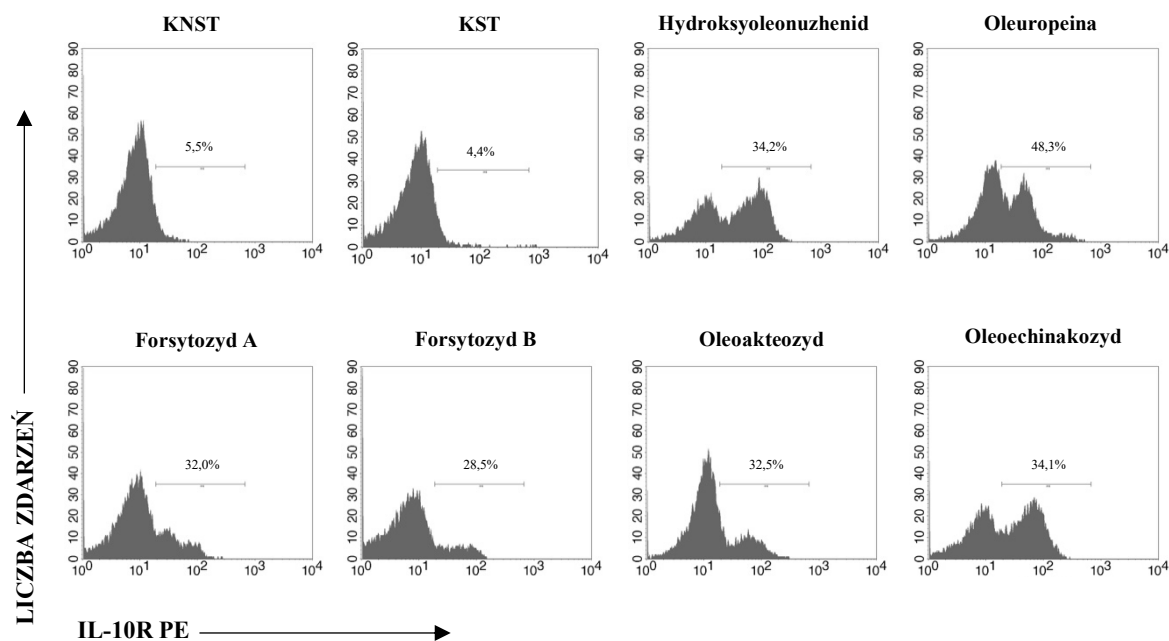
Rycina 31: Sekrecja **A.** TNF- α , **B.** IL-6 oraz **C.** IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makroforagów PBMC, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (20 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

III. Spośród 7 badanych związków z grupy sekoirydoidów jedynie 2 z nich wykazywały wpływ na poziom ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni stymulowanych LPS komórek monocytów/makrofagów PBMC. Związkami znamienne statystycznie aktywującymi ekspresję IL-10 był hydroksyoleonuzhenid oraz oleuropeina, dla których wartości ekspresji wynosiły odpowiednio $197,0 \pm 13,9\%$ (** $p < 0,01$) oraz $302,0 \pm 19,8\%$ (***) $p < 0,001$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS (100% ekspresji).

Analiza aktywności związków z grupy fenyloetanoidów pozwoliła na obserwację wzrostu ekspresji badanego receptora po inkubacji komórek monocytów/makrofagów PBMC, z każdym z 5 badanych związków, co zostało zaprezentowane na poniższych rycinach (**rycina 32, 33**). Najwyższy wzrost ekspresji badanego receptora zaobserwowano po zastosowaniu oleoakteozydu, wyizolowanego z liści jesionu wyniosłego, dla którego oceniona wartość ekspresji wynosiła $248,0 \pm 23,0\%$, *** $p < 0,001$ (w stosunku do kontroli stymulowanej LPS - 100% ekspresji). Podobny wzrost ekspresji IL-10R zaobserwowano także w przyjętym modelu *in vitro* pod wpływem aktywności forsytozydu A ($204,0 \pm 19,8\%$), oleoechinakozydu ($210,0 \pm 22,6\%$) oraz werbaskozydu ($231,0 \pm 16,7\%$) (***) $p < 0,001$). Jedyne przedstawiciel związków z grupy flawonoidów – rutozyd, którego aktywność oceniono w ramach niniejszej rozprawy nie wykazywał znamiennego wpływu wobec zmian ekspresji IL-10R.



Rycina 32: Ekspresja receptora IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (20 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS (KST, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. KNST- kontrola niestymulowana.



Rycina 33: Ekspresja receptora IL-10R na powierzchni komórek PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (20 μ M); reprezentatywne histogramy. Marker M1 wyznacza poziom ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS. KNST – kontrola niestymulowana, KST – kontrola stymulowana LPS.

4.6. Ocena właściwości przeciwzapalnych związków z grupy lignanów w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC

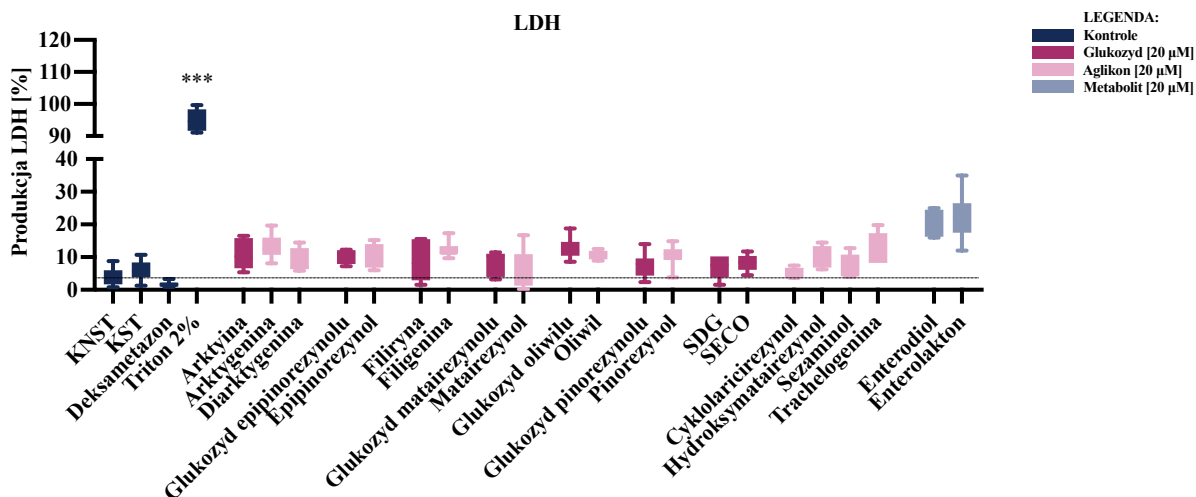
Szczególną uwagę w toku realizacji niniejszej pracy poświęcono najsłabiej do tej pory scharakteryzowanej grupie związków polifenolowych, lignanom. Z uwagi na ich ograniczone występowanie (do surowców roślinnych z rodziny Oleaceae i kilku innych rodzin), podjęto próbę dokładnego scharakteryzowania właściwości przeciwzapalnych związków z tej grupy. Ocenę aktywności biologicznej lignanów przeprowadzono na modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC, stymulowanych uprzednio roztworem bakteryjnego LPS.

Dodatkowym uzupełnieniem charakterystyki panelu była ocena aktywności dwóch metabolitów jelitowych lignanów (enterolignanów), powstających na drodze transformacji związków lignanowych w ludzkim przewodzie pokarmowym pod wpływem mikrobioty jelitowej.

Badania dla związków lignanowych i ich metabolitów jelitowych prowadzono z podziałem na następujące etapy:

- I.** Ocena cytotoksyczności lignanów i ich metabolitów (20 μM), wobec komórek monocytów/makrofagów PBMC.
- II.** Ocena wpływu lignanów i ich metabolitów (20 μM) na stopień sekrecji cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β .
- III.** Ocena wpływu lignanów i ich metabolitów na ekspresję receptora IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC.

I. Poszczególne związki w stężeniu 20 μM nie wykazywały toksyczności w stosunku do komórek monocytów/makrofagów PBMC, co zostało określone testem kolorymetrycznym oceniającym zawartość procentową dehydrogenazy mleczanowej w badanych supernatantach komórkowych, po 24-godzinnej inkubacji komórek z badanymi związkami. Średnie wartości produkcji LDH ocenione dla poszczególnych związków nie przekraczały 25% produkcji enzymu. Wartości uzyskane dla poszczególnych związków zaprezentowano na poniższej rycinie (**rycina 34**).



Rycina 34: Wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi lignanami (20 µM). Wyniki przeliczone na wartości procentowe przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max. Istotność statystyczną pomiędzy średnią wartością dla kontroli niestymulowanej (KNST- kontrola niestymulowana, linia przerywana na wykresie), a poszczególnymi próbami oszacowano testem ANOVA z testem post hoc Dunnetta, ***p < 0,001. KST - kontrola stymulowana z dodatkiem LPS (100 ng/ml).

II. Badane związki z grupy lignanów wykazywały znamienne hamujące działanie na wydzielanie cytokin prozapalnych w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC stymulowanych roztworem LPS (100 ng/ml).

Szczególną efektywnością działania odznaczały się 4 grupy związków: **arktyina, arktygenina i diarktygenina, filiryna i filigenina, glukozyd pinorezynolu oraz glukozyd matairezynolu** i odpowiednie im **aglikony**.

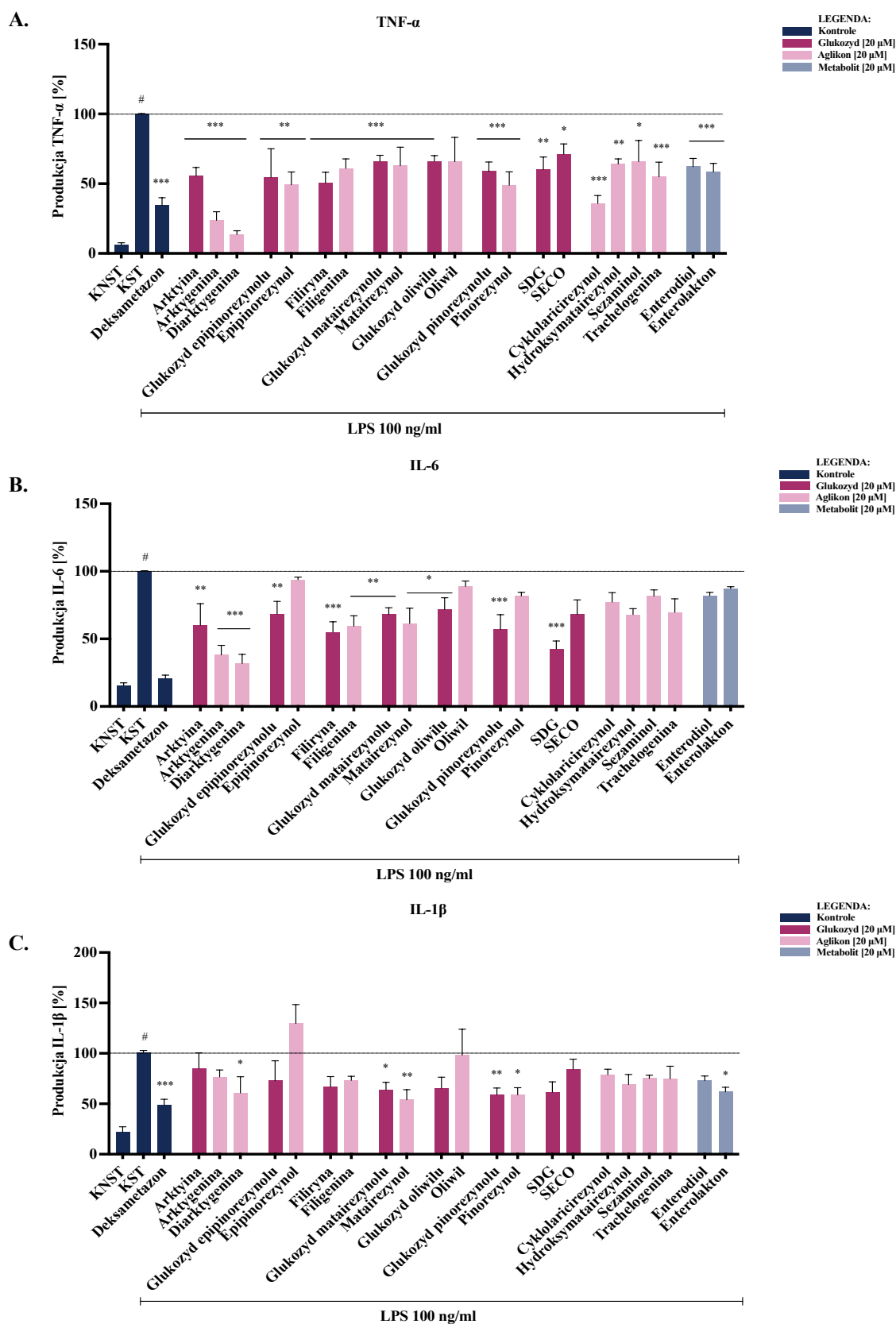
Najwyższą aktywność ograniczającą wydzielanie TNF-α zaobserwowano dla arktygeniny oraz diarktygeniny hamujących wydzielanie badanej cytokiny do wartości zbliżonych do osiągniętych po zastosowaniu deksametazonu ($34,3 \pm 5,6\%$, ***p < 0,001), wynoszących odpowiednio: $23,8 \pm 6,1\%$ oraz $13,6 \pm 2,7\%$ (***p < 0,001), w odniesieniu do kontroli stymulowanej – 100% wydzielania. Zbliżoną aktywnością wykazał się także cyklolaricirezynol, hamujący sekrecję TNF-α do poziomu $35,8 \pm 5,65\%$ (***p < 0,001). Nieco mniejszą skutecznością odznaczał się z kolei glukozyd pinorezynolu wraz z odpowiednim mu aglikonem – pinorezynolem, które hamowały sekrecję TNF-α odpowiednio do wartości $58,8 \pm 7,8\%$ oraz $48,9 \pm 9,8\%$ (***p < 0,001). Warto również podkreślić wysoką efektywność działania filiryny i filigeniny, znamienne ograniczających sekrecję TNF-α i IL-6 do poziomów nieprzekraczających 60% produkcji, w odniesieniu do 100% przyjętych dla kontroli stymulowanej LPS. Spośród badanego panelu związków z grupy lignanów jedynie aktywność oliwili oraz sezaminolu okazała się nieznamienne statystycznie w przyjętym modelu badawczym, wobec hamowania wydzielania TNF-α.

Analiza wpływu badanych lignanów na uwalnianie innych mediatorów zapalnych wskazywała na wyraźną inhibicję stopnia sekrecji IL-6 pod wpływem działania arktigeniny oraz diarktygeniny hamujących wydzielanie IL-6 odpowiednio do wartości: $38,1 \pm 7,1\%$ i $31,8 \pm 6,8\%$ ($***p < 0,001$). Znamiennym działaniem wykazał się także glikozyd pinorezynolu ($56,9 \pm 11,0\%$, $***p < 0,001$), oraz diglukozyd sekoizolaricirezynolu ($42,7 \pm 5,8\%$, $***p < 0,001$).

W przypadku wpływu lignanów na inhibicję wydzielania IL-1 β jedynie 6 spośród 21 badanych związków wykazywało znamienny statystycznie wpływ na sekrecję badanej cytokiny. Największą efektywnością hamowania produkcji IL-1 β wykazał się matairezynol ($51,0 \pm 10,0\%$, $**p < 0,01$), przy nieco mniejszej aktywności obserwowanej dla jego formy glikozydowej ($63,7 \pm 7,7\%$, $*p < 0,05$). Ponadto pinorezynol, zarówno w formie glikozydowej, jak również w formie aglikonu wykazywał znamienny wpływ ograniczający uwalnianie IL-1 β , osiągając wartości odpowiednio $59,0 \pm 6,7\%$ ($**p < 0,01$) oraz $58,7 \pm 7,1\%$ ($*p < 0,05$). Podobne wartości wykazano także dla diarktygeniny, hamującej produkcję IL-1 β do wartości $60,7 \pm 16,1\%$ ($*p < 0,05$) w przyjętym modelu badań *in vitro*.

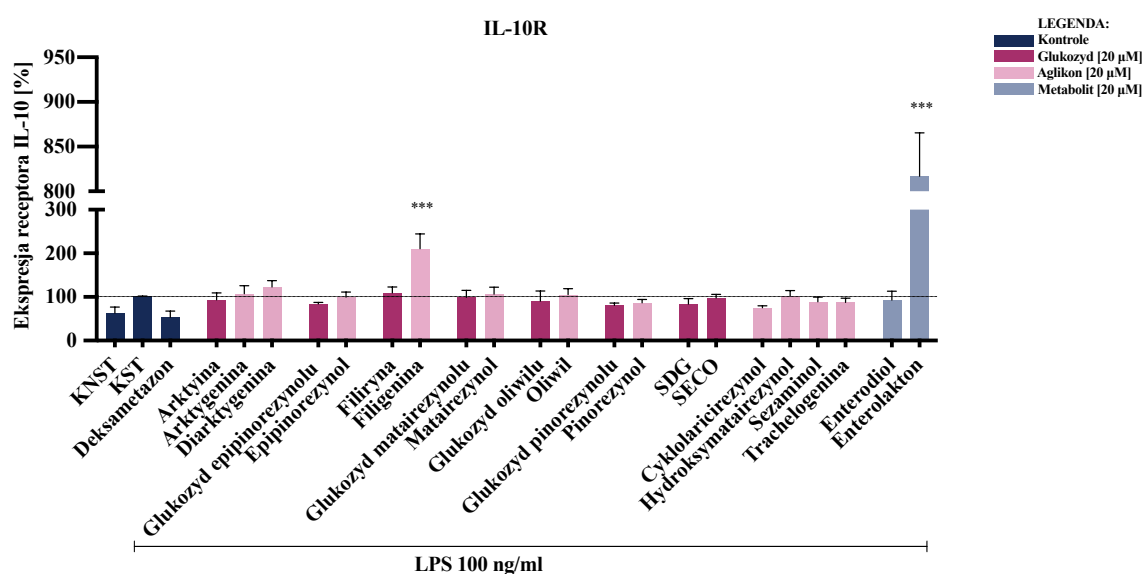
Analiza aktywności badanych enterolignanów wskazywała na ich istotny potencjał hamujący wydzielanie mediatorów zapalnych w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC. Zarówno enterodiol, jak również enterolakton, badane w stężeniu 20 μ M, znamiennie statystycznie hamowały uwalnianie TNF- α , do poziomów odpowiednio $62,2 \pm 5,9\%$ oraz $58,4 \pm 6,2\%$ ($***p < 0,001$). Efektywność hamowania wydzielania IL-6 w przypadku obu badanych metabolitów plasowała się na podobnym poziomie ($81,8 \pm 2,5$ vs. $87,3 \pm 1,3\%$), jednak przy braku znamienności statystycznej dla obu badanych metabolitów. Wpływu enterolignanów na procesy sekrecji IL-1 β w badanym modelu komórkowym był znamienny statystycznie dla enterolaktonu, hamującego wydzielanie badanej cytokiny do poziomu $63,9 \pm 7,0\%$ ($*p < 0,05$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS (100% wydzielania).

Analizę wpływu lignanów i ich metabolitów na sekrecję TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β zaprezentowano na poniższych rycinach (**rycina 35 A, B, C**).



Rycina 35: Sekrecja **A.** TNF- α , **B.** IL-6 **C.** IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi lignanami (20 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS (KST, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), *p < 0,05; p** < 0,01; ***p < 0,001.

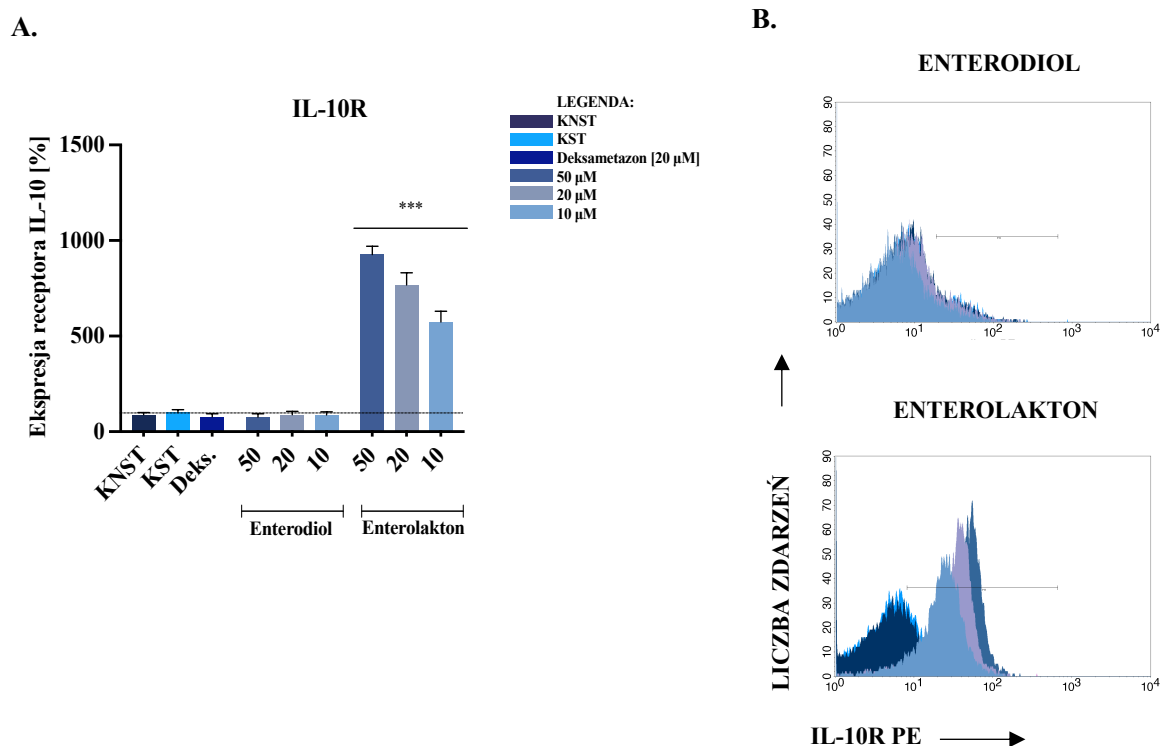
III. Analiza wpływu lignanów (20 μM) na stopień ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC wykazała brak znamienego wpływu 19 z 21 badanych związków lignanowych oraz ich metabolitów wobec czynnika badanego, co zostało zaprezentowane na poniższej rycinie (rycina 36**). Jednym z dwóch związków stymulujących wzrost ekspresji receptora IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC była filigenina. Wzrost ekspresji IL-10R poprzedzony 24-godziną inkubacją komórek z badanym lignanem, oceniono na poziomie $211,0 \pm 33,8\%$ (** $p < 0,001$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej (100% ekspresji). Pozytywny wpływ na wzrost ekspresji receptora dla IL-10, zaobserwowano także po inkubacji komórek z końcowym metabolitem jelitowym lignanów – enterolaktonem, co było podstawą do dalszych analiz, w szerszym zakresie badanych stężeń.**



Rycina 36: Ekspresja receptora IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi lignanami (20 μM). Wyniki przedstawiono jako procent ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS (KST, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μM . Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; *** $p < 0,001$. KNST- kontrola niestymulowana.

Analiza wpływu badanych metabolitów na procesy ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC wykazała zależny od stężenia, pozytywny wpływ enterolaktonu, (przy całkowitym braku wpływu enterodiolu przedstawionego w ramach porównania aktywności obu związków) na wzrost ekspresji badanego receptora. Najwyższy zaobserwowany wzrost ekspresji zanotowano dla związku badanego w stężeniu 50 μM , przy średniej wartości ekspresji dla tego stężenia wynoszącej aż $927,0 \pm 43,7\%$ (** $p < 0,001$), w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (100% ekspresji).

Średnie wartości zaobserwowane dla pozostałych badanych stężeń wynosiły odpowiednio: dla 20 μM – $769,0 \pm 63,4\%$ oraz dla 10 μM – $575,4 \pm 55,8\%$ (** $p < 0,001$). Reprezentatywne histogramy oraz wykresy słupkowe prezentujące wpływ badanych metabolitów jelitowych na stopień ekspresji IL-10R zaprezentowano na poniższych rycinach (rycina 37 A, B).



Rycina 37: **A.** Ekspresja receptora IL-10R na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi enterolignanami. Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μM . Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; ** $p < 0,001$. **B.** Reprezentatywne histogramy. Marker M1 wyznacza poziom ekspresji względem kontroli stymulowanej LPS. Kolory obszarów odpowiadających poszczególnym stężeniom związku badanego oraz wartości kontrolnych odpowiadają kolorystyce zaprezentowanej na wykresie słupkowym oraz legendzie z punktu **A.**

4.7. Ocena właściwości przeciwzapalnych związków z grupy lignanów, w modelu komórek makrofagów linii THP-1

W celu identyfikacji molekularnych mechanizmów działania badanych związków z grupy lignanów, modelem badawczym zastosowanym w kolejnych etapach były komórki linii THP-1 (komórki krwi obwodowej pochodzące od pacjentów z ostrą białaczką monocytarną). Na podstawie wstępnych wyników uzyskanych z doświadczeń na komórkach prawidłowych - monocytach/makrofagach PBMC, makrofagi linii THP-1, stymulowane roztworem bakteryjnego LPS, poddano działaniu związków z grupy lignanów w szerszym zakresie badanych stężeń – 50, 20, 10 μM .

Badania prowadzono z podziałem na następujące etapy:

- I. Ocena cytotoksyczności lignanów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, z zastosowaniem metody barwienia komórek jodkiem propidyny (PI).
- II. Ocena wpływu lignanów na aktywność metaboliczną komórek (test MTT).
- III. Ocena wpływu badanych związków na wydzielanie cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-6 oraz przeciwzapalnych: IL-10, a także chemokiny MCP-1.

I. i II. Badane lignany nie wykazywały istotnej statystycznie cytotoksyczności wobec komórek makrofagów. Zarówno w teście oceniającym wpływ związków na aktywność metaboliczną komórek (MTT) (**rycina 38**), jak również w cytometrycznym pomiarze oceniającym procentową zawartość komórek znakowanych jodkiem propidyny (dane nie pokazane) nie wykazano statystycznie znamiennego wpływu związków z grupy lignanów na wzrost śmiertelności komórek, w porównaniu z kontrolą niestymulowaną (KNST) po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami/czynnikiem stymulującym (LPS 10 ng/ml).

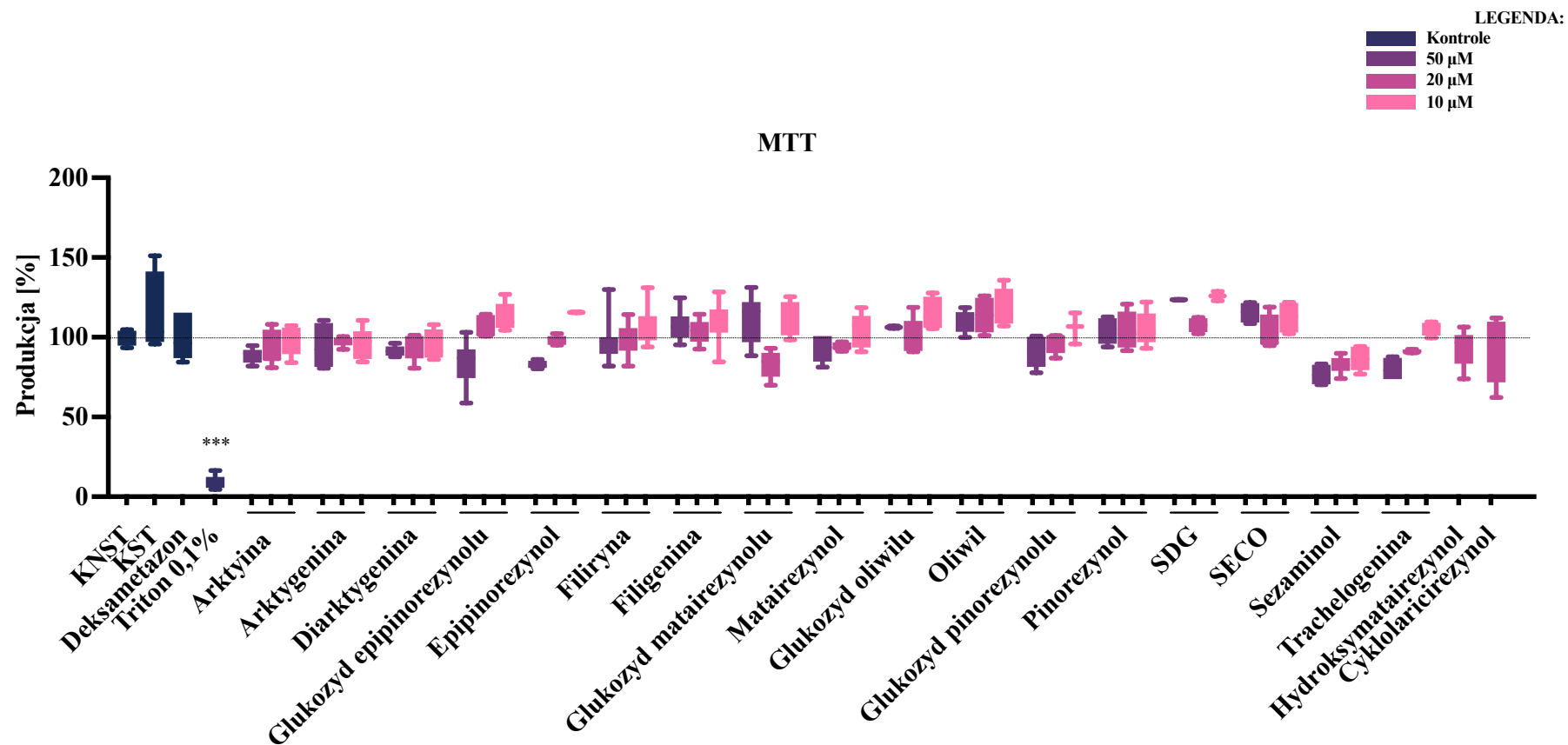
III. Analiza wpływu badanych związków z grupy lignanów na wydzielanie charakterystycznych dla komórek makrofagów czynników prozapalnych tj. TNF- α oraz IL-6, wykazała znamienne statystycznie spadek sekrecji badanych mediatorów, po inkubacji z większością badanych związków. Najaktywniejszym związkiem hamującym sekrecję TNF- α , w modelu stymulowanych LPS komórek makrofagów, w trzech badanych stężeniach (50, 20, 10 μM) był matairezynol (aglikon), powodujący spadek wydzielania czynnika martwicy nowotworów do wartości odpowiednio: 50 μM : $10,8 \pm 2,3\%$; 20 μM : $29,1 \pm 11,4\%$; 10 μM : $49,1 \pm 5,2\%$ (***) $p < 0,001$), w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (100% wydzielania). Równie silnym inhibitorem okazał się także glukozyd matairezynolu, dla którego wyznaczono średnie wartości procentowej produkcji TNF- α : 50 μM : $32,7 \pm 10,9\%$ (***) $p <$

0,001); 20 μ M: $59,7 \pm 7,7\%$ (**p < 0,01); 10 μ M: $42,8 \pm 15,6\%$ (**p < 0,001). Wysoką efektywnością działania hamującego wydzielanie TNF- α wykazał się także pinorezynol (zarówno aglikon jak i glukozyd). Z kolei w przypadku inkubacji komórek z roztworami arktyny, arktyniny, glukozydu epipinorezynolu, filiryny, oliwilo, SDG czy sezaminolu najsilniejszą inhibicję produkcji TNF- α zaobserwowano dla najwyższych badanych stężeń tj. 50 i 20 μ M.

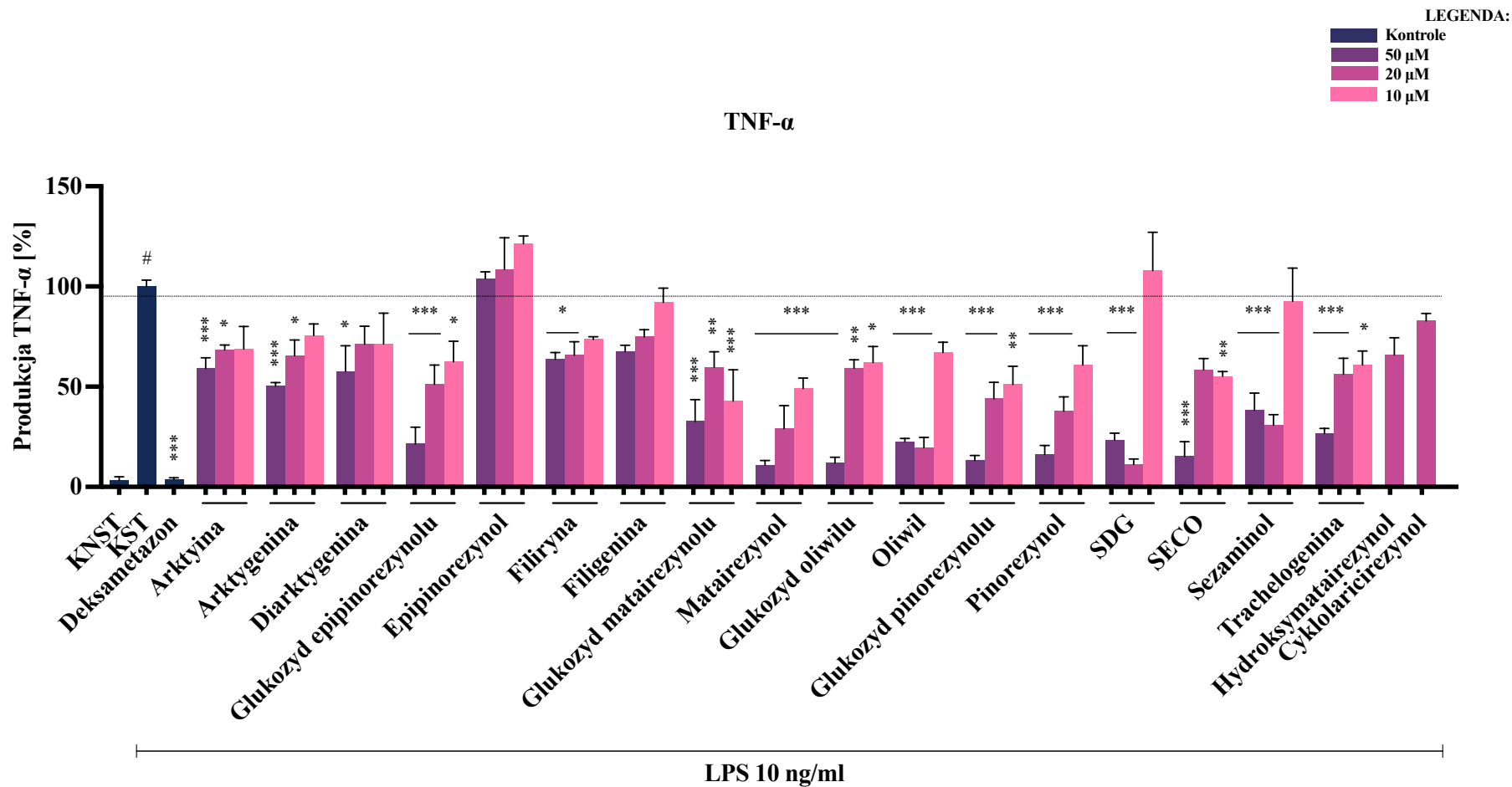
W przypadku wpływu na sekrecję IL-6 w badanym modelu komórkowym, najsilniejszymi inhibitorami produkcji tej cytokiny, we wszystkich badanych stężeniach była arktyna, arktynina, diarktygenina, filiryna, filigenina, glukozyd oliwilo oraz pinorezynol. Wyraźnym potencjałem hamującym wydzielanie tej cytokiny odznaczał się także glukozyd pinorezynolu (średnie wartości sekrecji dla stężenia 50 μ M: $20,5 \pm 3,1\%$, 20 μ M: $40,8 \pm 6,5\%$; ** p < 0,01), sezaminol (średnie wartości sekrecji dla stężenia 50 μ M: $10,8 \pm 0,2\%$, 20 μ M: $45,1 \pm 6,5\%$, ***p < 0,001) oraz trachelogenina (średnie wartości stopnia wydzielania dla stężenia 50 μ M: $21,5 \pm 2,8\%$, 20 μ M: $55,3 \pm 4,0\%$, ***p < 0,001).

Ciekawą obserwacją jest również wpływ 6 spośród 20 badanych związków na procesy uwalniania przeciwwzpalnej IL-10 w komórkach makrofagów stymulowanych LPS (10 ng/ml). Związkiem stymulującym wydzielanie IL-10 we wszystkich trzech badanych stężeniach była trachelogenina. Średnia sekrecja IL-10 po zastosowaniu trachelogeniny wynosiła: dla stężenia 50 μ M: $422,0 \pm 5,63\%$, dla stężenia 20 μ M: $378,0 \pm 4,8\%$, dla stężenia 10 μ M: $359,0 \pm 5,8\%$ (**p < 0,01). Znaczącą stymulacją wydzielania IL-10 cechowała się także arktyna, arktynina i diarktygenina. Wzrost sekrecji IL-10 po 24-godzinnej inkubacji komórek z roztworem arktyny (50 μ M) wynosił $495,0 \pm 6,1\%$ (**p < 0,001), przy wartości $460,0 \pm 7,1\%$ (**p < 0,001) dla arktyniny (50 μ M), oraz $1011,0 \pm 24,7\%$ (**p < 0,001) dla diarktygeniny (50 μ M). Związkami stymulującymi wydzielanie IL-10 były także matairezynol oraz pinorezynol w najwyższym badanym stężeniu (50 μ M), dla których wartości produkcji IL-10 wynosiły odpowiednio $657,0 \pm 8,8\%$ (**p < 0,001) oraz $694,0 \pm 4,9\%$ (**p < 0,001), w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (10 ng/ml).

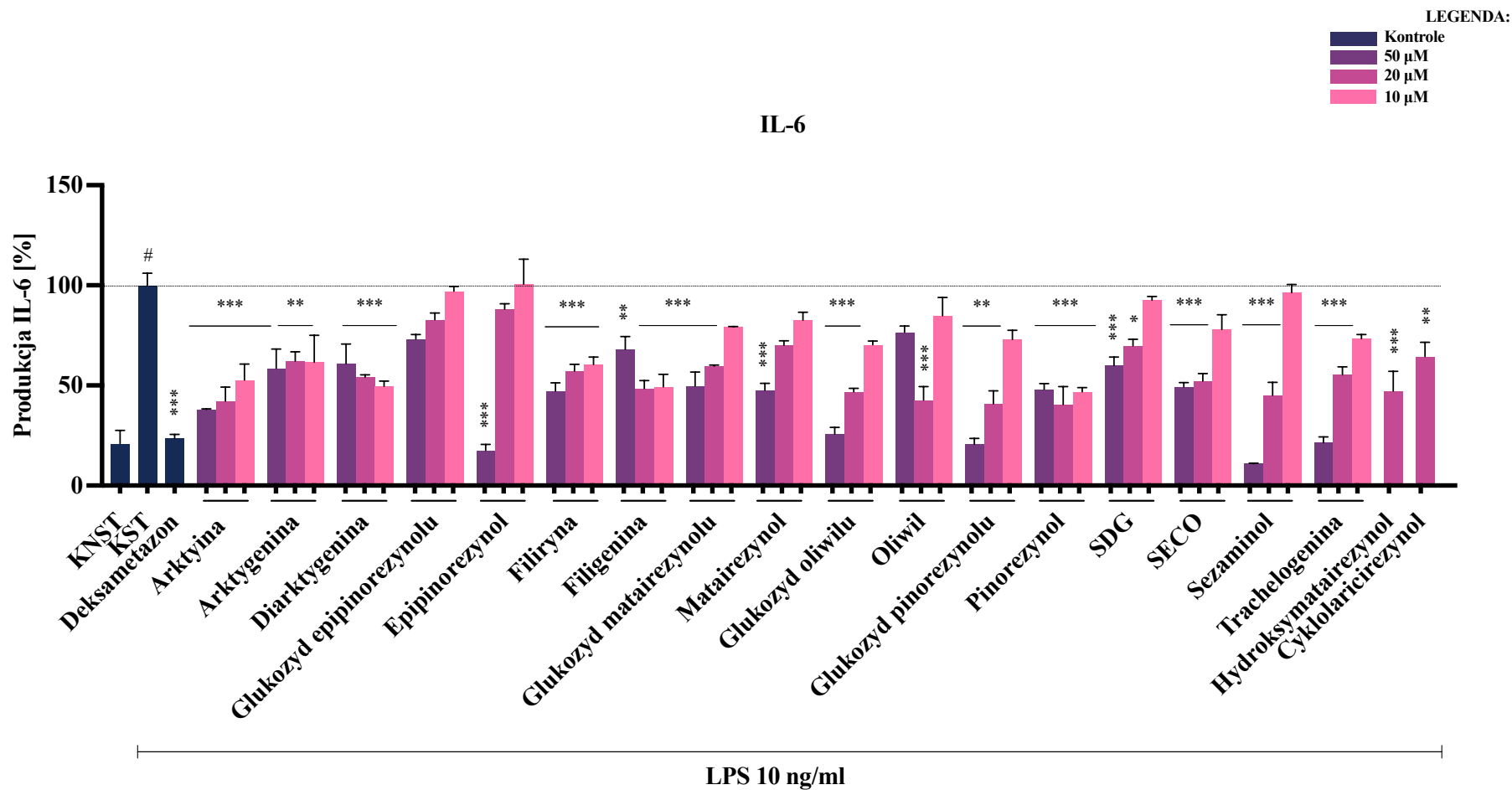
Jednie 3 spośród badanej grupy związków, nie wykazywały znamionnego wpływu na hamowanie uwalniania chemokiny MCP-1. Najwyższy poziom inhibicji uwalniania tego mediatora zaobserwowano po zastosowaniu glukozydu epipinorezynolu ($29,5 \pm 0,9\%$, ***p < 0,001), sezaminolu ($40,3 \pm 1,5\%$, ***p < 0,001) oraz trachelogeniny ($32,5 \pm 2,4$, ***p < 0,001) w najwyższym badanym stężeniu (50 μ M). Średnie wartości wydzielania poszczególnych cytokin dla wszystkich badanych lignanów zaprezentowano na poniższych rycinach prezentujących analizy ujęte w postaci wykresów słupkowych (**rycina 39-42**).



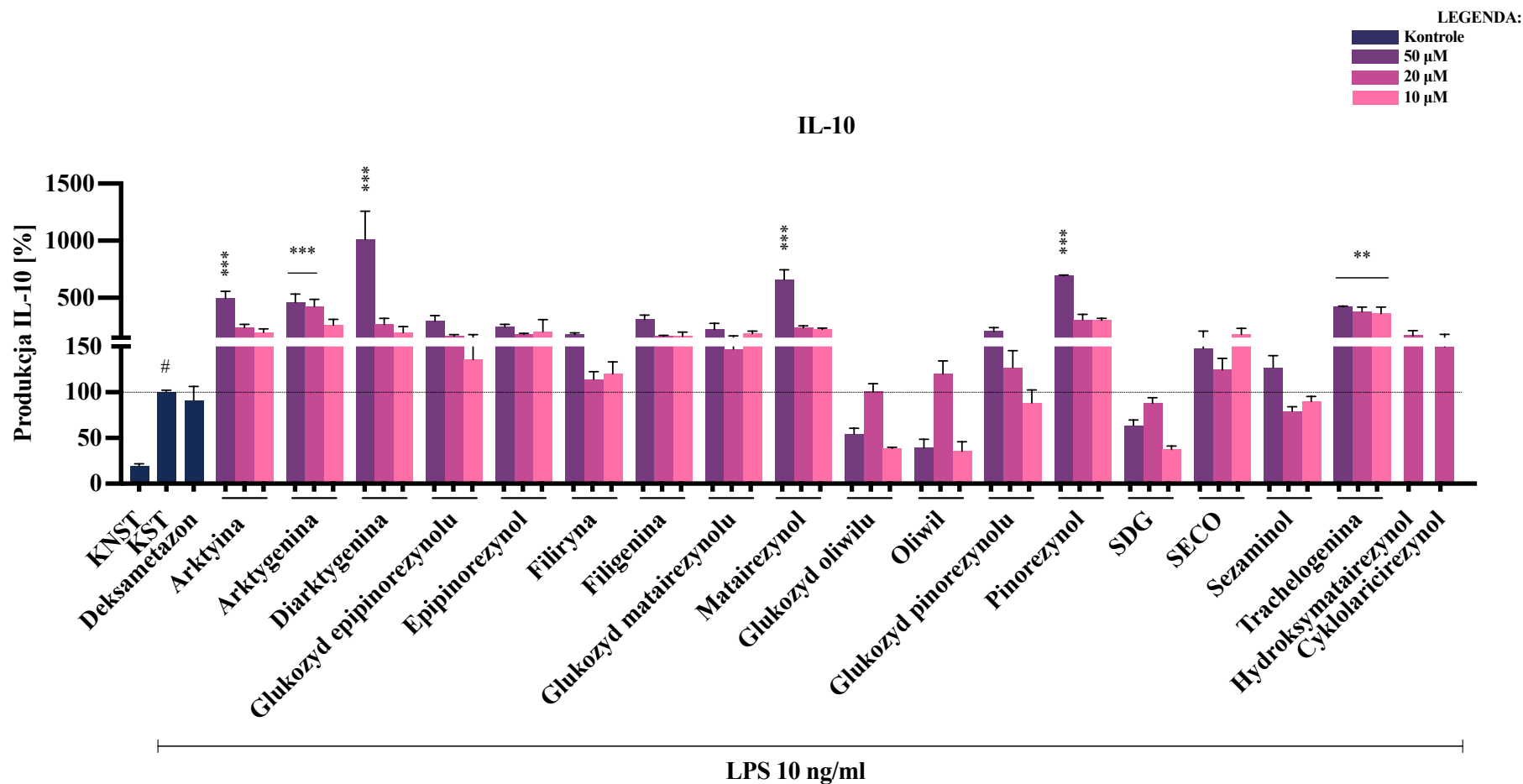
Rycina 38: Wpływ badanych związków z grupy lignanów (50, 20, 10 μ M) oraz lipopolisacharydu i deksametaznu na aktywność metaboliczną komórek makrofagów, określona z wykorzystaniem testu MTT. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max. Istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami, względem średniej wartości określonej dla kontroli niestymulowanej (KNST) oszacowano z wykorzystaniem testu ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; *** $p < 0,001$. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. KST – kontrola stymulowana LPS.



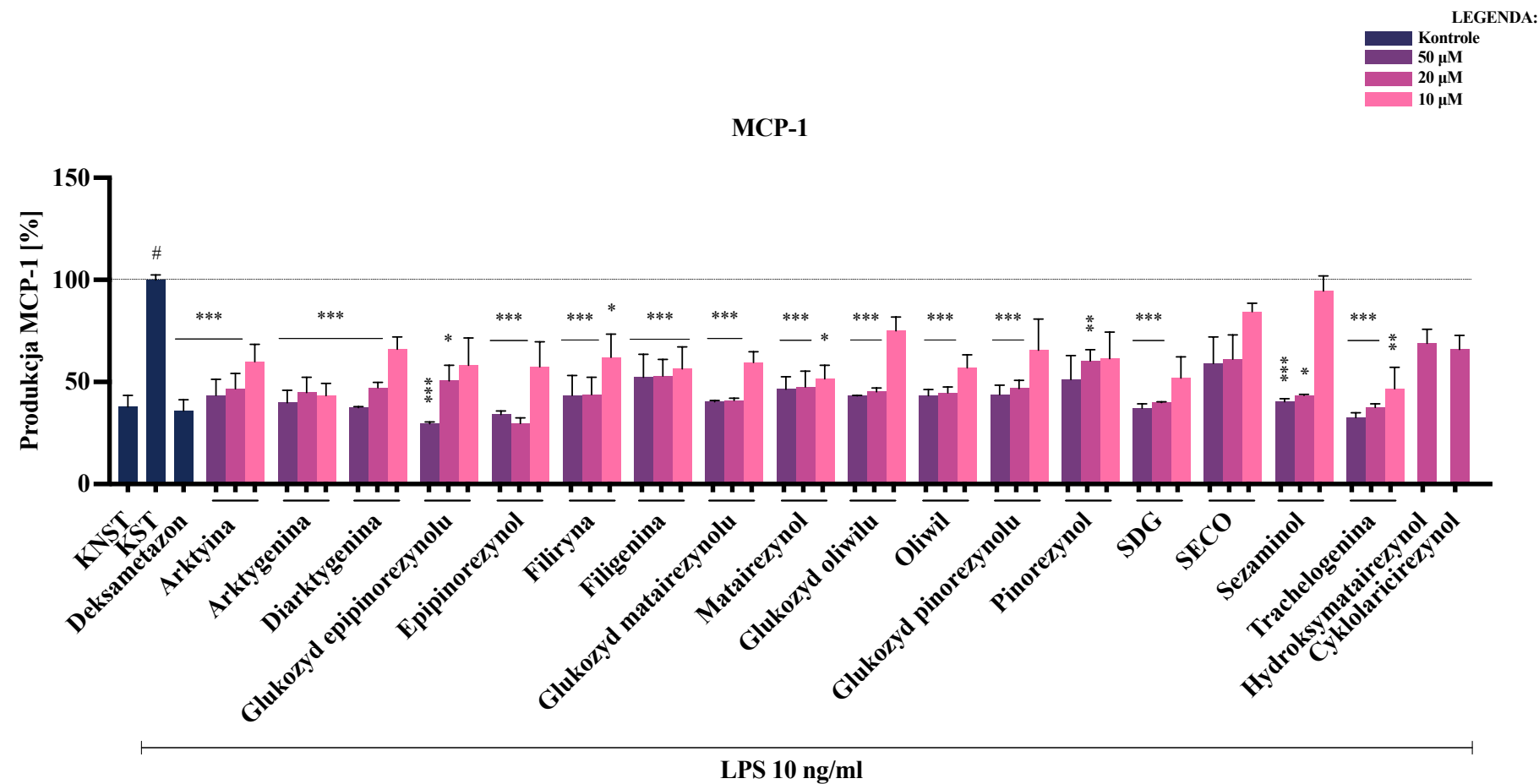
Rycina 39: Sekrecja TNF- α , przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów (50, 20, 10 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.



Rycina 40: Sekrecja IL-6, przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów (50, 20, 10 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

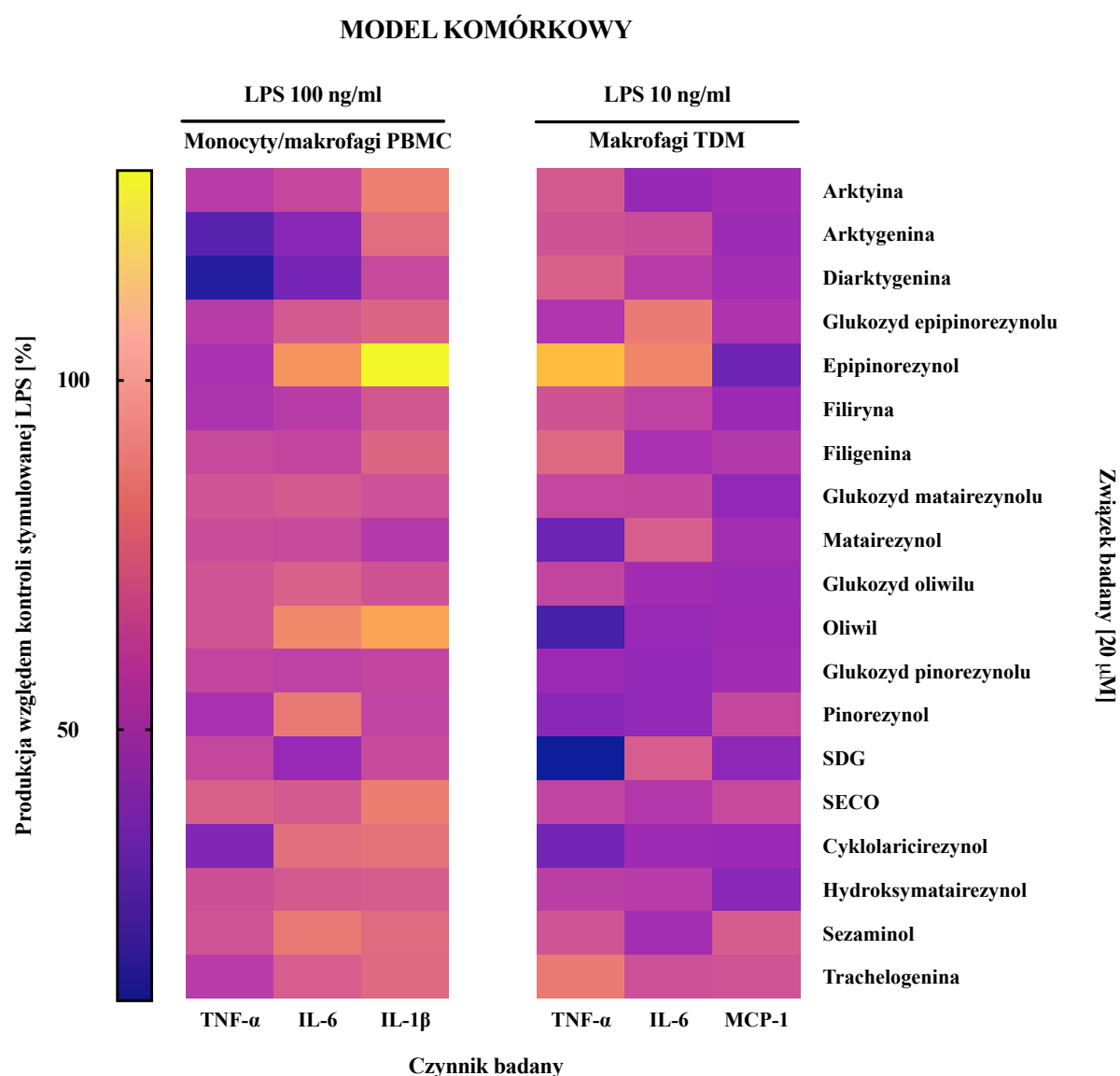


Rycina 41: Sekrecja IL-10 przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów (50, 20, 10 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie), jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,01 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); **p < 0,01; ***p < 0,001.



Rycina 42: Sekrecja MCP-1, przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów (50, 20, 10 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

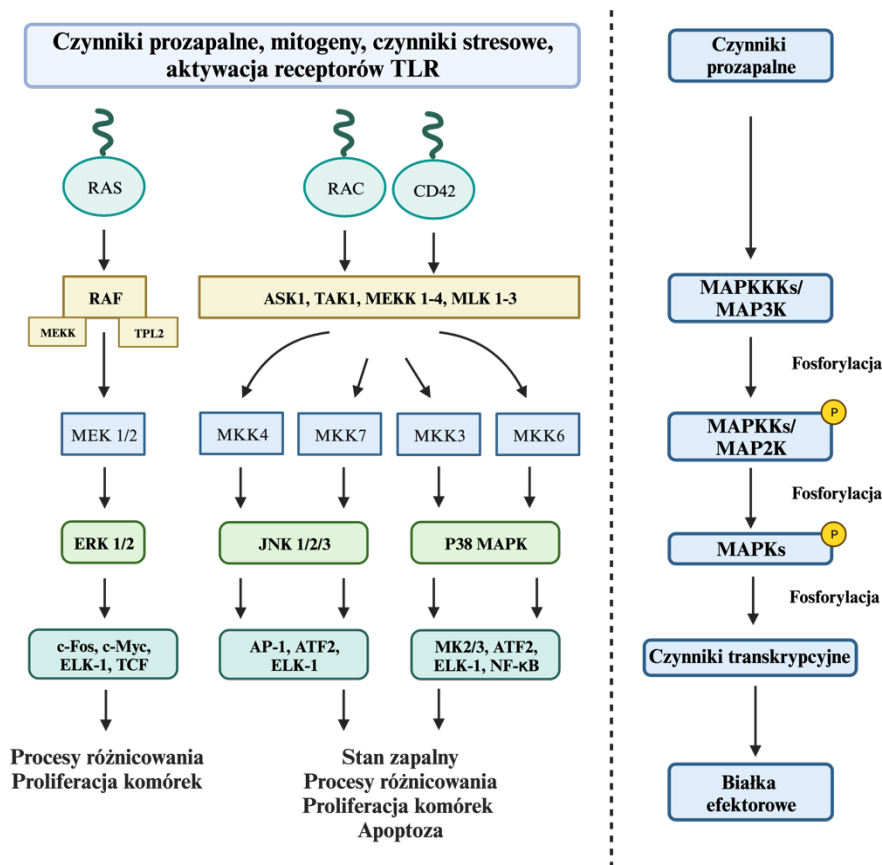
W celu podsumowania aktywności przeciwzapalnej, badanych związków z grupy lignanów, na poniższej rycinie (**rycina 43**) zaprezentowano mapę ciepła uwzględniającą aktywność 19 związków (aglikony i glikozydy) wobec modulacji wydzielania mediatorów zapalnych (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1), w dwóch modelach komórkowych, wykorzystywanych w niniejszej pracy: monocytach/makrofagach PBMC oraz makrofagach TDM. Poniższa mapa ciepła uwzględnia wyniki otrzymane dla związków badanych w stężeniu 20 μ M, względem kontroli stymulowanej LPS.



Rycina 43: Mapa ciepła prezentująca podsumowanie aktywności przeciwzapalnej badanych związków z grupy lignanów, uwzględniająca dwa zastosowane modele komórkowe: monocyty/makrofagi PBMC oraz makrofagi linii THP-1.

4.8. Ocena wpływu związków z grupy lignanów na regulację ścieżek sygnałowych MAPK

Wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne, w których uczestniczą kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK), regulują aktywność różnorodnych białek, enzymów i czynników transkrypcyjnych poprzez sygnały pochodzące z mikrośrodowiska komórkowego lub pod wpływem bodźców ze środowiska zewnętrznego (czynniki wzrostu, mitogeny, integryny, czynniki prozapalne i inne). Najbardziej znane spośród poznanego zestawu kinaz MAPK są kinazy ERK regulowane sygnałem wewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal-regulated kinases 1/2/5*, ERK1/2/5), kinazy domeny N-końcowej białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK 1–3) oraz kinazy izoformy białka p38 (α , β , γ i δ). Kinazy MAP uczestniczą w szlakach sygnalizacyjnych, opisanych w postaci trójpoziomowej kaskady kinaz, tj. enzymów kolejno aktywowanych w wyniku fosforylacji. Początkowo kinaza kinazy aktywującej MAPK (MAPKKK/MAP3K/MKKK) powoduje aktywację kinazy aktywującej MAPK (MAPKK/MAP2K/MKK), a ta fosforyluje efektorowe kinazy MAP (MAPK), co zostało zobrazowane na poniższej rycinie (**rycina 44**) [156,196].



Rycina 44: Kaskada przekazywania sygnału z udziałem kinaz MAP. Sygnalizacja została przedstawiona w postaci trójpoziomowej kaskady sygnalizacji: bodziec → MKKK/MAP3K → MKK/MAP2K → MAPK → odpowiedź na poziomie komórkowym. Opracowano na podstawie [185].

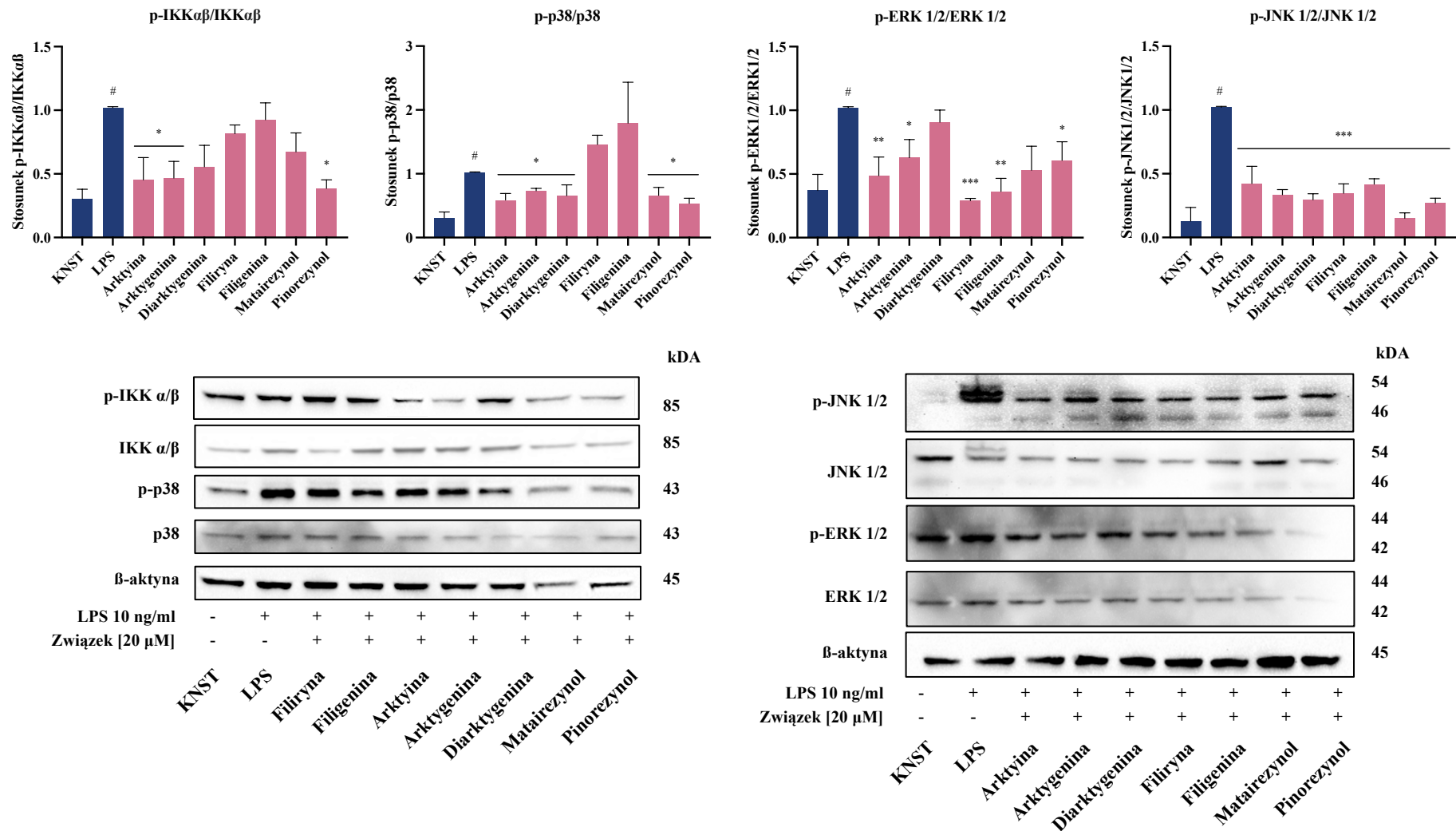
W toku prowadzonych badań szczególną uwagę poświęcono związkom z grupy **lignanów** jako potencjalnym strukturom odgrywającym istotną rolę w terapii stanów zapalnych, o niskim stopniu nasilenia. Uwzględniając wyniki powyżej przedstawionych analiz, a także mając na względzie powszechność występowania poszczególnych związków z grupy lignanów (zarówno w produktach spożywczych jak również surowcach pochodzenia roślinnego) do dalszych, szczegółowych analiz wytypowano następujące pary związków o istotnym potencjale przeciwzapalnym: **filirynę i filigeninę, arktyinę, arktygeninę i diarktygeninę, pinorezynol i matairezynol**.

Dla poszczególnych związków przeprowadzono analizę wpływu lignanów na procesy fosforylacji szlaków sygnałowych kinaz MAP m.in. p38, ERK 1/2, JNK 1/2, a także kinazy IKK α/β regulującej procesy translokacji podjednostek NF- κ B do jądra komórkowego. Określenie stopnia fosforylacji poszczególnych białek wykonano metodą western blot, co pozwoliło na przeprowadzenie analizy densytometrycznej dla poszczególnych ścieżek sygnałowych, przedstawionej w postaci wykresów słupkowych na poniższej rycinie (**rycina 45**). Otrzymane wyniki przeliczono zgodnie z zawartością białka referencyjnego, β -aktyny. Analiza porównawcza stopnia fosforylacji białek została odniesiona do kontroli z LPS (10 ng/ml).

Wszystkie z analizowanych lignanów (20 μ M) wykazywały znamienne wpływy hamujące na procesy fosforylacji ścieżki sygnałowej JNK 1/2. Najaktywniejszym związkiem w badanej grupie, wobec modulacji szlaku JNK był matairezynol ($***p < 0,001$). Wysoką aktywnością hamującą procesy fosforylacji szlaków MAPK, jak również wobec kinazy IKK wykazywała się także arktyina, która jako jedyna spośród badanych związków okazała się aktywna wobec hamowania fosforylacji białek na poziomie wszystkich czterech analizowanych ścieżek sygnałowych.

Parą inhibitorów fosforylacji białek ścieżki sygnałowej ERK 1/2 była także filiryna, wraz z odpowiednim aglikonem, filigeniną (odpowiednio: $***p < 0,001$ i $**p < 0,01$). Nieco mniejszą, ale wciąż znamiennej aktywnością wobec ekspresji białek ścieżki ERK 1/2 wykazał się także pinorezynol ($*p < 0,05$).

W przeciwieństwie do pozostałych badanych związków filiryna i filigenina stymulowały fosforylację białek ścieżki sygnałowej MAPK p38 ($p > 0,05$), co w świetle ostatnich badań może jednak wskazywać, na rodzaj mechanizmu kompensacyjnego, współuczestniczącego w aktywności przeciwzapalnej, co zostanie dokładnie omówione w rozdziale obejmującym dyskusję otrzymanych wyników.



Rycina 45: Wpływ lignanów na aktywację ścieżek sygnałowych MAPK oraz kinazy IKK α/β. Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białka p38, ERK 1/2, JNK 1/2 oraz IKK α/β, w modelu stymulowanych makrofażów (LPS, 10 ng/ml), poddanych działaniu związków z grupy lignanów (20 μM). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β-aktyna). Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.9. Ocena wpływu arktyny i arktygeniny na modulację przekazywania sygnału za pośrednictwem receptorów TLR

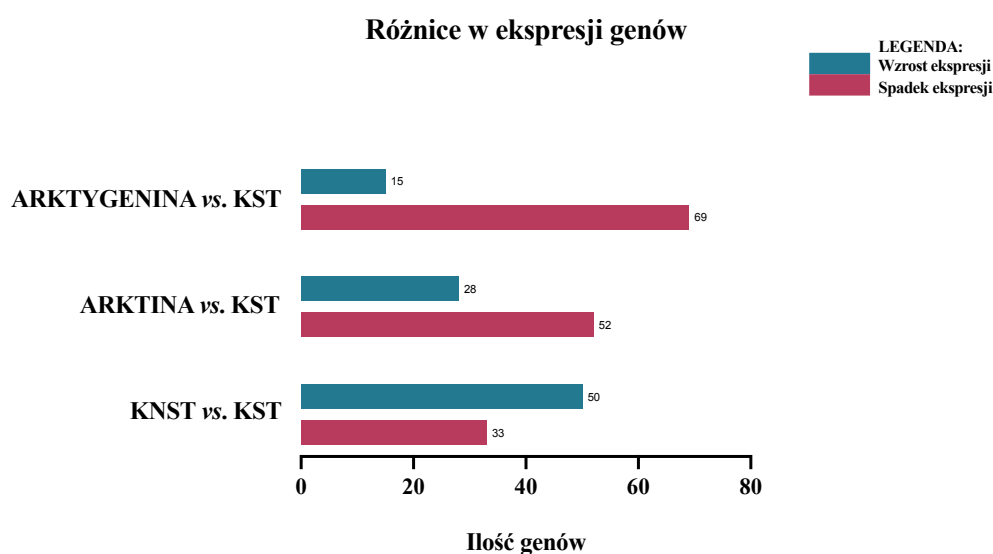
Istotna rola receptorów TLR jako pierwotnych punktów uchwytu dla bakteryjnego LPS stanowi punkt wyjścia do analizy szczegółowych mechanizmów działania przeciwwzapalnego poszczególnych związków na poziomie komórkowych ścieżek sygnałowych. W oparciu o analizę wpływu badanego panelu lignanów na modulację sekrecji mediatorów zapalnych w przyjętych modelach komórkowych, a także dostępne dane literaturowe, wskazujące na niedostateczną ilość dowodów potwierdzających molekularne mechanizmy ich aktywności [197,198], do dalszych, szczegółowych analiz wytypowano parę glukozyd – aglikon: **arktyinę i arktygeninę**.

Jak wykazano w poprzednich doniesieniach, roztwór bakteryjnego LPS, stymuluje komórki makrofagów do wzrostu ekspresji genów zaangażowanych w sygnalizację TLR (TLR4) oraz związanych z tym dalszych szlaków sygnałowych (MAPK, IKK-NF- κ B, IRF) oraz aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κ B i AP-1, inicjując produkcję kluczowych mediatorów zapalnych tj. COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 [161,199]. W celu potwierdzenia wpływu związków na regulację ekspresji genów należących do poszczególnych ścieżek sygnalizacji komórkowych, a także wyznaczenia potencjalnego kierunku dalszych badań wykonano analizę ekspresji panelu 84 genów związanych z przekaźnictwem sygnału za pośrednictwem receptorów TLR. Ocenę stopnia ekspresji genów wykonano z wykorzystaniem metody real-time PCR i mikromacierzy Array po inkubacji makrofagów z roztworami arktyny oraz arktygeniny, w modelu komórek stymulowanych roztworem LPS (10 ng/ml). Bazując na wcześniejszych doniesieniach [200] czas inkubacji z badanymi związkami poprzedzający ocenę ich wpływu na stopień ekspresji poszczególnych genów w badanym panelu był zdecydowanie krótszy (6 godzin), w porównaniu do 24- godzinnego czasu inkubacji poprzedzającego ocenę wpływu na stopień produkcji mediatorów zapalnych, oceniany np. metodą testu immunoenzymatycznego ELISA [201], [202], [203].

Omówienie otrzymanych wyników zostanie przeprowadzone w poszczególnych rozdziałach w oparciu o podział genów względem uczestnictwa w ścieżkach sygnalizacyjnych/procesach komórkowych. Wpływ badanych lignanów został zbadany dwukierunkowo, zarówno pod kątem ekspresji genów, metodą real-time PCR, jak również produkcji białek wybranych szlaków sygnalizacji MAPK i NF- κ B metodą western blot.

W celu zbadania wpływu arktyiny oraz arktygeniny na sygnalizację TLR komórki makrofagów poddano ekspozycji na roztwór bakteryjnego LPS (1 godzina), co poprzedziło dodatek badanych lignanów. Po 6-godzinnej inkubacji z roztworami związków komórki przygotowano do oznaczenia real time PCR, jak opisano w **rozdziałach 3.6.10 - 3.6.12**.

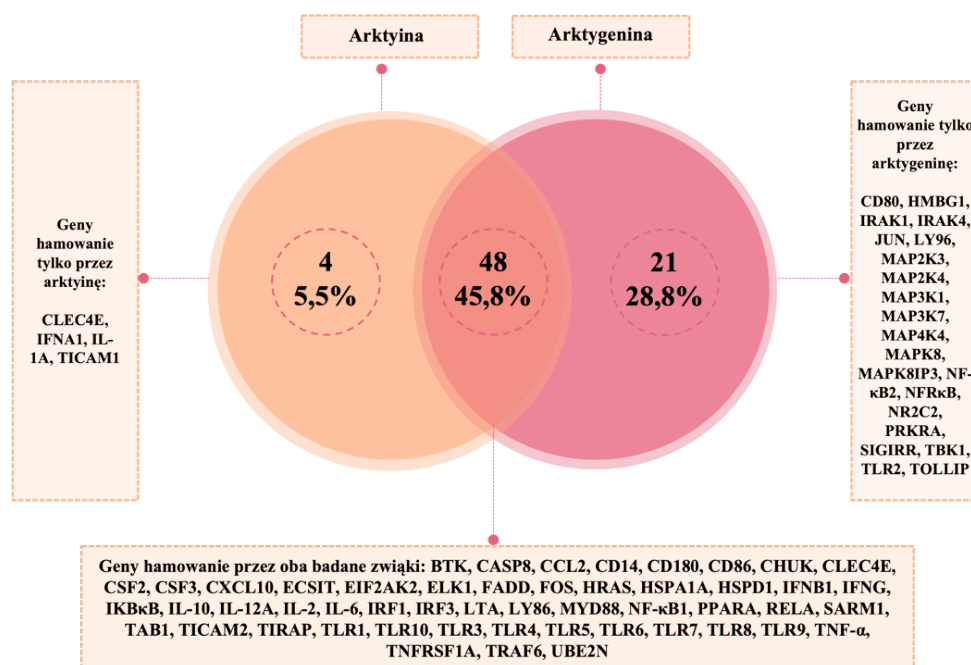
W toku analizy real-time PCR wykazano, że spośród 84 badanych genów, 50 z nich wykazywało wzrost ekspresji po stymulacji komórek roztworem bakteryjnego LPS, w porównaniu do grupy komórek niestymulowanych (KNST). Z kolei grupa 33 genów wykazywała spadek ekspresji, po zastosowaniu czynnika stymulującego, a ekspresja 1 genu nie uległa zmianie. 6-godzinna inkubacja komórek stymulowanych LPS, poddanych działaniu związków z grupy lignanów prowadziła do spadku ekspresji 52 genów po zastosowaniu arktyiny oraz 69 genów po zastosowaniu arktygeniny. W grupie komórek inkubowanych z arktygeniną, ekspresja zaledwie 18% badanych genów wzrosła. Porównanie zmian ekspresji genów dla każdej z grup komórek, w ujęciu ilościowym, w odniesieniu do grupy komórek stymulowanych LPS (KST) przedstawiono na poniższych wykresach słupkowych (**rycina 46**).



Rycina 46: Liczbowe zróżnicowanie ilości genów ulegających zmianie ekspresji pod wpływem działania arktyiny i arktygeniny, w modelu komórek makrofagów stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS (10 ng/ml). Ilości przedstawione jako różnica w ilości genów, których ekspresja uległa zmianie wobec grupy kontrolnej (kontrola stymulowana, KST).

W toku analizy wykazano, że spośród 52 genów, których ekspresja ulegała zmniejszeniu pod wpływem działania arktyny, oraz 69 genów, których ekspresja spadła pod wpływem działania arktynogenu aż 48 genów było wspólnych dla obu badanych związków. Do genów, których ekspresja uległa obniżeniu pod wpływem działania obu badanych związków należały m.in. geny dla kluczowych mediatorów stanu zapalnego tj. IL-6, IL-12A, IL-2, TNF- α . Oba badane lignany regulowały ekspresję kluczowych genów uczestniczących w sygnalizacji TLR, na szlaku MyD88- zależnym (*CD14*, *TIRAP*, *TRAF6*) oraz Myd88-niezależnym (*TAB1*, *TBK1*, *IRF3*).

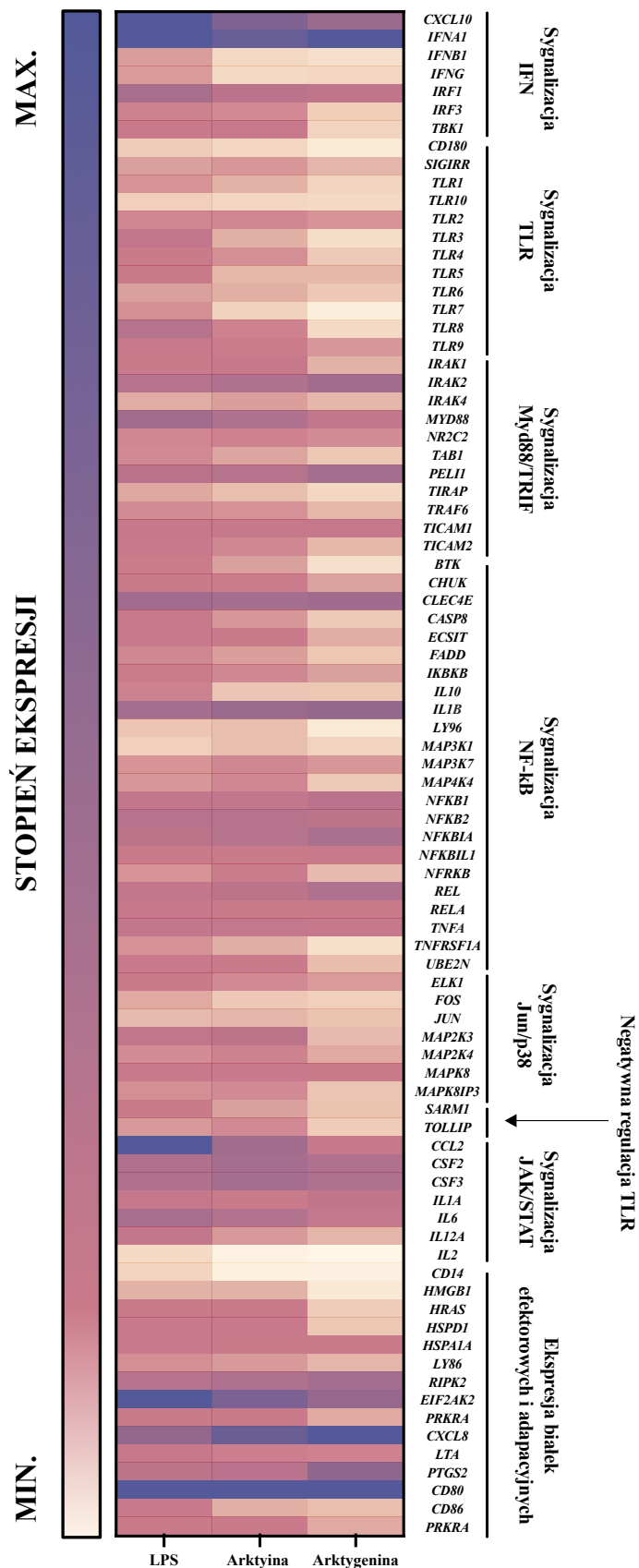
Do genów regulowanych jedynie przez arktynę, których ekspresja nie uległa obniżeniu w przyjętym modelu badawczym pod wpływem działania arktynogenu należały m.in: *CLEC4E*, *IFNA1*, *IL-1A*, *TICAM1*. Z kolei zastosowanie arktynogenu zainicjowało hamowanie ekspresji 21 genów, których aktywność nie uległa zmianie (lub wzrosła) po zastosowaniu arktyny. Na poniższym wykresie Venna (**rycina 47**) zaprezentowano listy genów, których ekspresja uległa obniżeniu pod wpływem działania każdego z badanych związków. Koło lewe – geny ulegające regulacji tylko pod wpływem działania arktyny; koło prawe – geny ulegające regulacji tylko pod wpływem działania arktynogenu; środkowa część wspólna – geny ulegające regulacji zarówno pod wpływem działania arktyny, jak również arktynogenu.



Rycina 47: Diagram Venna prezentujący różnice w ilości genów, których ekspresja uległa obniżeniu pod wpływem działania arktyny i arktynogenu, w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS. Wartości wyrażone w ujęciu procentowym, w oparciu o znormalizowane poziomy ekspresji. Koło I prezentuje ilość genów, których ekspresja ulega obniżeniu pod wpływem działania arktyny, ale nie arktynogenu. Koło II prezentuje ilość genów, których ekspresja ulega obniżeniu pod wpływem działania arktynogenu, ale nie arktyny. Przestrzeń środkowa – geny, których ekspresja uległa obniżeniu pod wpływem obu badanych związków.

Ekspozycja komórek na kontrolę rozpuszczalnika (DMSO) i PBS nie wykazywała zmienionych poziomów ocenianej ekspresji dla kluczowych mediatorów zapalnych, co wskazuje, że związki te nie mają bezpośrednich właściwości wzmacniających stan zapalny. W celu omówienia wyników dla obserwowanej ekspresji geny pogrupowano w oparciu o ich funkcję biologiczną, natomiast uzyskane średnie dla poszczególnych genów przedstawiono w postaci stopnia krotności regulacji, w porównaniu z grupą kontroli stymulowanej LPS.

Wstępem do omówienia wpływu związków na poszczególne szlaki sygnałowe oraz genów kodujących grupę wybranych białek efektorowych będzie mapa ciepła prezentująca (w ujęciu graficznym) zróżnicowany stopień ekspresji panelu 84 genów, uczestniczących w sygnalizacji inicjowanej za pośrednictwem TLR, pogrupowanych w zależności od ich udziału w określonych szlakach komórkowych (**rycina 48**). W porównaniu do średniej ekspresji wszystkich badanych genów wartości kontrolne (KST – kontrola z LPS) charakteryzowały się wysokimi wartościami ekspresji przeważającej większości genów (kolor fioletowo-ceglasty). Zastosowanie arktyny, jak również arktyniny wykazywało wyraźny wpływ hamujący ekspresję większości z nich (kolor beżowy). Wpływ badanych lignanów na procesy ekspresji genów z poszczególnych grup zostanie omówiony w dalszych akapitach niniejszej pracy.



Rycina 48: Mapa ciepła przedstawiająca porównawczy wpływ arktyiny i arktygeniny na średnie wartości ekspresji panelu 84 genów, uczestniczących w przekazaniu sygnału za pośrednictwem receptorów TLR. Stopień ekspresji oceniono metodą real-time PCR z użyciem zestawu RT2 Profiler PCR Array TLR. Geny pogrupowano względem udziału w poszczególnych procesach biologicznych. Kolor fioletowy symbolizuje wzrost ekspresji genów natomiast kolor beżowy odpowiada zmniejszeniu ekspresji. KST- kontrola stymulowana LPS.

4.10. Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na ekspresję genów białek efektorowych i receptorów uczestniczących w funkcjach i sygnalizacji makrofagów

Szczegółowe omówienie wyników dotyczące oceny wpływu każdego z badanych związków na procesy ekspresji genów związanych z sygnalizacją TLR, zostanie podzielone według głównych ścieżek sygnalizacji komórkowej uczestniczących w rozwoju stanu zapalnego.

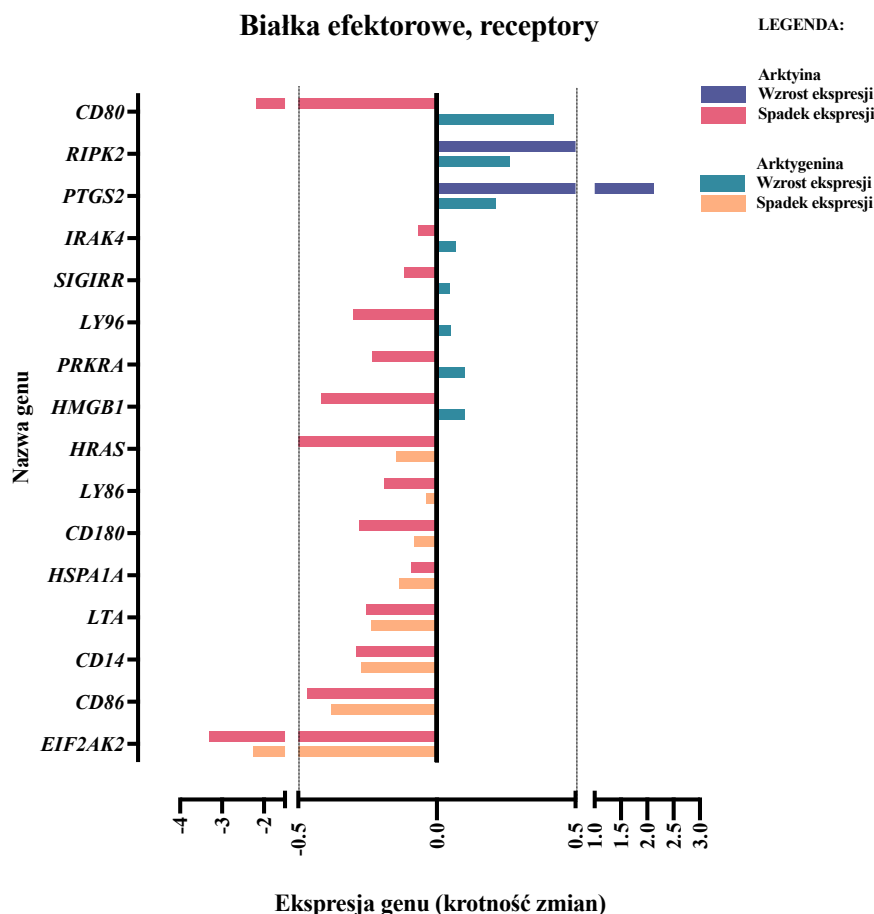
Rozpoznanie lipopolisacharydu przez komórki efektorowe układu odpornościowego jest procesem wieloetapowym, wymagającym współdziałania szeregu białek m.in. białka LBP (ang. *LPS-binding protein*) i CD14 (ang. *cluster of differentiation 14*). Zewnątrzkomórkowe białka, LBP i CD14, regulują aktywację TLR4 wpływając na ilość dostępnego lipopolisacharydu, który może zostać związany przez kompleks TLR4/MD-2. Przekazanie LPS z CD14 na kompleks TLR4/MD-2 stanowi ostatni etap rozpoznania cząsteczki bakteryjnej, rozpoczynający proces transdukcji sygnału. Niekiedy przy wysokich stężeniach LPS (10-1000 ng/ml) produkcja obu białek może ulec zwiększeniu z uwagi na ich udział w procesach zmierzających do neutralizacji LPS, uczestnicząc w przekazywaniu LPS na cząstki HDL, co pozwala na usuwanie go ze środowiska przez receptory zmiatające. Jak zaprezentowano na poniższym wykresie zarówno arktyina jak i arktygenina hamowały ekspresję genu dla cząstki kostymulującej CD14, przy jednoczesnym hamującym wpływie arktygeniny na procesy ekspresji genu dla cząstki MD-2, co może stanowić o istocie działania badanych lignanów już w początkowych stadiach rozpoznawania bakteryjnego LPS.

Białka błonowe regulujące aktywację komórek przez LPS to z reguły receptory, które wchodząc w interakcję z TLR4 ograniczają możliwość uformowania funkcjonalnego kompleksu sygnałowego i asocjacyjnych reakcji z cząsteczkami lipopolisacharydu. Ciekawym przykładem jest tu białko RP105 (ang. *radioprotective protein 105 kDa*, znane jako CD180), zależne od koreceptora MD-1 (kodowanego przez gen *LY86*), o podobnej strukturze domen zewnątrzkomórkowych do TLR4, nieposiadające jednak cytoplazmatycznej domeny sygnałowej. Zarówno arktyina jak i arktygenina w prezentowanym modelu hamowały ekspresję genu *CD180*, kodującego białko CD180. Innym przykładem może być białko SIGIRR (ang. *single Ig IL-1-related receptor*), opóźniające tworzenie myddosomu. Ekspresja genu *SIGIRR* była hamowana przez arktygeninę (ale nie przez arktyinę) (**rycina 49**).

Działanie immunostymulujące większości adiuwantów pochodzenia mikrobiologicznego, w tym LPS, obejmuje także wzrost ekspresji antygenów zgodności

tkankowej MHC oraz molekuł CD80, CD86, co przyczynia się do efektywniejszej prezentacji antygenów limfocytom T. Zarówno arktyina, jak również arktygenina w badanym modelu hamowały ekspresję genu kodującego białko cząstki CD86, co może świadczyć o ich potencjalnym wpływie modulującym procesy indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej.

Kolejnym białkiem odgrywającym pośrednią rolę w procesach rozwoju stanu zapalnego w komórkach eukariotycznych jest kinaza białkowa R (PKR), kodowana przez gen *EIF2AK2*. PKR pełni funkcje prozapalne, pośrednicząc w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, poprzez fosforylację jego podjednostki hamującej I κ B, a także uczestnicząc w aktywacji kinaz MAP oraz uwalnianiu IL-1 β , IL-18 i HMGB1 za pośrednictwem inflamasomu NLRP3 [204]. Inkubacja komórek makrofagów z roztworem arktyiny inicjowała ponad 3-krotny spadek ekspresji genu *EIF2K2*, w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS. Równie aktywna okazała się także arktyina, ograniczająca ponad 2-krotnie ekspresję powyższego genu.

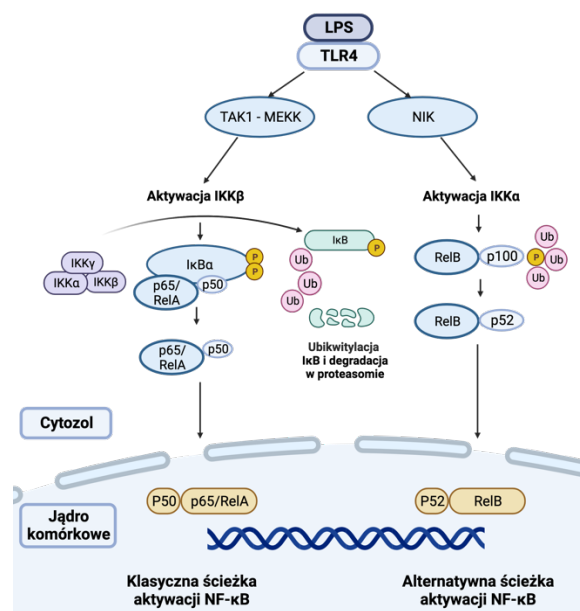


Rycina 49: Analiza zmian ekspresji 16 genów uczestniczących w kodowaniu białek efektorowych i receptorów komórek makrofagów uczestniczących w regulacji sygnalizacji za pośrednictwem receptorów TLR, pod wpływem działania arktyiny i arktygeniny (20 μ M). Zmiany ekspresji wyrażone jako krotność zmian ekspresji w stosunku do kontroli stymulowanej LPS (10 ng/ml).

4.11. Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na regulację ścieżki sygnałowej NF- κ B

Czynnik jądrowy kappa B (NF- κ B) jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym, odgrywającym kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej zależnej od makrofagów, obejmującej indukcję lub represję szerokiej gamy genów, regulujących przebieg stanu zapalnego, proliferacji, migracji i przeżycia komórek.

Rodzina białek NF- κ B składa się z 7 strukturalnie powiązanych członków, w tym NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB i c-Rel, kodowanych przez 5 genów NFKB1, NFKB2, RELA, RELB, REL. Geny NF- κ B1 i NF- κ B2 są odpowiedzialne za transkrypcję białek (odpowiednio) p105 i p100, które z kolei są rozszczepiane przez proteasomy prowadząc do powstawania funkcjonalnych cząsteczek p50 i p52. Dimery podjednostek NF- κ B w stanie fizjologicznym występują w cytoplazmie komórki w postaci



Rycina 50: Aktywacja ścieżki NF- κ B na drodze klasycznej i alternatywnej. Opracowanie własne na podstawie: [205].

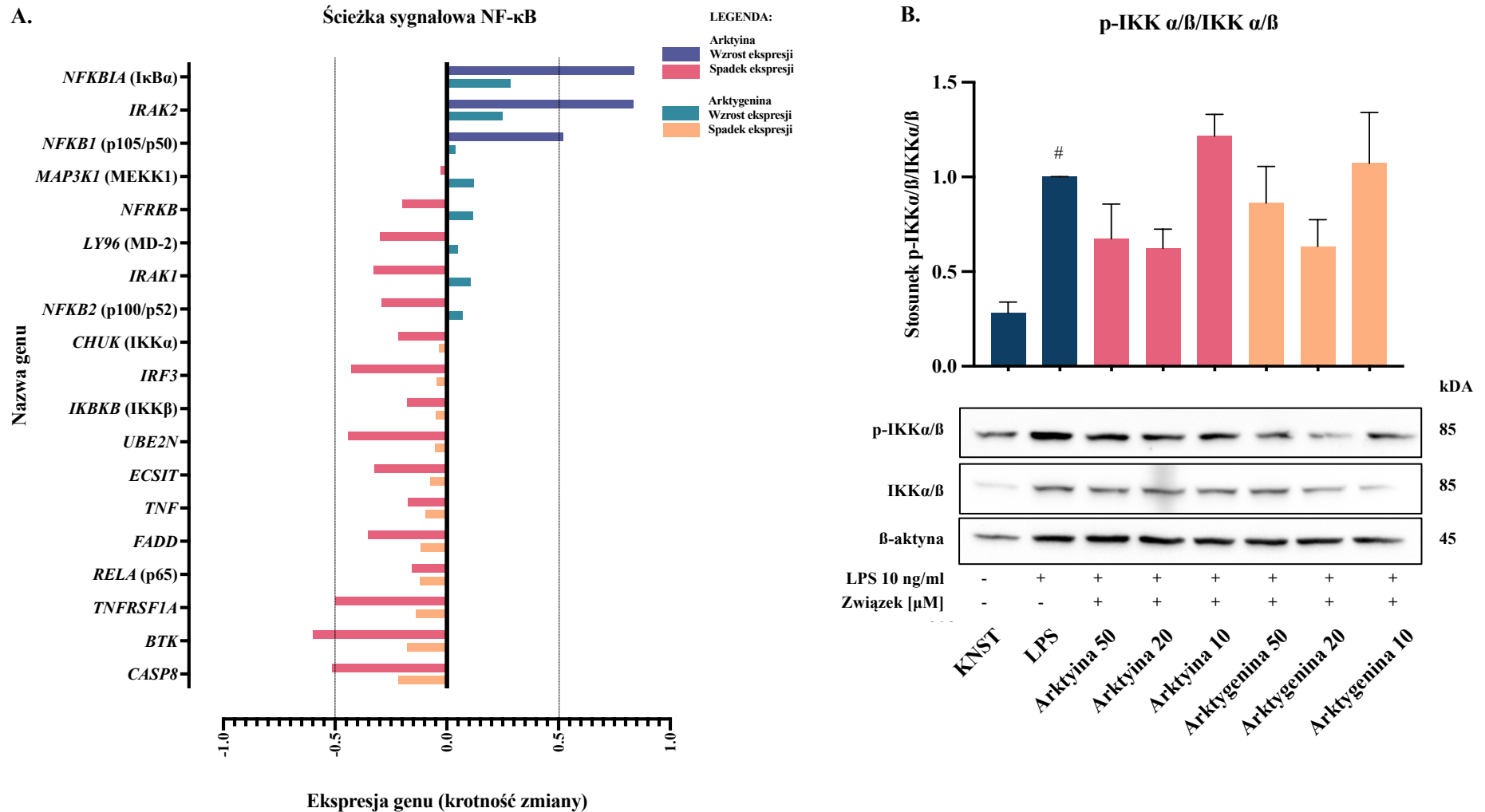
nieaktywnej, związane z inhibitorem I κ B α , który uniemożliwia ich translokację do jądra komórkowego. Pod wpływem działania określonych czynników stymulujących aktywowany jest kompleks kinazy wielopodjednostkowej I κ B (IKK), który inicjuje fosforylację I κ B α , prowadząc do jego ubiquitynacji i uwolnienia podjednostek NF- κ B oraz translokację jądrową członków NF- κ B, głównie dimerów p50/RelA i p52/RelB. W zależności od rodzaju bodźca stymulującego aktywacja białek NF- κ B może odbywać się na drodze klasycznej, alternatywnej oraz w ramach ścieżki atypowej, w których udział biorą odpowiednio: podjednostka IKK β , IKK α , IKK γ wchodzące w skład kompleksu IKK [205]. Schematyczny układ klasycznej i alternatywnej aktywacji NF- κ B zaprezentowano na powyższym schemacie (**rycina 50**).

Analiza ekspresji panelu 20 genów zaangażowanych w sygnalizację szlaku NF- κ B, zaprezentowana na poniższej rycinie (**rycina 51 A**), wskazuje na hamujący potencjał działania zarówno arktyiny jak również arktygeniny na ekspresję genów poszczególnych etapów sygnalizacji NF- κ B.

Ponadto wykazano, że oba badane lignany inicjują wzrost ekspresji genów kodujących białko inhibitorowe I κ B α (*NFKB1A*), przy czym stymulująca aktywność arktyniny była 3-krotnie wyższa w porównaniu z działaniem arktyny. Co więcej, zarówno arktyna jak również jej forma aglikonowa hamowały ekspresję genów dla podjednostek katalitycznych IKK α (*CHUK*) oraz IKK β (*IKBKB*). Wpływ arktyniny na modulację ekspresji genów dla IKK α był aż 6-krotnie wyższy w porównaniu do działania arktyny oraz 4-krotnie wyższy w kontekście wpływu na ekspresję genów IKK β , w tym samym układzie badawczym.

W odniesieniu do pomiaru obecności białek (formy ufosforylowanej/całkowitej) w badanych lizatach białkowych, zastosowanie zarówno arktyny jak również arktyniny w dwóch najwyższych badanych stężeniach (50, 20 μ M) inicjowało znaczny spadek ilości frakcji ufosforylowanych białek IKK α/β , w stosunku do formy całkowitej, przy braku aktywności związków w stężeniu 10 μ M (**rycina 51 B**). Wartości stosunku formy ufosforylowanej IKK α/β do frakcji całkowitej wynosiły dla arktyny: $0,67 \pm 0,1$ (50 μ M), $0,62 \pm 0,2$ (20 μ M), oraz dla arktyniny $0,74 \pm 0,2$ (50 μ M), $0,63 \pm 0,1$ (20 μ M), w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS, dla której stosunek zawartości form ufosforylowanej IKK do całkowitej IKK wynosił 1.

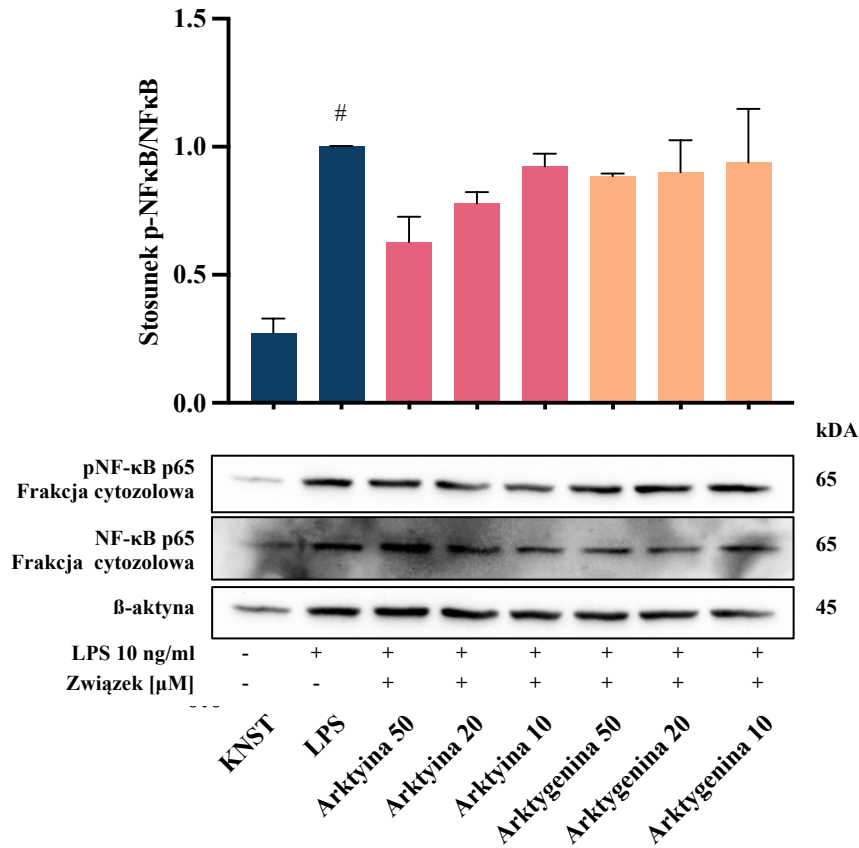
Jak wykazano w szczegółowych analizach dotyczących aktywności szlaku NF- κ B, obecność białek NF- κ B1 i B2 w formach prekursorowych tj. p100 i p105, zawierających w rejonie C-końcowym motyw powtórzeń ankirynowych (ANK), może pełnić funkcje inhibitorowe procesów dimeryzacji i aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Może to stanowić podstawę do częściowego wyjaśnienia zaobserwowanego wzrostu ekspresji genu *NFKB1* (kodującego białka p105/p50) po zastosowaniu arktyny i arktyniny, w porównaniu do kontroli LPS. W przypadku wpływu badanych związków na ekspresję genu *NFKB2* (kodującego białka p100/p52), arktynina inicjowała nieznaczny spadek ekspresji genu, przy niewielkim wzroście ekspresji po zastosowaniu arktyny, w stosunku do kontroli LPS. Oba badane lignany nieznacznie hamowały ekspresję genu *RELA*, kodującego ekspresję podjednostki NF- κ B p65, przy tylko nieznacznej przewadze wpływu aglikonu do glikozydu. Częściowym potwierdzeniem tej obserwacji może być spadek stopnia fosforylacji białka NF- κ B p65 we frakcji cytozolowej, w badanych lizatach komórkowych, po zastosowaniu każdego z badanych lignanów (50-20 μ M) (**rycina 52 A**). Hamowanie ekspresji białka NF- κ B p65 obserwowano także w toku analizy cytometrycznej. Wartości ekspresji osiągnięte dla arktyny (20 μ M) wynosiły $77,8 \pm 2,5\%$, przy nieco silniejszym obserwowanym wpływie arktyniny (20 μ M): $60,8 \pm 2,9\%$ (**p < 0,01), co zostało zaprezentowane na poniższym wykresie słupkowym oraz właściwym dla działania arktyniny cytogramie (**rycina 52 B**).



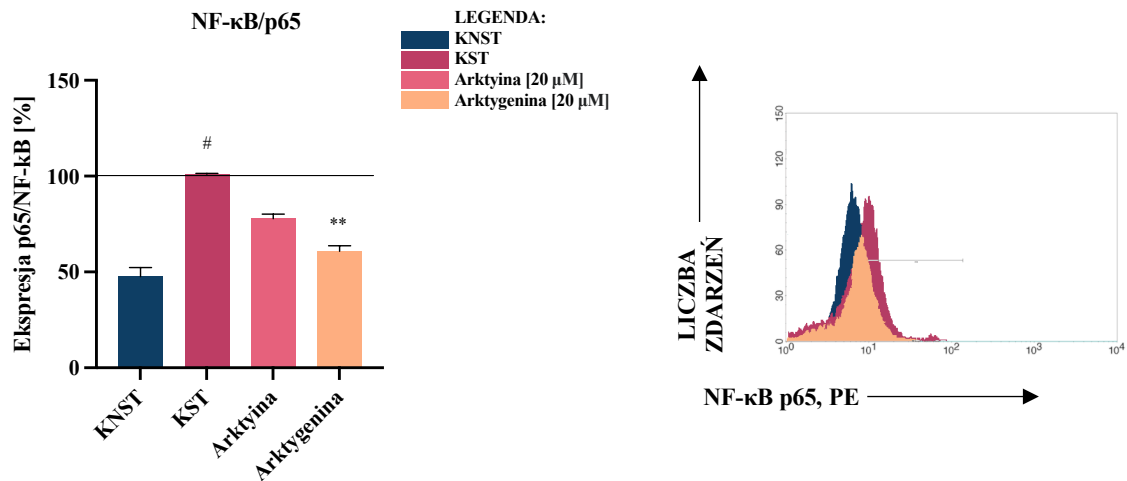
Rycina 51: **A.** Analiza zmian ekspresji genów należących do ścieżek sygnałowych NF- κ B pod wpływem działania arktyiny i arktygeniny (20 μ M). Zmiany ekspresji wyrażone jako krotność regulacji ekspresji w stosunku do grupy kontrolnej (kontroli stymulowanej LPS (10 ng/ml)). W celu łatwiejszej analizy wykresów, w nawiasach podano nazwy białek kodowanych przez poszczególne geny. **B.** Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białka IKK α/β w modelu makrofagów uprzednio inkubowanych z arktyiną i arktygeniną (10, 20, 50 μ M), stymulowanych LPS (10 ng/ml). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β -aktyny). Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST).

A.

p-NFκB/NFκB



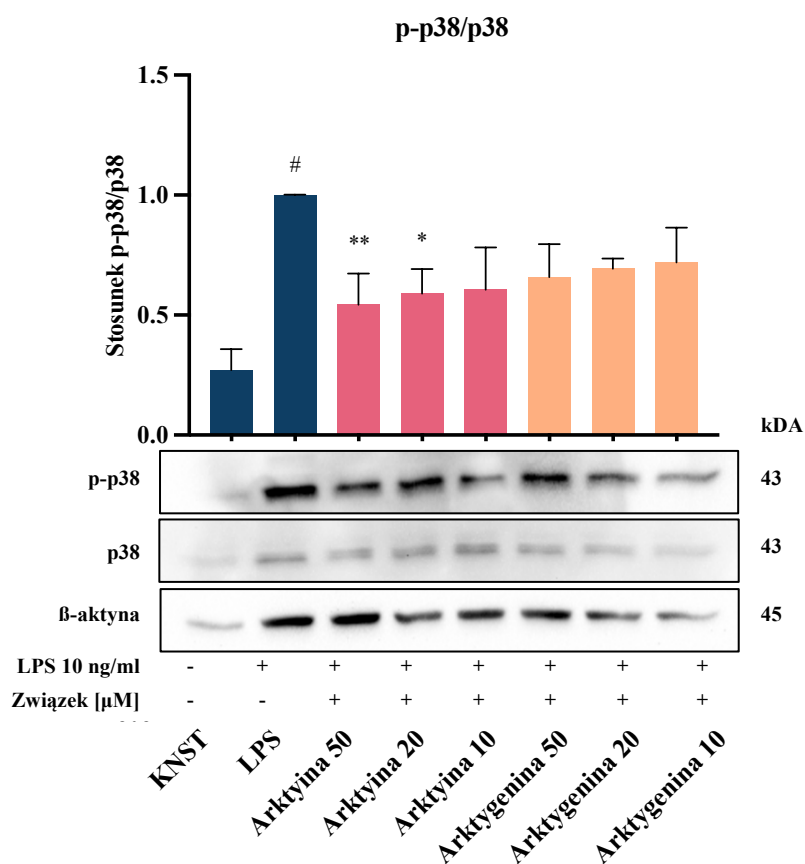
B.



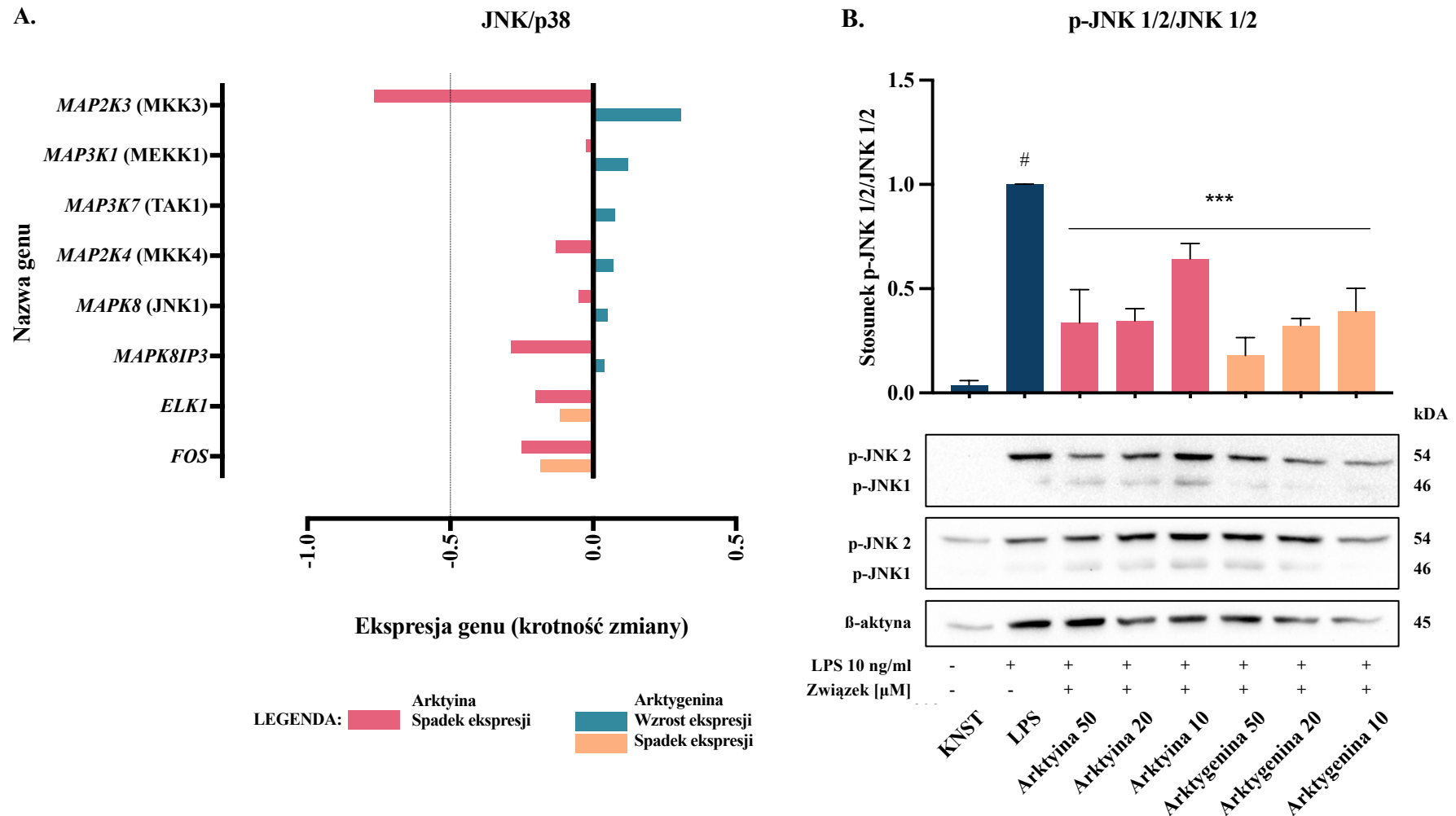
Rycina 52: A. Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białka NF-κB/p65 w modelu makrofażów inkubowanych z arktyiną i arktygeniną (10, 20, 50 μM), stymulowanych LPS (10 ng/ml). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β-aktyny). Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta. **B.** Analiza stopnia ekspresji NF-κB/p65 prowadzona metodą cytometrii przepływowej. # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); **p < 0,01. Kolory pików na histogramie odpowiadają związkowi badanemu - arktygeninie oraz wartościom kontrolnym, zgodnie z kolorystyką zaprezentowaną na wykresie słupkowym oraz legendzie. Marker M1 wyznacza poziom ekspresji NF-κB/p65 względem kontroli stymulowanej LPS.

4.12. Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na regulację ścieżek sygnałowych p38 oraz JNK 1/2 MAPK

Wspólna aktywacja kinaz JNK i p38 ma na celu wzmocnienie komórkowej odpowiedzi na bodźce stresowe oraz regulację procesów komórkowych związanych z procesami zapalnymi, apoptozą i różnicowaniem komórek. Inkubacja komórek makrofagów z arktyiną inicjowała znamiennej statystycznie spadek fosforylacji białka p38, w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS, dla związku badanego w stężeniu 50 i 20 μM (odpowiednio $**p < 0,01$ i $*p < 0,05$) (**rycina 53**). Zastosowanie arktyiny, jak również arktygeniny w trzech badanych stężeniach inicjowało istotny spadek fosforylacji białka JNK 1/2 ($***p < 0,01$), przy czym aktywność arktygeniny w stężeniu 50 μM spowodowała aż 5-krotny spadek fosforylacji białka izoformy JNK2 w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (**rycina 54 B**). Poczynione obserwacje znalazły także potwierdzenie w wyraźnym hamowaniu ekspresji genów dla kluczowych czynników transkrypcji, uczestniczących w sygnalizacji p38 i JNK: *ELK1* oraz *FOS*, a także pośrednich kinaz prowadzących do aktywacji efektorowych kinaz MAPK np. *MAP2K3*, *MAP2K4* (pod wpływem arktyiny) (**rycina 54 A**).



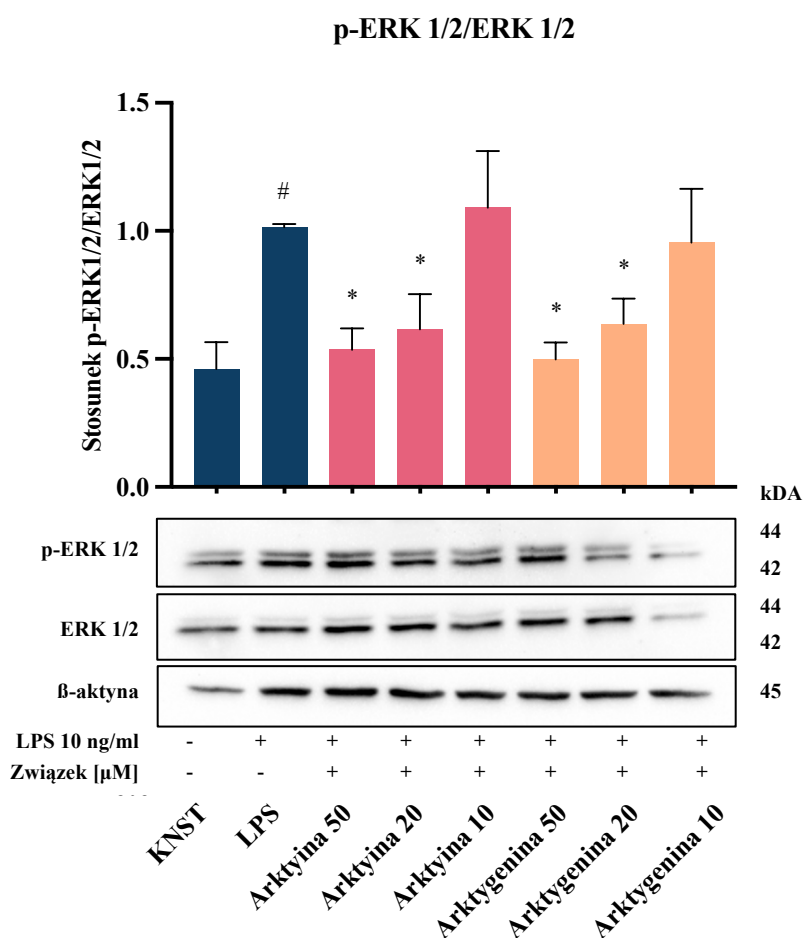
Rycina 53: Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białek p-p38/p38 w modelu makrofagów inkubowanych z arktyiną i arktygeniną (10, 20, 50 μM), stymulowanych LPS (10 ng/ml). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β -aktyny). Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # $< 0,001$ – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.



Rycina 54: **A.** Analiza zmian ekspresji 8 genów kodujących białka należące do ścieżek sygnałowych JNK/p38 MAPK, pod wpływem działania arktyiny i arktygeniny (20 μ M) w komórkach makrofagów. Zmiany ekspresji wyrażone jako krotność regulacji ekspresji w stosunku do grupy kontrolnej (kontroli stymulowanej LPS (10 ng/ml)). W celu łatwiejszej analizy wykresy w nawiasach podano nazwy białek kodowanych przez poszczególne geny. **B.** Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białek JNK1/2 w modelu makrofagów inkubowanych z arktyiną i arktygeniną (10, 20, 50 μ M), stymulowanych LPS (10 ng/ml). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β -aktyna). Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem *post hoc* Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); *** p < 0,001.

4.13. Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na regulację ścieżki sygnałowej ERK 1/2 MAPK

Kaskada transdukcji sygnału na pośrednictwem szlaku Ras-Raf-MEK 1/2-ERK 1/2 jest jedną z wiodących ścieżek sygnałowych, odpowiedzialną za przekazywanie informacji z receptorów powierzchniowych do jądra komórkowego. Inkubacja makrofagów zarówno z arktyiną jak również arktygeniną wykazała znamienne spadki ilości fosforylowanej formy białka ERK 1/2 w sposób zależny od stężenia, przy czym wyniki otrzymane dla dwóch najwyższych spośród badanych stężeń (20, 50 μM) były istotne statystycznie ($*p < 0,05$). Wartości stosunku współczynnika zmian frakcji ufosforylowanej ERK 1/2 do frakcji całkowitej wynosiły dla arktyiny: $0,53 \pm 0,1$ (50 μM), $0,61 \pm 0,1$ (20 μM), oraz dla arktygeniny $0,49 \pm 0,1$ (50 μM), $0,63 \pm 0,1$ (20 μM), w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS, Analizę stopnia fosforylacji białka ścieżki ERK 1/2 zaprezentowano na poniższej rycinie (**rycina 55**).



Rycina 55: Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białek pERK1/2/ERK1/2 w modelu makrofagów inkubowanych z arktyiną i arktygeniną (10, 20, 50 μM), stymulowanych LPS (10 ng/ml). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β -aktyny). Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem *post hoc* Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), $*p < 0,05$.

4.14. Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na ekspresję genów kluczowych mediatorów zapalnych

Aktywacja czynników transkrypcyjnych AP-1 oraz NF- κ B zapoczątkowuje procesy stymulujące produkcję mediatorów zapalnych, kluczowych w procesach formowania i przebiegu stanu zapalnego oraz powrotu organizmu do stanu homeostazy.

W nawiązaniu wyników zaprezentowanych w poprzednich rozdziałach dotyczących wpływu arktyiny i arktygeniny na procesy modulacji ekspresji genów wybranych ścieżek sygnałowych oraz fosforylacji białek należących do ścieżki MAPK i NF- κ B, kolejnym etapem było określenie wpływu badanych związków na modulację ekspresji genów szeregu cytokin, wydzielanych specyficznym przez komórki makrofagów.

Inkubacja komórek makrofagów zarówno z arktyiną, jak również z arktygeniną, hamowała ekspresję genów dla kluczowych mediatorów zapalnych tj. IL-6, TNF- α oraz MCP-1. Szczególna inhibicja ekspresji po zastosowaniu badanych związków została zaobserwowana dla genu chemokiny MCP-1, dla której obserwowano 6-krotny spadek ekspresji po inkubacji z arktyiną oraz 8-krotny spadek ekspresji w wyniku działania arktygeniny. Warto zauważyć, że obserwowane różnice w ekspresji cytokin IL-6, TNF- α oraz chemokiny MCP-1 potwierdzono także z użyciem pojedynczych sond, co opisano w kolejnym rozdziale (**rozdział 4.13**), a inhibicję produkcji określonych białek mediatorów zapalnych opisano uprzednio w **rozdziale 4.5**.

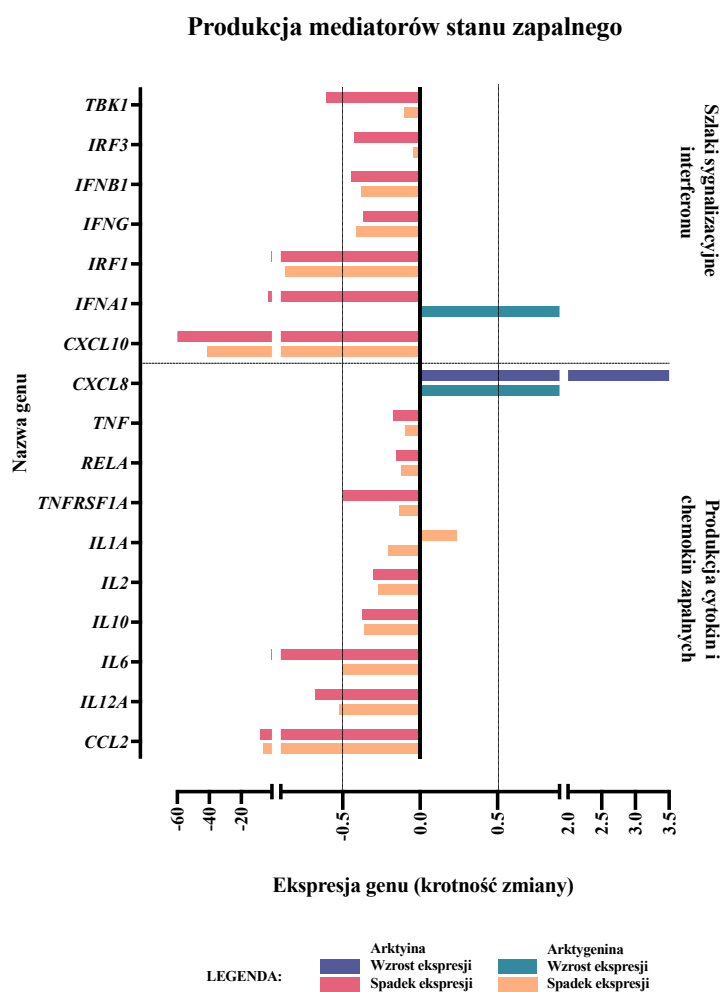
Ciekawą obserwacją może być określenie wpływu badanych związków na inne mediatory stanu zapalnego, nieomówione w poprzednich rozdziałach. Zarówno arktyina, jak również arktygenina aktywnie hamowały ekspresję genu *CXCL10* kodującego chemokinę 10 (znaną jako białko indukowane interferonem gamma 10, IP-10), pełniącej rolę chemoatraktantu limfocytów T, przy czym aktywność arktygeniny była 1,5-razy wyższa w porównaniu do arktyiny (**rycina 56**). Według wcześniejszych doniesień hamowanie ekspresji genu dla *CXCL10* może być także skorelowane z równoległym spadkiem produkcji IL-12, a także innych cytokin prozapalnych, za pośrednictwem szlaku JNK-MAPK [206], co zostanie poddane dyskusji w **rozdziale 5**.

Przeciwny efekt działania badanych związków zaobserwowano z kolei dla genu *CXCL8* kodującego IL8 - kluczową chemokinę regulującą migrację kierunkową komórek neutrofilów do miejsca występowania stanu zapalnego, a tym samym odgrywającą kluczową rolę w odpowiedzi na infekcję i uszkodzenie tkanek [207]. Oba badane lignany stymulowały

ekspresję genu *CXCL8* przy czym aktywność arktygeniny była 2,5-krotnie wyższa, w porównaniu do aktywności arktyiny (**rycina 56**).

Kluczową obserwacją w kontekście tematyki podjętej w niniejszej pracy może być także wpływ badanych lignanów na ekspresję genu *IL12*, kodującego białko IL-12, będącego jedną z wiodących cytokin aktywnych w płytce miażdżycowej. Oba badane lignany hamowały ekspresję genu *IL12*, przy widocznie wyższym wpływie arktygeniny, co może korelować z wynikami dotyczącymi wpływu arktygeniny na procesy akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów, opisanego w kolejnych rozdziałach niniejszej pracy (**rozdział 4.14 – 4.15**).

Ciekawą obserwacją może być także stymulujący (niemal 2-krotny wzrost) wpływ arktygeniny na ekspresję genu *IFNA1* (przy wyraźnie hamującym wpływie arktyiny), kodującego interferon alfa-1, pomimo jej hamującego wpływu na pozostałe komponenty szlaku dla IFN. Powyższa obserwacja wymaga jednak potwierdzenia na poziomie produkcji białka.

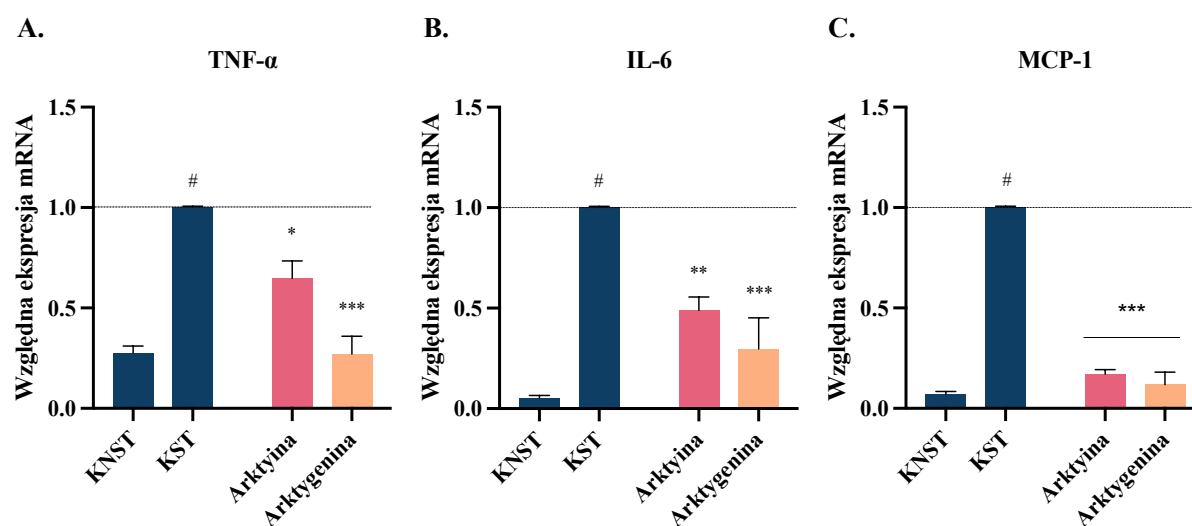


Rycina 56: Analiza zmian ekspresji 7 genów należących do ścieżek sygnałowych dla interferonu oraz 10 genów dla cytokin i chemokin zapalnych, pod wpływem działania arktyiny i arktygeniny (20 μ M) w komórkach makrofagów. Zmiany ekspresji wyrażone jako krotność regulacji ekspresji w stosunku do grupy kontrolnej (kontroli stymulowanej LPS (10 ng/ml)).

4.15. Ocena wpływu arktyiny i arktygeniny na ekspresję genów dla IL-6, MCP-1 oraz TNF- α z wykorzystaniem pojedynczych sond

Wyniki pomiaru względnego poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem **RT2 Profiler PCR Array TLR** pozwoliły na zaobserwowanie tendencji do spadku ekspresji genów kodujących TNF- α , IL-6 oraz MCP-1 po zastosowaniu zarówno arktyiny jak również arktygeniny (20 μ M), w modelu makrofagów stymulowanych LPS (10 ng/ml). W związku z powyższym oceniłam także stopień ekspresji mRNA dla wymienionych mediatorów stanu zapalnego z wykorzystaniem pojedynczych sond, co pozwoliło na potwierdzenie aktywności obserwowanej podczas zastosowania wielkoskalowego badania z użyciem mikromacierzy.

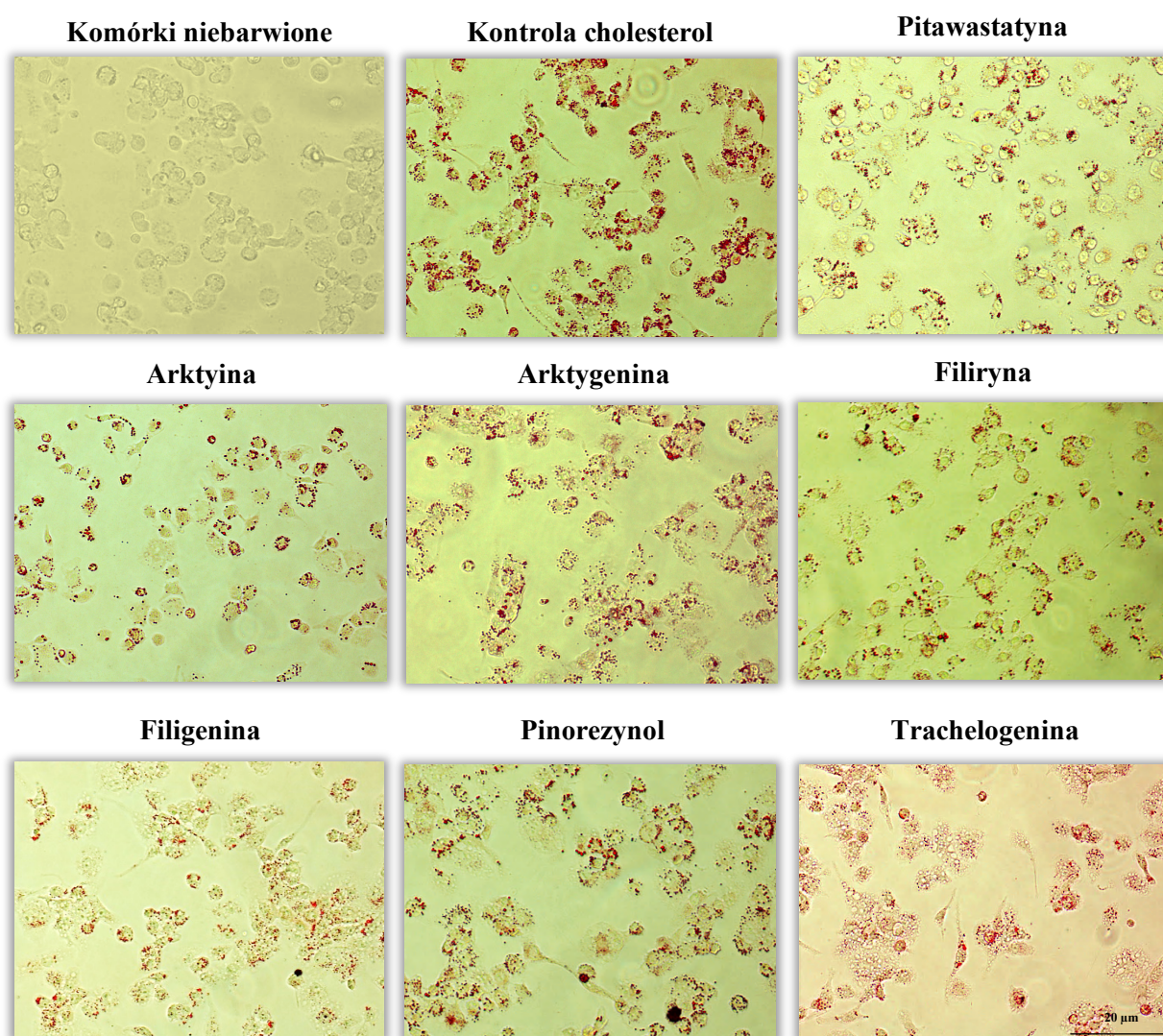
Oznaczenie mRNA metodą qPCR wykazało, że arktygenina spowodowała 5-krotny spadek ekspresji genu dla TNF- α w stosunku do kontroli stymulowanej LPS (10 ng/ml) (**p < 0,001), przy niemal 2-krotnym spadku jego ekspresji po inkubacji komórek z arktyiną (*p < 0,05). Wpływ badanych związków okazał się także znamieny w przypadku obniżania ekspresji genu dla IL-6. Względny poziom jego ekspresji ulegał 2-krotnemu obniżeniu (**p < 0,01) pod wpływem działania arktyiny, przy aż 5-krotnym spadku ekspresji genu po inkubacji komórek z arktygeniną (**p < 0,001). Oba badane lignany okazały się także skuteczne w hamowaniu ekspresji genu chemokiny MCP-1, charakterystycznej dla komórek makrofagów (**p < 0,001). Analizę ekspresji przedstawiono na poniższych wykresach słupkowych (**rycina 57 A, B, C**).



Rycina 57: Analiza ekspresji mRNA **A.** TNF- α **B.** IL-6, **C.** MCP-1 pod wpływem działania arktyiny i arktygeniny (20 μ M), w stymulowanych makrofagach. Zmiany ekspresji wyrażone w stosunku do kontroli stymulowanej LPS (10 ng/ml), na podstawie wartości $2^{-\Delta\Delta C_t}$, jako wartość średnia \pm SEM. Zmiany w ekspresji mRNA znormalizowano względem ekspresji GAPDH. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.16. Wizualizacja wpływu związków z grupy lignanów na procesy akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów

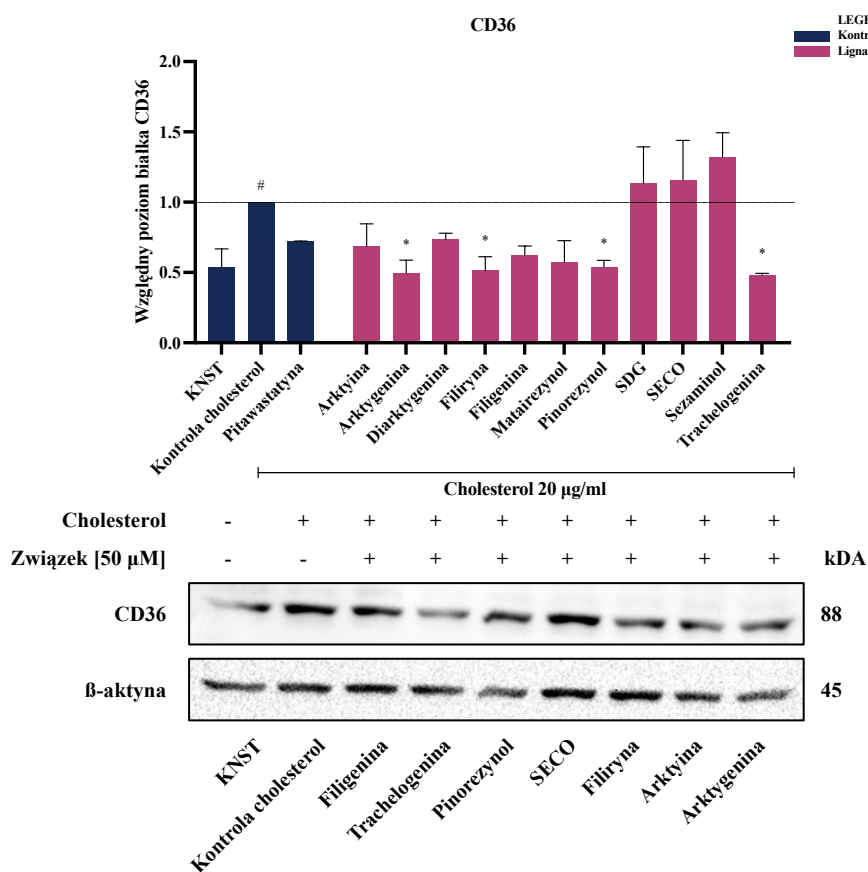
Drugą częścią analizy aktywności związków z grupy lignanów była ocena ich wpływu na procesy akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów. Poniższa rycina (**rycina 58**) przedstawia reprezentatywne ilustracje, obrazujące stopień akumulacji cholesterolu w modelu komórek wybarwionych lizochromowym barwnikiem diazowym – czerwienią Red Oil O, stosowanym do barwienia lipidów oraz niektórych lipoprotein. Komórki makrofagów po 24-godzinnej inkubacji z roztworem cholesterolu, poprzedzonej 24-godzinną inkubacją z badanymi związkami (50 μM), wykazywały widocznie mniejszą zdolność pochłaniania cholesterolu niż komórki niepoddane inkubacji z badanymi lignanami. Jako kontrolę pozytywną zastosowano związek z grupy statyn, pitawastatynę (50 μM).



Rycina 58: Mikroskopowa wizualizacja stopnia akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów TDM, po inkubacji z wybranymi związkami z grupy lignanów (50 μM). Do barwienia wykorzystano lizochromowy barwnik diazowy, czerwień olejową O. Skala na zdjęciu odpowiada 20 μm .

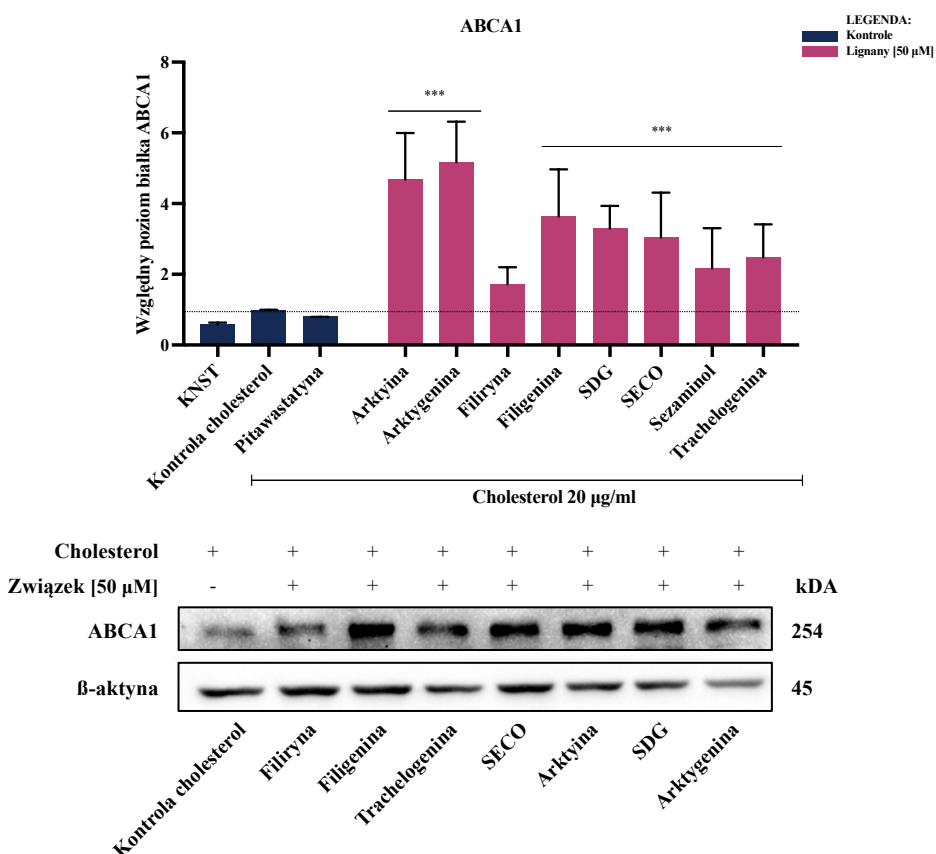
4.17. Ocena wpływu związków z grupy lignanów na ekspresję białek receptorów CD36 i ABCA1 oraz HO-1 i szlaku Nrf2

W nawiązaniu do przeprowadzonej analizy barwienia złogów cholesterolu w komórkach makrofagów, poprzedzonej inkubacją komórek ze związkami z grupy lignanów, kolejnym etapem badań było określenie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tej aktywności. Określenie wpływu lignanów na procesy akumulacji cholesterolu prowadzono dwuetapowo, w pierwszej kolejności oceniając wpływ związków na ekspresję białka receptora zmiatającego CD36, odpowiedzialnego za pobieranie cholesterolu do wnętrza komórki. Analiza przeprowadzona metodą western blot, zaprezentowana na **rycinie 59** wykazała znamienny wpływ arktygeniny, filiryiny, pinorezynolu oraz trachelogeniny, badanych w stężeniu 50 μM na hamowanie ekspresji białka receptora CD36 w komórkach makrofagów ($*p < 0,05$), uczestniczącym w procesach pobierania cholesterolu do wnętrza komórki, w porównaniu do kontroli z dodatkiem cholesterolu.



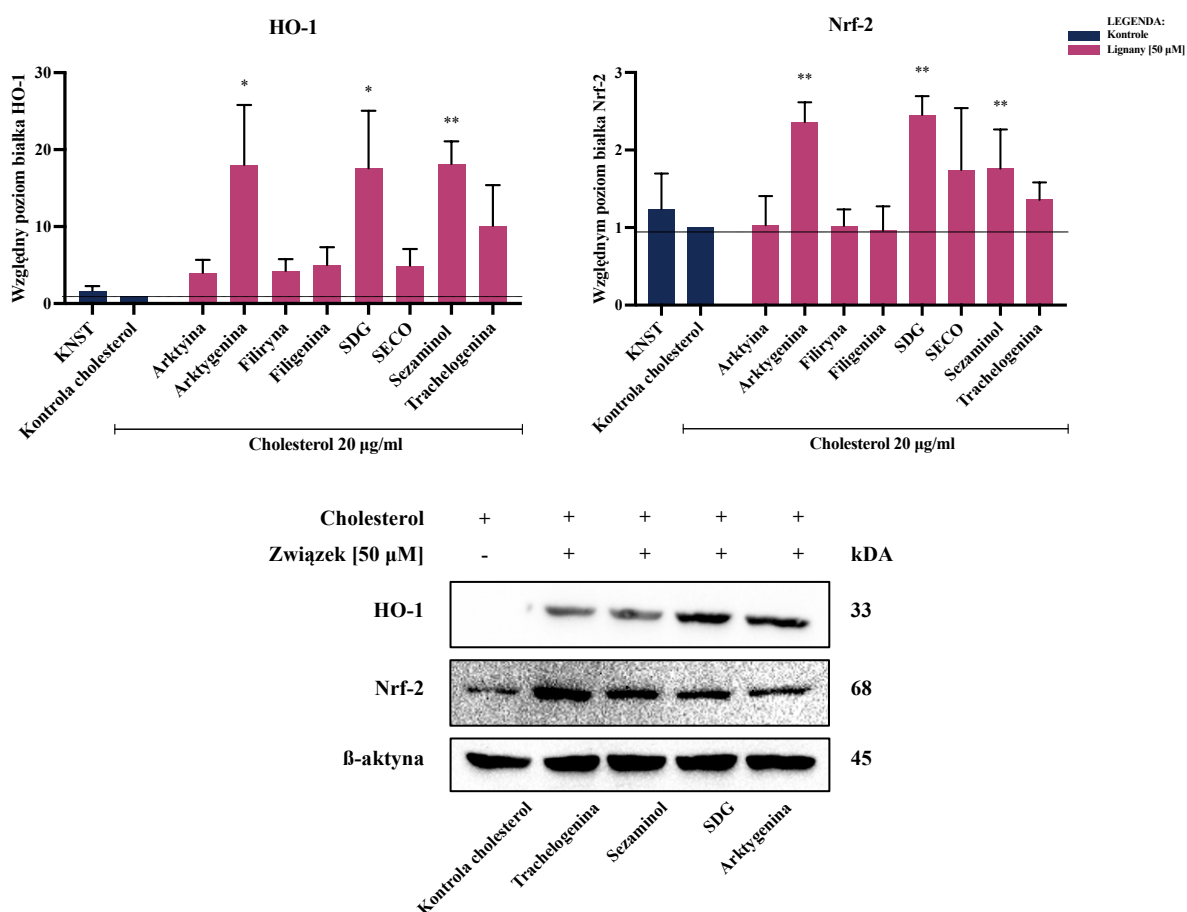
Rycina 59: Analiza poziomu ekspresji białka receptora CD36 w makrofagach po zastosowaniu badanych lignanów (50 μM). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β -aktyny). Wyniki przedstawiono jako współczynnik zmiany względem kontroli z dodatkiem cholesterolu (Kontrola cholesterol, przyjętej jako 1,0; linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM; Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunneta; $\#p < 0,05$ różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST); $*p < 0,05$.

Drugim z kluczowych procesów regulujących poziom lipidów w komórkach makrofagów jest transport zwrotny cholesterolu z udziałem transporterów kasyety wiążącej ATP A1 (ABCA1) oraz ABCG1. Z uwagi na powszechną zawartość lignanów w codziennej diecie znamienne wydaje się ocena ich dwukierunkowego wpływu na gospodarkę lipidową. Ocena ekspresji białka transportera ABCA1, przeprowadzona metodą western blot (zaprezentowana na **rycina 60**) wykazała znamiennej aktywność arktyiny, arktygeniny, filigeniny, sekoizolaricirezynolu (SECO), diglukozydu sekoizolaricirezynolu (SDG), sezaminiolu oraz trachelogeniny ($***p < 0,001$) wobec wzrostu aktywności transportera ABCA1, po inkubacji makrofagów z badanymi związkami. Najwyższy wzrost aktywności zaobserwowano jednak po inkubacji komórek z arktygeniną (50 μM), inicjującą 5-krotny wzrost aktywności transportera, w porównaniu do grupy kontrolnej (kontrola cholesterol) ($***p < 0,001$). Wzrost aktywności transportera ABCA1 zaobserwowano także w wyniku inkubacji komórek z arktyiną oraz filigeniną ($***p < 0,001$).



Rycina 60: Analiza poziomu ekspresji białka transportera ABCA1 w makrofagach po inkubacji z wybranymi związkami z grupy lignanów (50 μM). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β -aktyny). Wyniki przedstawiono jako współczynnik zmiany względem kontroli z dodatkiem cholesterolu (Kontrola cholesterol, przyjętej jako 1,0; linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM; Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; $***p < 0,001$. KNST– kontrola niestymulowana.

Wzrost ekspresji białka oksygenazy hemowej 1 (HO-1) zapewnia ochronne działanie cytoprotekcyjne poprzez przekształcanie prooksydacyjnego hemu w biologicznie aktywne przeciwutleniające produkty uboczne, takie jak biliwerdyna / bilirubina, a także w tlenek węgla inaktywujący hem. Dostępne dane literaturowe sugerują, że mechanizmy komórkowe zależne od HO-1 pośredniczą w regulacji homeostazy cholesterolu poprzez stymulację ekspresji transporterów wiążących ATP [208]. W celu określenia potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za wzrost ekspresji białka ABCA1, po zastosowaniu badanych lignanów, oceniono także wpływ poszczególnych związków na stopień ekspresji białka HO-1. Największy wzrost ekspresji HO-1 zaobserwowano po zastosowaniu sezaminolu (**p < 0,01), przy równie znaczącym wzroście produkcji białka po zastosowaniu arktygeniny oraz SDG (*p < 0,05). W toku przeprowadzonych analiz wykazano także, że wzrost ekspresji białka HO-1 po zastosowaniu najaktywniejszych, badanych lignanów, wynikał ze wzrostu ekspresji ścieżki sygnałowej zależnej od Nrf-2 (rycina 61).



Rycina 61: Analiza stopnia ekspresji białka HO-1, oraz ekspresji ścieżki Nrf-2 w badanych lizatach komórkowych po inkubacji z wybranymi związkami z grupy lignanów (50 µM). Intensywność sygnału przeliczono względem kontroli ilości nałożonego materiału (β-aktyny). Wyniki przedstawiono jako współczynnik zmiany ilości białka względem kontroli z dodatkiem cholesterolu (Kontrola cholesterolu, przyjętej jako 1,0; linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią ± SEM; Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunn'a; *p < 0,05; **p < 0,01. KNST– kontrola niestymulowana.

5. Dyskusja

Jak wynika z raportu Światowej Organizacji Zdrowia, z 2023 roku choroby niezakaźne (NCD) i związane z nimi czynniki ryzyka są przyczyną 74% zgonów na świecie i aż 90% w Polsce, stanowiąc jedne z globalnych wyzwań medycyny XXI wieku [209,210]. Wysokoprzetworzona żywność, brak aktywności fizycznej, podeszły wiek, płeć męska, chroniczny stres i warunki społeczno-ekonomiczne to czynniki, które mogą przyczynić się do wzrostu ryzyka związanego z rozwojem chorób niezakaźnych o podłożu zapalnym [211]. Spośród niemal 200 krajów objętych strategią monitorowania postępu chorób niezakaźnych w 2022 roku, niewiele ponad 70 z nich zrealizowało wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia w kierunku pracy na rzecz zapobiegania czynnikom rozwoju zaburzeń metabolicznych tj. cukrzyca typu II, hiperlipidemia czy otyłość [212], wskazując tym samym na powszechność i skalę problemu.

Jak wzmiankowano we wstępie do niniejszej pracy złożoność patomechanizmów chorób cywilizacyjnych stwarza konieczność zintegrowania kilku składowych terapeutycznych, ukierunkowanych na zróżnicowane cele farmakologiczne. Jako główny z nich wymienia się chroniczny stan zapalny o niskim stopniu nasilenia, wpływający na zaburzenie homeostazy całego organizmu. Mając na uwadze potrzebę redukcji działań niepożądanych związanych z tradycyjną farmakoterapią, ograniczenie polipragmazji oraz wsparcie klasycznych metod leczenia przeciwzapalnego aktywnie poszukuje się nowych substancji przeciwzapalnych, także w obszarze surowców pochodzenia naturalnego (zarówno jako leki, suplementy czy składniki codziennej diety).

Pomimo rosnącego popytu na nowe generacje środków farmaceutycznych udział preparatów pochodzenia roślinnego jest obecnie szacowany na 25% wszystkich stosowanych farmaceutyków. Tylko w latach 1981-2019 aż 59% nowozatwierdzonych preparatów małowcząsteczkowych wywodziło się ze związków naturalnych i ich pochodnych [177], co w pełni uzasadnia potencjał oraz potrzebę kontynuacji poszukiwania nowych zastosowań dla preparatów znanych z medycyny tradycyjnej lub rozpoczęciem prac nad poznaniem mechanizmów działania surowców do tej pory nieprzebadanych. Coraz częstszym kierunkiem badań jest także poszukiwanie struktur wiodących w znanych i stosowanych surowcach roślinnych, pod kątem lepszego zrozumienia podłoża ich aktywności biologicznej. Co więcej, coraz bardziej powszechne przenikanie się lecznictwa dalekiego wschodu do medycyny europejskiej, niejako wymusza prowadzenie badań potwierdzających skuteczność i bezpieczeństwo stosowanych preparatów, opartych na surowcach azjatyckich.

Pragnąc wpisać się w powyższy kontekst badawczy, w ramach niniejszej pracy zwrócono uwagę na dwa gatunki roślin z rodziny Oliwkowatych, pod kątem korelacji pomiędzy związkami dominującymi w ich składzie, a potencjalną aktywnością przeciwzapalną i modulującą akumulację cholesterolu w modelach *in vitro*. Z uwagi na szeroki zakres działania przeciwdrobnoustrojowego, przeciwzapalnego i antyoksydacyjnego, rośliny z tej grupy stanowią ważny element fitoterapii krajów europejskich (rodzaj *Fraxinus* L.) i Dalekiego Wschodu (np. Chiny czy Japonia) (rodzaj *Forsythia* Vahl). Złożoność składu fitochemicznego roślin z rodziny Oleaceae, warunkowana obecnością szerokiej gamy substancji z grup fenyloetanoidów, sekoirydoidów, kwasów fenolowych, flawonoidów czy lignanów niesie za sobą wiele zastosowań fitoterapeutycznych, które wciąż są badane pod kątem potencjalnego wykorzystania w terapii przewlekłych chorób niezakaźnych (ang. *Noncommunicable diseases*, NCDs) [3,16].

W związku z powszechnym wykorzystaniem terapeutycznym w krajach azjatyckich owoców rodzaju *Forsythia*, o udowodnionej skuteczności przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej i przeciwdrobnoustrojowej [213], biorąc jednak pod uwagę brak owocowania forsycji w klimacie umiarkowanym, w niniejszej pracy postanowiono określić potencjalną aktywność biologiczną liści tego rodzaju jako powszechnie dostępnego na obszarze europejskim źródła substancji aktywnych. Wybór liści gatunku *Forsythia* do poszerzonych badań fitochemicznych oraz biologicznych był także podyktowany wysoką zawartością związków o stosunkowo wysokim stopniu lipofilności (lignany), wyróżniającym je na tle grupy innych związków polifenolowych. Wysoka lipofilność związków przekłada się m.in. na ich łatwiejszy transport przez błony komórkowe, większe powinowactwo do wiązania się z białkami osocza czy kumulację i stopień aktywności w tkankach docelowych [214,215]. Ważną rolę w wyborze surowca odegrał także brak potencjału alergizującego (często wymienianego pod kątem stosowania roślin z innych grup np. z rodziny Asteraceae) liści badanych gatunków forsycji oraz wcześniejsze doniesienia o jej zastosowaniu jako rośliny jadalnej [216,217].

W ramach realizacji niniejszej pracy kompleksowej analizie fitochemicznej poddano liście pochodzące z trzech gatunków rodzaju *Forsythia* – dwóch spotykanych powszechnie na terenie Polski – forsycji pośredniej (*Forsythia* × *intermedia*) oraz forsycji zwisłej (*Forsythia suspensa* L.), a także europejskiego gatunku endemicznego – forsycji europejskiej (*F. europaea*). Przeprowadzona analiza LC-DAD-ESI-MS/MS umożliwiła identyfikację 24 polifenolowych metabolitów wyspecjalizowanych, których obecność potwierdzono w badanych wyciągach, przygotowanych z liści zebranych w różnych porach wegetacji. Pośród zidentyfikowanych polifenoli potwierdzono obecność m.in. 11 lignanów, 6 fenyloetanoidów, 3

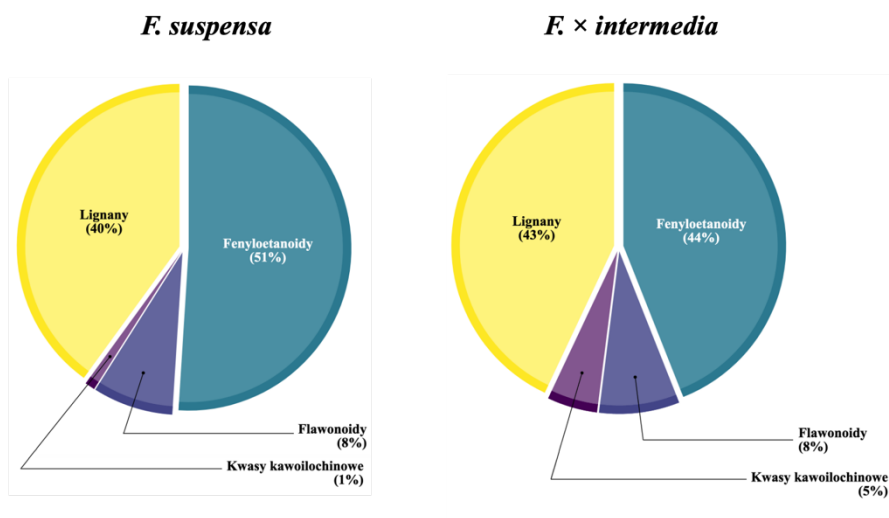
flawonoidów oraz 2 kwasów fenolowych, co stanowiło klarowne podsumowanie składu badanych surowców. Z uwagi na dużą dostępność liści na terenie Polski oraz obiecujący profil fitochemiczny, do dalszych etapów pracy wytypowano liście gatunku *F. suspensa* oraz *F. × intermedia*.

Różnice w zawartości metabolitów wtórnych odpowiedzialnych za farmakologiczne działanie surowca warunkują potrzebę określenia optymalnego czasu zbioru oraz zasadność stosowania wybranego organu roślinnego w fitoterapii czy suplementacji. W badaniu Jia i wsp. oceniono skład oraz aktywność biologiczną owoców gatunku *Forsythia* wskazując na wyższą zawartość aktywnych metabolitów wtórnych w owocach zebranych we wrześniu, w porównaniu z grupą zebraną w październiku, co miało przełożenie na wyższą aktywność antyoksydacyjną [25]. Podobnie w badaniu Qu i wsp. porównano stopień aktywności przeciwdrobnoustrojowej dojrzałych i niedojrzałych owoców forsycji zwisłej. Jak wykazano różnice w nasileniu tej aktywności wynikały ze zróżnicowanej procentowej zawartości fenyloetanoloidów oraz flawonoidów w składzie surowca, w zależności od czasu jego zbioru [218]. Z kolei badanie Jiao i wsp. było pierwszym doniesieniem porównującym aktywność liści forsycji zbieranych na terenie Chin w pięciu różnych porach wegetacji, prezentującym różnice w potencjale antyoksydacyjnym poszczególnych grup, przy najwyższej skuteczności wyciągów przygotowanych z liści zbieranych w drugiej połowie kwietnia [24]. Nawiązując do badania Jiao i wsp. [24] jednym z etapów podjętych w ramach realizacji niniejszej pracy była także ocena aktywności przeciwzapalnej wyciągów alkoholowo-wodnych, przygotowanych z liści *F. suspensa* oraz *F. × intermedia*.

Uwzględniając potencjalny okres występowania liści w europejskiej strefie klimatycznej, przypadający na okres kwiecień - wrzesień, w ramach współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi przeanalizowaliśmy aktywność biologiczną czterech wyciągów, przygotowanych z liści dwóch gatunków forsycji zebranych w różnych porach wegetacji. Ocena zawartości poszczególnych grup związków polifenolowych w badanych wyciągach, przygotowana w ramach realizacji pracy dyplomowej w Katedrze Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, przedstawiona na poniższych wykresach kołowych (**rycina 62**), wskazywała na istotne zróżnicowanie procentowej zawartości związków z grupy lignanów, fenyloetanoloidów, flawonoidów oraz kwasów kawoilochinowych, w zależności od gatunku macierzystego oraz czasu zbioru surowca, co znalazło późniejsze przełożenie na różnice w ich aktywności biologicznej [19].

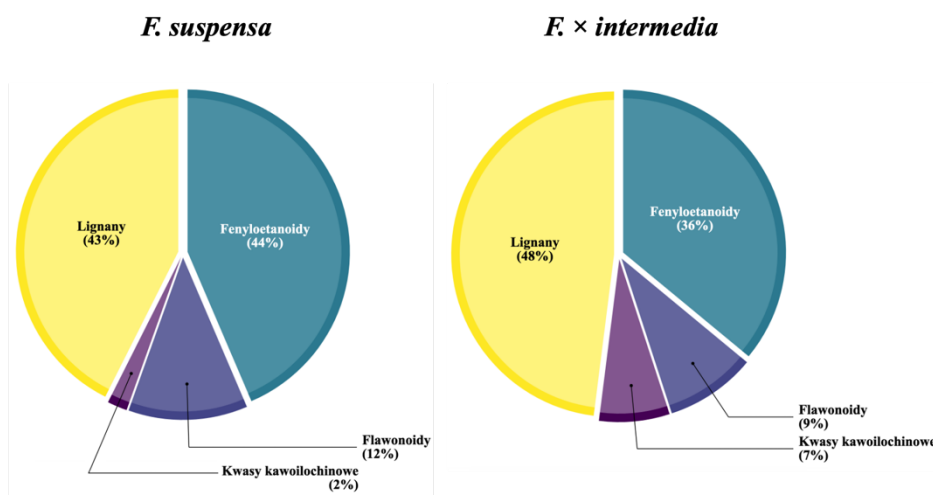
A.

WRZESIEŃ



B.

MAJ



Rycina 62: Procentowa zawartość wybranych grup polifenoli zidentyfikowanych w ekstraktach metanolowo-wodnych (75% v/v) przygotowanych z liści forsycji pośredniej oraz forsycji zwisłej, zebranych we wrześniu (A) oraz w maju (B). Na podstawie: [19].

Każdy z czterech analizowanych wyciągów z liści forsycji, badany w stężeniu 50 µg/ml wykazywał znamienne wpływy hamujące wydzielanie wiodących mediatorów stanu zapalnego tj. TNF-α i IL-6 w modelu monocytów/makrofagów PBMC, stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS (**rycina 23 A, B**). Najaktywniejszym z wyciągów pod kątem sumarycznego wpływu na czynniki prozapalne okazał się jednak wyciąg przygotowany z liści forsycji zwisłej, zebranych w porze wiosennej (wyciąg III), z dominującą zawartością forsytozydu A i filiryny jako składników wiodących. Szczególną uwagę należy zwrócić na wpływ wspomnianego wyciągu na wydzielanie TNF-α, które zostało zahamowane do poziomu $38,6 \pm 6,0\%$ (***) $p < 0,001$), działając na poziomie aktywności kontroli pozytywnej – deksametazou (20 µM) (49,7

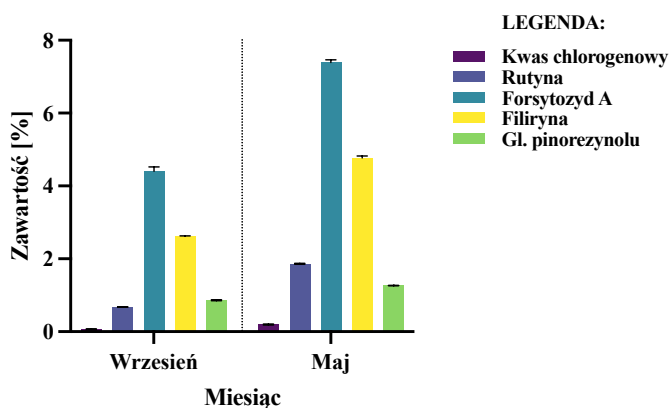
$\pm 8,9\%$). Analiza wpływu omawianego wyciągu na poziom wydzielania czynników przeciwzapalnych, tj. TGF- β (zaprezentowany na **rycynie 24**), wskazuje na wzrost sekrecji tej cytokiny odpowiednio do poziomu $157,1 \pm 14,2\%$ (** $p < 0,01$), przy wartości $153,0 \pm 19,9\%$ (* $p < 0,05$) osiągniętej po zastosowaniu wyciągu II (*F. \times intermedia* – wrzesień), co wydaje się być niezwykle obiecujące w kontekście właściwości TGF- β , jako czynnika hamującego odpowiedź prozapalną makrofagów aktywowanych przez ligandy TLR [219]. Bardzo ciekawą obserwacją był także znamieny wpływ wszystkich czterech analizowanych wyciągów na wzrost ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni monocytów/makrofagów PBMC (zaprezentowany na **rycynie 25**), który mieścił się w zakresie od $372,0 \pm 88,7\%$ do $437,0 \pm 92,1\%$, w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS (100% ekspresji) (** $p < 0,001$), wskazując na potencjalnie plejotropowe mechanizmy działania przeciwzapalnych wyciągów z liści forsycji. W przeciwieństwie do wyciągu przygotowanego z liści forsycji zwisłej zebranych w porze wiosennej, najmniejszą aktywność przeciwzapalną w badanym modelu komórkowym wykazywał wyciąg przygotowany z liści tego gatunku, zebranych jesienią (**ryciny 23-25**).

Szczegółowa analiza ilościowa składu poszczególnych wyciągów metanolowo-wodnych (75:25 v/v), przeprowadzona metodą HPLC-PDA w Katedrze Farmakognozji UM w Łodzi pozwoliła na skorelowanie otrzymanych przez mnie wyników ich aktywności biologicznej, z obecnością poszczególnych struktur, jako związków w dużej mierze odpowiedzialnych za aktywność przeciwzapalną liści forsycji. Głównymi związkami czynnymi wyciągów przygotowanych z liści forsycji zwisłej, zebranych we wrześniu oraz w maju był **forsytozyd A** i **filiryna**, przy czym fenyletanoide był związkiem dominującym (**rycina 63 oraz tabela 24**). Związkami, których obecność również zaobserwowano w wyciągach z liści forsycji zwisłej był glukozyd pinorezynolu, a także rutyna [19].

W przypadku wyciągów przygotowanych z liści forsycji pośredniej można zaobserwować większe zróżnicowanie w zawartości dominujących składników aktywnych, w zależności od czasu zbioru surowca (**rycina 64 oraz tabela 25**). Związkiem lignanowym dominującym w liściach zebranych wczesną wiosną była **arktyina**, podczas gdy w liściach zebranych jesienią obecność **filiryny** i **arktyiny** była porównywalna [19]. W obu przypadkach towarzyszącymi związkami dominującymi były tak jak w przypadku forsycji zwisłej, **forsytozyd A** i **werbaskozyd**.

Przeprowadzona przez mnie analiza LC-DAD-ESI-MS/MS, zaprezentowana na **rycynie 16** oraz w **tabela 20** w pełni koreluje z powyższymi danymi.

Forsythia suspensa

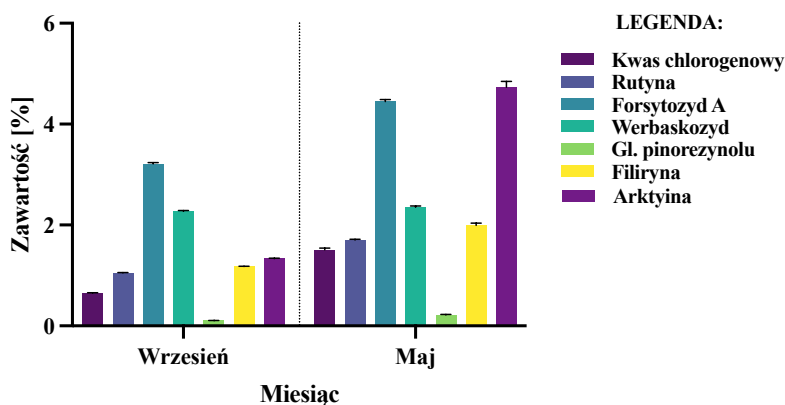


Rycina 63: Procentowa zawartość wybranych związków polifenolowych w wyciągu metanolowym, przygotowanym z liści forsycji zwisłej (*F. suspensa*) zebranych w 2 różnych porach wegetacji.

Tabela 24: Analiza ilościowa składu wyciągu metanolowego przygotowanego z liści forsycji pośredniej (*F. suspensa*), zebranych w 2 różnych porach wegetacji, wartości podane jako wartości procentowe.

Zidentyfikowany związek Czas zbioru	Kwas chlorogenowy	Rutyna	Forsytozyd A	Glukozyd pinorezynolu	Filiryna
Wrzesień	0,1 ± 0,01	0,7 ± 0,01	4,4 ± 0,12	0,9 ± 0,02	2,6 ± 0,01
Maj	0,2 ± 0,01	1,8 ± 0,02	7,4 ± 0,07	1,3 ± 0,01	4,8 ± 0,06

Forsythia × intermedia

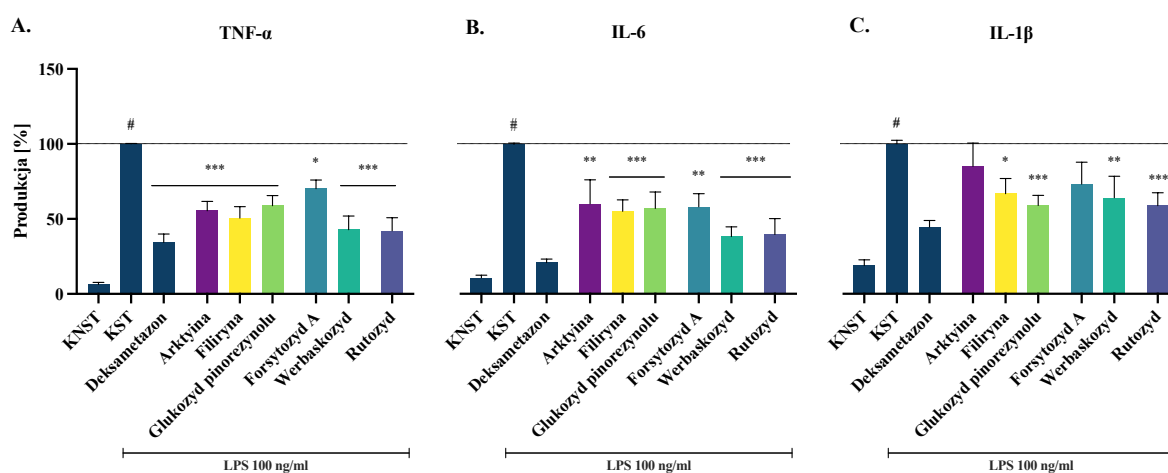


Rycina 64: Procentowa zawartość wybranych związków polifenolowych w wyciągu metanolowym przygotowanym z liści forsycji pośredniej (*F. × intermedia*), zebranych w 2 różnych porach wegetacji.

Tabela 25: Analiza ilościowa składu wyciągu metanolowego przygotowanego z liści forsycji pośredniej (*F. × intermedia*), zebranych w 2 różnych porach wegetacji, wartości podane jako wartości procentowe.

Zidentyfikowany związek Czas zbioru	Kwas chlorogenowy	Rutyna	Forsytozyd A	Werbaskozyd	Glukozyd pinorezynolu	Filiryna	Arktyina
Wrzesień	0,7 ± 0,01	1,1 ± 0,01	3,2 ± 0,03	2,3 ± 0,02	0,1 ± 0,01	1,8 ± 0,01	1,3 ± 0,01
Maj	1,5 ± 0,04	1,7 ± 0,02	4,5 ± 0,04	2,4 ± 0,02	0,2 ± 0,01	2,0 ± 0,05	4,7 ± 0,11

Powyższe dane prezentujące procentowy udział pojedynczych związków z grupy polifenoli w składzie poszczególnych wyciągów, korelują z hipotezą, wskazującą na wkład związków z różnych grup metabolitów wyspecjalizowanych (lignanów, fenyloetanoidów i flawonoidów) w sumarycznym działaniu przeciwzapalnym liści forsycji. Szczególną uwagę zwraca aktywność trzech głównych lignanów występujących w omawianym gatunku – arktyiny, filiryny oraz glukozydu pinorezynolu, a także dwóch przedstawicieli fenyloetanoidów – forsytozydu A i werbaskozydu oraz flawonoidu – rutozydu (rutyny), której obecność potwierdzono niezależnie od gatunku i pory zbioru surowca. Wyższa zawartość poszczególnych związków w wyciągach z surowca zebranego wczesną wiosną tj. forsytozydu A, filiryny i rutyny w przypadku forsycji zwistej oraz arktyiny, filiryny, forsytozydu A i rutyny w przypadku forsycji pośredniej koreluje bezpośrednio ze znamioną aktywnością przeciwzapalną powyższych struktur (badanych w stężeniu 20 μ l), która została podsumowana na poniższej rycinie (**rycina 65**).



Rycina 65: Sekrecja **A.** TNF- α , **B.** IL-6 **C.** IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (20 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

W oparciu o ocenę zawartości związków czynnych z grupy lignanów i fenyloetanoidów oraz flawonoidów, w poszczególnych wyciągach roślinnych do dalszych analiz (w tym izolacji jednorodnych związków chemicznych) wytypowano 2 gatunki liści forsycji zebranych wczesną wiosną. Według Farmakopei Chińskiej związkami markerowymi warunkującymi ocenę jakości ekstraktów przygotowanych z liści gatunku *Forsythia suspensa* są **forsytozyd A** i **filiryna** [37], co zostało również zaakcentowane w niniejszej pracy, zarówno pod kątem najwyższej zawartości tych związków w wyciągach przygotowanych z liści forsycji zwistej (zebranej

w maju), oraz izolacji powyższych związków (odpowiednio 10257,8 i 479,4 mg), w ilościach pozwalających na określenie ich aktywności biologicznej.

W oparciu o analizę fitochemiczną poszczególnych frakcji, podjęto próbę izolacji innych, jednorodnych związków z grupy lignanów i fenyloetanoidów, upatrując w nich pozostałe punkty uchwytu działania przeciwzapalnego liści forsycji. Izolacja związków z dwóch powyższych grup stanowiła uzupełnienie panelu związków uprzednio wyizolowanych w Katedrze Biologii Farmaceutycznej z innych gatunków należących do rodziny Oleaceae. Analiza fitochemiczna oraz izolacja jednorodnych struktur poprzedziła analizę aktywności biologicznej związków z powyższych grup chemicznych, co zostanie omówione w kolejnych akapitach niniejszej dyskusji.

Drugim analizowanym surowcem, mającym zastosowanie jako tradycyjny, roślinny produkt leczniczy były liście jesionu wyniosłego, których stosowanie wynika z wieloletniej tradycji, popartej jednak niewielką ilością badań biologicznych oraz klinicznych. Powszechne występowanie gatunku *Fraxinus* w krajach Europy, Azji i Ameryki Północnej przekłada się jednak na częstsze wykorzystanie tego surowca w leczeniu europejskim niż w przypadku liści forsycji. Preparaty z liści jesionu, podawane w formie naparu lub nalewek, od starożytności były elementem terapii w stanach kataralnych, gorączce, reumatyzmie, nerwobólach, a także do stosowania zewnętrznego w trudnogojących się ranach czy trądziku. Aktualnie dostępne na polskim rynku farmaceutycznym preparaty z liści, kory i pączków jesionu (głównie gatunku *Fraxinus excelsior* L.) występują w postaci kapsułek, kropli lub sypkich ziół do przygotowania naparów. Wśród zaleceń do ich stosowania, oprócz wskazań wynikających z tradycji ludowych, a także wytycznych Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicine Agency*, EMA), zalecających stosowanie liści jesionu we wspomagającej terapii bólu reumatycznego o niskim nasileniu, a także w pomocniczej terapii infekcji dróg moczowych, wymieniane są: wspomaganie utraty nadmiernej masy ciała oraz usprawnienie pasażu jelitowego i procesu trawienia [9,195]. W niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmów działania przeciwzapalnego naparu, jego frakcji i poszczególnych subfrakcji, przygotowanych z liści jesionu, w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC, a także identyfikacji związków odpowiedzialnych za tę aktywność.

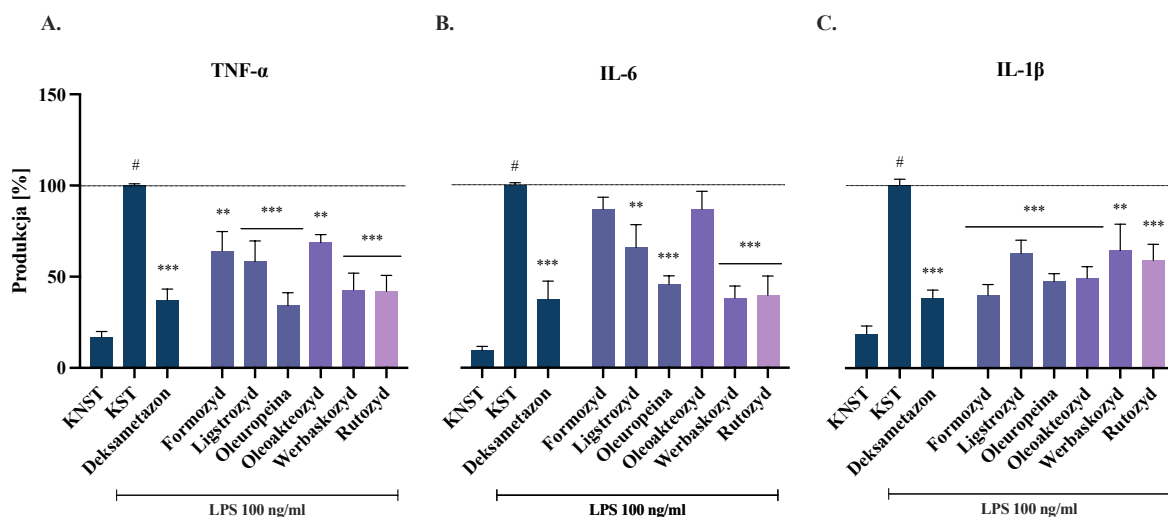
Ocena działania wyjściowego roztworu badanego – naparu pozwoliła na potwierdzenie znamiennego statystycznie wpływu tej formy podania surowca na hamowanie wydzielania cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6), w przyjętym modelu komórkowym. W toku badań zaobserwowano silną inhibicję uwalniania TNF- α i IL-6 odpowiednio do poziomu $33,2 \pm 4,3\%$

(***p < 0,001) i $57,8 \pm 7,3\%$ (**p < 0,01) po zastosowaniu naparu (**rycina 27 A, B**). Kontynuację badań stanowiła analiza aktywności przeciwzapalnej metanolowych frakcji naparu o rosnącej procentowości rozpuszczalnika (H₂O, MeOH 20%, 50%, 70%, 100%), z których najaktywniejszymi okazały się frakcje metanolowe 20 i 50% (**rycina 27 A, B**). Warto również zauważyć, że żadna z badanych frakcji surowca nie wykazywała istotnego wpływu stymulującego uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej na poziomie większym niż 15%, co świadczy o braku ich toksyczności w przyjętym modelu badawczym (**rycina 26**).

Szersze spojrzenie w ujęciu fitochemicznym na analizowane subfrakcje wyciągów metanolowych 20% i 50%, pozwoliło także na wskazanie związków dominujących w ich składzie, co poprzedziło izolację związków metodą chromatografii preparatywnej, oraz ocenę ich aktywności *in vitro*. W toku analizy najaktywniejszymi subfrakcjami okazały się te, zawierające związki z grupy fenoloetanoidów tj. **werbaskozyd** czy **oleoaktozyd** i sekoirydoidów tj. **oleuropeina** i **ligstrozyd** oraz flawonoidów tj. **rutozyd**.

Wszystkie badane związki (**oleuropeina, ligstrozyd, formozyd, oleoaktozyd, werbaskozyd, rutozyd**) zidentyfikowane lub wyizolowane z najaktywniejszych subfrakcji liści jesionu wyraźnie hamowały, stymulowane przez LPS uwalnianie cytokin prozapalnych w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC, co zostało podsumowane na poniższych wykresach słupkowych (**rycina 66 A, B, C**).

Wszystkie z badanych związków hamowały sekrecję TNF- α w sposób znamieny statystycznie osiągając wartości w zakresie od $42,0 \pm 8,8$ do $66,8 \pm 4,3\%$, w porównaniu z kontrolą stymulowaną (100% sekrecji) (**rycina 66 A**). Formozyd i oleoaktozyd wyróżniały się także hamującym wpływem na wydzielanie IL-1 β , prowadząc do ograniczenia wydzielania tej cytokiny do poziomu odpowiednio $39,7 \pm 5,9\%$ (***p < 0,001) oraz $49,1 \pm 6,3\%$ (***p < 0,001), w stosunku do kontroli stymulowanej LPS (wartość odniesienia jako 100%) (**rycina 66 C**). Z uwagi na fakt, że redukcja wydzielania IL-1 β przyczynia się także do zmniejszenia jej autokrynnej zdolności do stymulacji syntezy innych cytokin (np. TNF- α , IL-8) i ROS [220], wskazana obserwacja może stanowić o dodatkowym pośrednim mechanizmie działania badanych związków. Zarówno formozyd jak i oleoaktozyd nie wpływały jednak na poziom wydzielanej IL-6, w przeciwieństwie do rutozydu i werbaskozydu, redukujących stopień wydzielania powyższej cytokiny do wartości zbliżonych do 40,0% (***p < 0,001), w stosunku do 100% wydzielania przez komórki stymulowane.



Rycina 66: Sekrecja **A.** TNF- α , **B.** IL-6 **C.** IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (20 μ M). Wyniki przedstawiono jako procent wydzielania względem kontroli stymulowanej LPS (KST, 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią \pm SEM. Deksametazon użyto w stężeniu 20 μ M. Do określenia różnic między grupami, zastosowano test ANOVA, z testem post hoc Dunnetta; # < 0,001 – różnica względem kontroli niestymulowanej (KNST), **p < 0,01; ***p < 0,001.

Głównym przedstawicielem grupy sekoirydoidów, obecnym w liściach jesionu wyniosłego jest oleuropeina, o dobrze udokumentowanych właściwościach przeciwzapalnych, hipoglikemizujących, kardioprotekcyjnych i immunomodulujących [85]. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie są zgodne z wcześniejszymi badaniami prowadzonymi na innych modelach badawczych, potwierdzających mechanizm działania oleuropeiny oparty o hamowanie aktywacji szlaków NF- κ B i MAPK oraz wynikający z tego spadek sekrecji cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ), a także wzrost sekrecji cytokin przeciwzapalnych, związanych z podtypem makrofagów M2 (IL-10 i TGF- β) [221]. W modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC oleuropeina hamowała wydzielanie TNF- α do poziomu $36,9 \pm 6,3\%$ (**p < 0,001), IL-6 do poziomu $45,6 \pm 4,7\%$ (**p < 0,001) oraz IL-1 β do poziomu $47,3 \pm 4,2\%$ (**p < 0,001), spójnie z wcześniejszymi doniesieniami [222,223]. W nawiązaniu do badań Cui i wsp., którzy opisali wpływ oleuropeiny na hamowanie dimeryzacji TLR4 oraz aktywacji szlaku MyD88-zależnego, w warunkach podwyższonego stężenia LPS, wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie mogą stanowić podstawę do pełnego wyjaśnienia mechanizmu działania oleuropeiny w modelu komórek układu odpornościowego, w przebiegu wielu chorób o podłożu zapalnym [224].

W toku dyskusji wyników otrzymanych dla pojedynczych związków, dominujących w liściach jesionu, warto także zauważyć powszechną obecność niektórych z nich np. oleoaktozydu w innych surowcach pochodzących z roślin, należących do rodziny Oleaceae w tym, w kwiatach lilaka pospolitego [180]. Ponadto, wyniki aktywności przeciwzapalnej

oleoakteozydu zaprezentowane w niniejszej rozprawie są jednymi z pierwszych dostępnych w literaturze, co może stanowić istotny wkład w stan wiedzy dotyczący podłoża aktywności komórkowej surowców roślinnych z rodziny Oliwkowatych.

Sygnalizacja IL-10 i receptora dla IL-10, ze względu na swoje plejotropowe i pozornie sprzeczne właściwości, odgrywa kluczową rolę w nadzorowaniu odpowiedzi immunologicznej organizmu. Głównym zadaniem tej cytokiny jest zachowanie równowagi w udziale procesów prozapalnych i przeciwzapalnych, w celu zapewnienia ochrony układu macierzystego przed nadmierną ekspozycją immunologiczną i uszkodzeniem tkanek [225]. Elementem nowości w zakresie zrozumienia mechanizmów działania naparów z liści jesionu była ocena wpływu poszczególnych frakcji oraz subfrakcji, a także związków w nich dominujących na ekspresję receptora dla IL-10 w przyjętym modelu komórkowym. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że inkubacja komórek z naparem, frakcjami, a także poszczególnymi subfrakcjami inicjowała znaczący wzrost ekspresji IL-10R na powierzchni monocytów/makrofagów PBMC. Co ciekawe, większą skuteczność wykazywały subfrakcje wyciągu metanolowego 50% niż 20% (średnia ekspresja odpowiednio $332,0 \pm 26,9\%$ vs. $140,0 \pm 3,0\%$). Znamiennej aktywnością odznaczały się także wyciągi metanolowe 70% i 100%, inicjujące wzrost ekspresji receptora odpowiednio do poziomu $504,0 \pm 9,6\%$ ($***p < 0,001$) oraz $362,0 \pm 12,8\%$ ($***p < 0,001$), w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (100% ekspresji), co zaprezentowano na **rycinach 28 i 29**. W odniesieniu do poszczególnych związków dominujących w najaktywniejszych subfrakcjach, znamiennej wpływ na ekspresję receptora IL-10 wykazywały związki z grupy fenyloetanoidów i sekoirydoidów. Oleuropeina, a także werbaskozyd i oleoakteozyd zwiększały ekspresję receptora IL-10 odpowiednio o około $302,0 \pm 19,8\%$, $231,0 \pm 16,7\%$, $248,0 \pm 23,0\%$ ($***p < 0,001$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej (100% ekspresji), co zaprezentowano na **rycinie 32**. Z kolei wpływ aktywności formozydu, ligstrozydu czy rutozydu na ekspresję receptora dla IL-10, nie był znamienne różny od poziomu zbadanego dla grupy kontrolnej ($p > 0,05$).

Uzyskane wyniki dotyczące uwalniania cytokin prozapalnych oraz ekspresji receptora IL-10 mogą wskazywać na synergistyczne działanie związków warunkujące końcowy efekt przeciwzapalny liści jesionu. Odnosząc się wskazań terapeutycznych Europejskiej Agencji Leków, upatrujących efektywnego działania preparatów z liści jesionu w terapii przewlekłych zakażeń dróg moczowych, warto podkreślić badanie Junga i wsp. w którym terapia makrofagami wykazującymi nadekspresję IL-10, miała pozytywny wpływ na zmniejszenie miejscowego stanu zapalnego, przy jednoczesnym wzroście ekspresji proregeneracyjnej lipokaliny-2, chroniącej przed ostrym uszkodzeniem nerek [226]. Biorąc także pod uwagę skład

nacieków zapalnych w przebiegu infekcji pęcherza moczowego uropatogennym szczepem *E. coli*, obfitujących w obecność monocytów, makrofagów i limfocytów [227] opisane wyniki mogą sugerować celowość stosowania naparów z liści jesionu we wspomagającym leczeniu schorzeń układu moczowego. Z uwagi na fakt, że ekspresja receptora IL-10 może być także indukowana w niektórych komórkach niehematopoetycznych tj. fibroblasty, keratynocyty czy komórki nabłonka celowym wydaje się także zastosowanie liści jesionu w formie zewnętrznych okładów w terapii trudnogojących się ran, egzemy czy łuszczycy, zgodnie z wieloletnią tradycją stosowania [228].

Według aktualnego stanu wiedzy na temat terapeutycznego wykorzystania preparatów z liści jesionu, wyniki prezentowane w niniejszej pracy stanowią istotny wkład w stan wiedzy o molekularnych mechanizmach działania surowca. Stanowi to ścisłą korelację z wynikami badań prowadzonych przez Kiss i wsp., potwierdzających aktywność przeciwzapalną i antyoksydacyjną liści jesionu w modelu komórek ludzkich neutrofilii, w której wykazano hamujący wpływ formułacji z liści jesionu na sekrecję IL-1 β , TNF- α , IL-8, MCP-1 oraz ROS [195]. Z uwagi na brak wcześniejszych doniesień potwierdzających aktywność przeciwzapalną liści jesionu w modelu fizjologicznych komórek układu odpornościowego (np. monocytów/makrofagów PBMC), wyniki prezentowane w niniejszej pracy stanowią podstawę do dalszych poszukiwań dla nowych zastosowań terapeutycznych liści jesionu wyniosłego.

Według Światowej Organizacji Zdrowia w przypadku dysfunkcji o charakterze metabolicznym, kluczowym elementem jest profilaktyka, oparta o stosowanie diety i suplementacji bazującej, w dużej mierze, na składnikach pochodzenia naturalnego [212]. Jedną z grup klasyfikowaną jako potencjalny element żywności funkcjonalnej i suplementów diety są związki z grupy polifenoli o ugruntowanym potencjalnie antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym. Z uwagi na ogromną różnorodność struktur chemicznych związków polifenolowych, zakwalifikowanych do 16 podgrup, od wielu lat trwają badania nad różnicami w ich biodostępności i aktywności biologicznej [85,229]. Związki z grupy lignanów, sekoirydoidów i fenyloetanoloidów pozyskane z wcześniejszych izolacji przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej, w tym z roślin rodziny Oleaceae (kwiatów forsycji pośredniej oraz lilaka pospolitego [33,180]), a także związki pozyskane z liści forsycji i jesionu w ramach realizacji niniejszej pracy zostały poddane szczegółowej analizie pod kątem identyfikacji molekularnych mechanizmów ich działania przeciwzapalnego. Dyskusja wyników dla poszczególnych grup związków, otrzymanych w ramach przeprowadzonych badań zostanie podzielona na dwie części, z uwzględnieniem podziału według użytych modeli

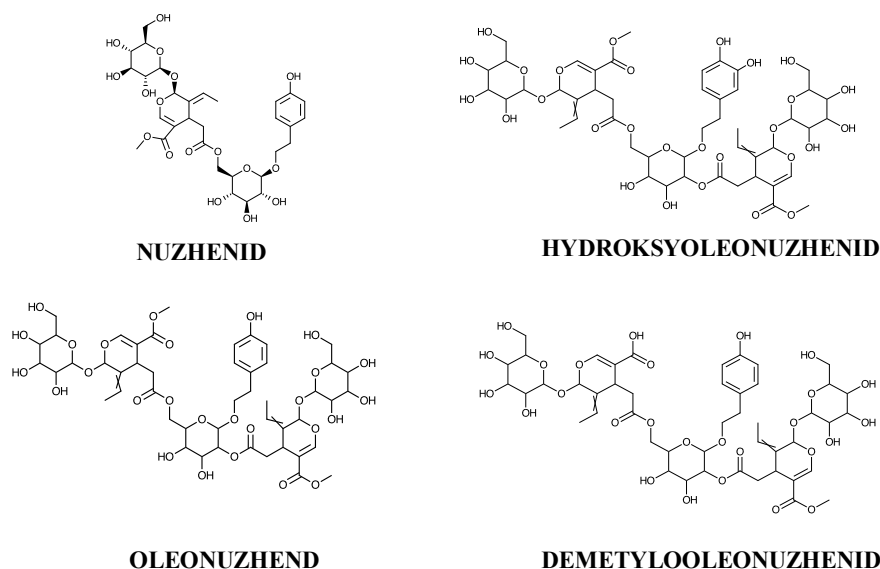
badawczych. Omówienie wyników dla grupy lignanów zostanie ujęte w szerszym kontekście z uwagi na powszechne występowanie tej grupy związków w produktach żywnościowych oraz omawianych surowcach roślinnych z rodziny Oleaceae.

W pierwszym etapie badań określono aktywność badanych związków w modelu komórek prawidłowych – monocytów/makrofagów PBMC, analogicznie do badań przeprowadzonych dla poszczególnych wyciągów roślinnych. Komórki stymulowane roztworem LPS o końcowym stężeniu 100 ng/ml wykazywały znamienne w stosunku do kontroli niestymulowanej sekrecję cytokin prozapalnych tj. TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β . Badanie aktywności związków z grupy sekoirydoidów i fenyloetanoidów pozwoliło na określenie wiodących kierunków aktywności przeciwzapalnej przedstawicieli tych grup, zróżnicowanych pod kątem budowy chemicznej.

Analizując grupę sekoirydoidów, szczególną uwagę zwraca aktywność epiframerozydu, który hamował sekrecję IL-6 do poziomu $30,4 \pm 8,2\%$, w porównaniu z kontrolą stymulowaną (100% sekrecji) (***) $p < 0,001$), działając w tym zakresie najskuteczniej z całej analizowanej grupy sekoirydoidów (**rycina 31 B**).

Grupą związków odznaczającą się istotnym potencjałem działania przeciwzapalnego były także badane pochodne nuzhenidu. Szczególną uwagę zwraca aktywność hydroksyleonuzhenidu, który znamienne statystycznie hamował wydzielanie TNF- α do poziomu $44,5 \pm 6,0\%$ (***) $p < 0,001$), podczas gdy jego wpływ na wydzielanie IL-1 β był porównywalny do aktywności oleuropeiny - $47,5 \pm 13,4\%$ (***) $p < 0,001$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej (**rycina 31 A, C**). Biorąc pod uwagę budowę chemiczną badanych struktur, brak obecności grupy hydroksylowej w cząsteczce oleonuzhenidu, w porównaniu do hydroksyleonuzhenidu zmniejszył efektywność przeciwzapalnego działania związku w kontekście wydzielania IL-6 i IL-1 β . Przeciwnie, analiza aktywności demetylooleonuzhenidu wskazuje wyraźnie, że brak obecności grupy CH₃, w jego budowie strukturalnej mogło wpłynąć negatywnie na inhibicję wydzielania TNF- α i IL-6 (w porównaniu do oleonuzhenidu). Z kolei ekspresja receptora dla IL-10 była dwukrotnie niższa po zastosowaniu oleonuzhenidu, w porównaniu do ekspresji obserwowanej po zastosowaniu sekoirydoidu z dodatkowym podstawnikiem hydroksylowym ($197,0 \pm 39,2\%$ vs. $98,6 \pm 32,3\%$) (**rycina 32, 33**). Co ciekawe, wcześniejsze doniesienia potwierdzają aktywność związku macierzystego - nuzhenidu, w modelach *in vitro* jako efektywnego modulatora wydzielania TNF- α i IL-6 w komórkach makrofagów, na drodze hamowania fosforylacji białek ścieżki NF- κ B oraz jądrowej translokacji podjednostki p65, przy niemal całkowitym braku wcześniejszych doniesień dla jego zmodyfikowanych pochodnych [230]. Analiza wstępnych

efektów działania przeciwzapalnego poszczególnych pochodnych nuzhenidu wydaje się więc kluczowym punktem wyjścia do poszerzonych badań w warunkach *in vivo*. Wzory strukturalne nuzhenidu oraz jego aktywnych biologicznie pochodnych przedstawiono na poniższej rycinie (rycina 67).



Rycina 67: Wzory strukturalne nuzhenidu oraz jego aktywnych biologicznie pochodnych.

Podczas analizy aktywności przeciwzapalnej związków z grupy fenyloetanoidów, szczególną uwagę zwraca ich wpływ na wzrostu ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC. Dla wszystkich badanych związków obserwowana wartość ekspresji receptora była ponad dwukrotnie większa w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (100% ekspresji), co w ogólnej analizie porównawczej, było wynikiem znamionym statystycznie dla wszystkich badanych struktur. Wyjątkiem w badanej grupie związków był glikozyd fenylopropanoidowy – syringina, różniący się od pozostałych pochodnych budową cząsteczki, co może świadczyć o konieczności występowania pełnego ugrupowania fenyloetanoidowego (połączenia glikozydowego alkoholu fenyloetylowego acylowanego w części cukrowej pochodnymi kwasu cynamonowego) do pobudzenia ekspresji IL-10R.

Ponadto, forsytozyd B charakteryzował się bardzo efektywnym hamowaniem sekrecji TNF- α - $38,6 \pm 4,8\%$ (** $p < 0,001$), podczas gdy zarówno forsytozyd A jak i forsytozyd B hamowały wydzielanie IL-6 na podobnym poziomie, odpowiednio do $58,1 \pm 8,7\%$ i $63,5 \pm 5,9\%$ (* $p < 0,05$) (**rycina 31 A, B**). Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy, świadczące o aktywności przeciwzapalnej forsytozydu B (20 μ M) były jednak sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami, które dowodziły całkowitego braku aktywności przeciwzapalnej dla tego

związku, w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC, potwierdzając konieczność poszerzonych analiz w tym, oraz innych modelach badawczych [179].

Otrzymane wyniki dla związków z dwóch powyższych klas chemicznych stanowią komplementarne uzupełnienie badań przeprowadzonych przez naszą grupę badawczą na modelu ludzkich neutrofilii, izolowanych z krwi obwodowej [180], stanowiąc kompleksowe podsumowanie raportujące ich wpływ na komórki układu odpornościowego. Warto jednak zauważyć, że działanie związków okazało się efektywniejsze w modelu monocytów/makrofagów PBMC niż komórek neutrofilii, nawet przy niższych wartościach zastosowanych stężeń (20 μ M).

Kolejną grupą związków polifenolowych, których aktywność przeciwzapalną analizowano w ramach realizacji niniejszej pracy były związki z grupy lignanów. Szczególna uwaga poświęcona grupie lignanów wynika z niewystarczającej ilości badań potwierdzających szczegółowe mechanizmy działania tych związków na poziomie molekularnym, a także dużej różnorodności struktur w obrębie grupy, co przekłada się na często nieoczywiste różnice w zakresie właściwości biologicznych poszczególnych związków. Istotnym ograniczeniem poznania korelacji wpływu poszczególnych związków lignanowych, a zmniejszeniem występowania chorób o podłożu zapalnym jest niska zawartość pojedynczych związków z grupy lignanów w produktach żywnościowych, pomimo relatywnie wysokiej, całkowitej zawartości sumy lignanów w poszczególnych produktach spożywczych. Jako główne źródła lignanów w diecie europejskiej wymieniane są nasiona oleiste, orzechy, zboża, warzywa (gatunki kapustne), owoce i napoje (herbata, kawa, piwo i wino). O powszechnej obecności lignanów w diecie może świadczyć badanie Pelavo i wsp. którzy oszacowali zawartość lignanów w produktach spożywczych i napojach, w ilościach od 0 dla bananów do 400 mg/100 g sumy lignanów w suchej masie nasion lnu i sezamu, przy czym z puli 86 badanych produktów spożywczych tylko jeden nie zawierał lignanów [231,232].

Brak dokładnego poznania mechanizmów działania lignanów może wynikać również ze stosunkowo niskiego spożycia produktów bogatych w związki z tej grupy polifenoli, które waha się od 0,44 do 2,2 mg sumy lignanów/dzień w różnych krajach europejskich co może być związane z różnorodnością nawyków żywieniowych, stopniem przetworzenia produktów oraz znacznego wpływu „diety zachodniej” w krajach Ameryki Północnej oraz Europy Środkowo-Zachodniej. Ponadto badania epidemiologiczne prowadzone na przestrzeni lat dowodzą różnic w ilości poszczególnych związków lignanowych dominujących w dietach w zależności od badanego obszaru geograficznego, np. w Holandii i Finlandii dominującymi lignanami

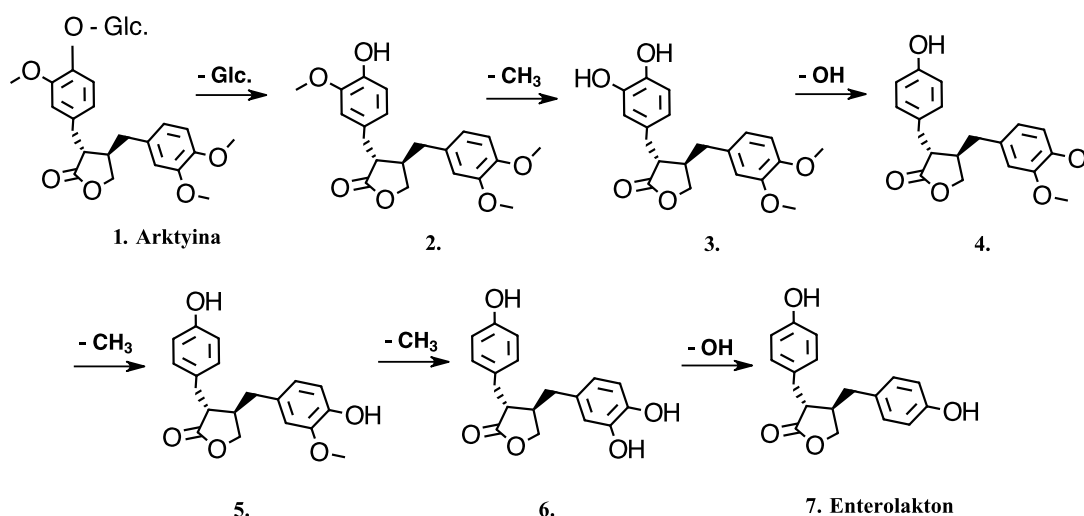
w codziennej diecie są pinorezynol i laricirezynol, podczas gdy w diecie Polaków dominują sekoizolaricirezynol oraz pinorezynol. Z kolei w diecie łotewskich kobiet i mężczyzn dominują syringarezynol oraz sekoizolaricirezynol, co przypisuje się większemu spożyciu owoców jagodowych oraz żyta [233]. Jednym z możliwych sposobów na zwiększenie ilości spożytych lignanów w codziennej diecie jest wzrost udziału produktów pochodzenia roślinnego, w których zawartość lignanów szacowana jest w ilościach od $\mu\text{g/g}$ do nawet mg/g suchej masy produktu, a także wprowadzenie racjonalnej suplementacji uzupełniającej codzienne nawyki żywieniowe. Przykładowe produkty spożywcze zawierające określone grupy związku z grupy lignanów wraz ze wskazaniem ich zamiennego źródła w odpowiednim materiale roślinnym podsumowano w poniższej tabeli (**tabela 26**).

Tabela 26: Podsumowanie zawartości związków z grupy lignanów w produktach spożywczych oraz surowcach roślinnych [234].

Nazwa związku	Produkt spożywczy	Przykładowa obecność w surowcach roślinnych
Filigenina Filiryna	-	<i>Forsythia</i> × <i>intermedia</i> , <i>Forsythia suspensa</i> (liście, kwiaty, owoce) <i>Chionanthus virginicus</i> (kora)
Sekoizolaricirezynol Diglukozyd sekoizolaricirezynolu	Nasiona lnu, orzechy ziemne; nasiona pszenicy, jęczmienia, owsa Warzywa: brukselka, czosnek Owoce: pomarańcza, jeżyny, borówki, czarna porzeczka, kiwi, Inne: herbata, kawa, mleko i jego przetwory	<i>Linum</i> L. (nasiona)
Pinorezynol Dlukozyd pinorezynolu	Nasiona lnu i sezamu, produkty zbożowe Warzywa: brokuły, kapusta biała, czosnek Owoce: morela, awokado, truskawka, brzoskwinia Oliwa z oliwek (extra virgin) Inne: tofu, kakao, czekolada, wino	<i>Eucommnia ulmoides</i> Oliv. (kora) <i>Forsythia suspensa</i> (liście, kwiaty, owoce) <i>Acanthopanax sessiliflorus</i> (owoce) <i>Chionanthus virginicus</i> (kora)
Matairezynol Glukozyd matairezynolu	Nasiona lnu i sezamu Owoce: pomarańcza, nektarynka, mango, morela, melon	<i>Forsythia</i> × <i>intermedia</i> , <i>Forsythia suspensa</i> (liście, kwiaty, owoce) <i>Linum</i> L. (nasiona), <i>Sesamum</i> L. (nasiona)
Sezaminol	Nasiona sezamu	<i>Sesamum</i> L. (nasiona)
Arktyina Arktygenina	-	<i>Forsythia</i> × <i>intermedia</i> (liście, kwiaty) <i>Arcium lappa</i> (owoce)

Lignany, których obecność potwierdzono w pożywieniu i/lub surowcach naturalnych np. matairezynol, laricirezynol, pinorezynol, arktyina czy sezamina są metabolizowane w jelicie przez mikrobiotę jelitową do aktywnych metabolitów określanych jako enterolignany. Procesy konwersji zachodzące z udziałem szeregu szczepów bakteryjnych, w szczególności produkujących β -glukozydazy (m.in. *Bacteroidales* spp. i *Clostridiales* spp.), a także postępujących procesów deglikozylacji, dehydroksylacji, demetylacji i odwodornienia prowadzą do powstawania enterodiolu i enterolaktonu oraz licznych produktów pośrednich

[235-237], których rola w organizmie człowieka jest wciąż przedmiotem szczegółowych badań [238,239]. Przykładowy proces biotransformacji arktyny do enterolaktonu przedstawiono na poniższej rycinie (**rycina 68**) [240].



Rycina 68: Procesy biotransformacji arktyny z udziałem mikrobioty jelitowej. 1– arktyna; 2 – arktigenina; 3, 4, 5,6 – metabolity pośrednie; 7 – enterolakton [240].

Wcześniejsze doniesienia potwierdzały m.in. możliwość wywierania słabego działania estrogennego lub antyestrogenowego przez enterolignany, z uwagi na ich strukturalne podobieństwo do najbardziej dominującej i aktywnej formy estrogenu, 17 β -estradiolu [241]. Ponadto w badaniach *in vitro* oceniono aktywność antyoksydacyjną enterodiolu i enterolaktonu [238,242], jednak ich działanie przeciwzapalne na komórkach monocytów/makrofagów PBMC nie zostało dotąd zbadane. W celu porównania aktywności enterolignanów do zaprezentowanych w **rozdziale 4.4** właściwości lignanów w formie połączeń cukrowych oraz wolnych aglikonów przeprowadzono analizę działania przeciwzapalnego tzw. lignanów ssaczych na modelu izolowanych komórek monocytów/makrofagów PBMC. Aktywność zarówno enterodiolu jak i enterolaktonu, prezentowała wyraźny kierunek przeciwzapalny, przy silniejszej aktywności enterolaktonu w odniesieniu do hamowania wydzielania TNF- α i IL-1 β (**rycina 35**). Istotnym wkładem w stan wiedzy na temat mechanizmów działania enterolignanów jest jednak wyraźny wzrost ekspresji receptora IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po inkubacji z enterolaktonem, znamiennej statystycznie i zależny od stężenia (**ryciny 36, 37**).

Warto również zaznaczyć, że część spożytych związków lignanowych nie jest trawiona, czemu dowodzi ich obecność w moczu, ślinie i surowicy nawet do 7-10 godzin po przyjęciu pokarmu lub suplementacji wolnych aglikonów lub ich form glikozydowych [237]. Pewna ilość spożytych lignanów może zostać szybko wchłonięta do krwioobiegu już w górnym odcinku

przewodu pokarmowego, w postaci niezmetabolizowanej (glikozydy i wolne aglikony) charakteryzujących się wysoką biodostępnością w organizmie człowieka, podczas gdy polimery lignanów oraz formy di/tri glikozydowe są transformowane przez mikrobiotę jelitową dopiero w jelicie grubym [243-245]. Innym przykładem może być konwersja laricirezynolu do cyklolaricirezynolu *in vivo* przebiegająca częściowo w warunkach kwasowych, panujących w żołądku i/lub w górnych partiach przewodu pokarmowego [234], a także transformacja sekoizolaricirezynolu do laricirezynolu oraz matairezynolu do hydroksymatairezynolu odbywająca się w mikrosomach wątroby [246].

Penalvo i wsp. wykazali obecność około 2% przyjętej dawki pinorezynolu i laricirezynolu w osoczu po 1 godzinie od spożycia 50 g nasion sezamu [247], podczas gdy w innym badaniu stężenia laricirezynolu i matairezynolu wykryte w surowicy ludzkiej były wyższe niż stężenia enterolignanów [248], podkreślając potencjalny synergistyczny udział postaci niezmetabolizowanych oraz metabolitów w warunkowaniu odpowiedzi biologicznej. W badaniu Smeds i wsp. analiza zawartości metabolitów w próbkach moczu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, po jednym dniu stosowania pojedynczych dawek 7-hydroksymatairezynolu, laricirezynolu, matairezynolu oraz sekolaricirezynolu wskazywała na obecność hydroksyenterolaktonu, cyklolaricirezynolu, enterolaktonu i enterodiolu jako głównych metabolitów. Z kolei w próbkach moczu zebranych po 10-dniowym okresie suplementacji, głównym metabolitem wszystkich podawanych związków był enterolakton, przy równoczesnej obecności równie wysokich stężeń sekoizolaricirezynolu i hydroksymatairezynolu, w porównaniu z wyjściowymi próbkami moczu, co może po części sugerować transformację związków między sobą. Z kolei podawanie hydroksymatairezynolu skutkowało wydalaniem znacznych ilości hydroksymatairezynolu w moczu, znacznie większych niż obserwowane ilości SECO lub matairezynolu po uprzednim podaniu równoważnych dawek dwóch powyższych lignanów [234].

W związku z powyższym, znaczna część badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy dotyczyła aktywności lignanów w postaci ich glikozydów oraz wolnych aglikonów. Inkubacja komórek monocytów/makrofagów PBMC ze związkami z grupy lignanów (20 μ M) w większości przypadków prowadziła do znamiennej statystycznie inhibicji wydzielania TNF- α i IL-6 (**rycina 35 A, B**). Najsilniejszą inhibicję wydzielania TNF- α w modelu monocytów/makrofagów PBMC zaobserwowano po inkubacji komórek z roztworami arktyiny, arktygeniny i diarktygeniny (20 μ M), hamujących sekrecję tej cytokiny do poziomu odpowiednio $55,4 \pm 6,2\%$, $23,8 \pm 6,1$ oraz $13,6 \pm 2,7\%$ (**p < 0,001). Obserwowana znamienna aktywność przeciwwzapalna arktygeniny, była kompatybilna

z wcześniejszymi doniesieniami, potwierdzającymi jej aktywność w modelu innych komórek prawidłowych izolowanych z krwi obwodowej – neutrofili [33]. Z kolei hamowanie sekrecji TNF- α po zastosowaniu arkyiny wysoce prawdopodobnie mogła wynikać z jej ograniczającego wpływu na procesy fosforylacji białek ścieżki p38 MAPK, odgrywającej ważną rolę w potranskrypcyjnej regulacji czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) [249].

Równie efektywnym działaniem odznaczała się także trachelogenina oraz niektóre pary glukozyd - aglikon tj. filiryna – filigenina, SECO – SDG, matairezynol oraz pinorezynol i odpowiednie im połączenia glukozydowe, których aktywność hamującą sekrecję TNF- α i IL-6 potwierdzono w dwóch przyjętych modelach komórkowych.

Znamienny wpływ ograniczający sekrecję mediatorów prozapalnych pinorezynolu i matairezynolu, szczególnie w modelu makrofagów TDM, wynikał prawdopodobnie z ich aktywności modulującej aktywność wiodących ścieżek sygnałowych MAPK. Zarówno pinorezynol, jak również matairezynol wykazywały znamienne aktywność hamującą fosforylację białek ścieżki sygnałowej JNK 1/2 (**p < 0,001), co jest zbieżne z przeciwwzapalną, zależną od stężenia hamującą aktywnością matairezynolu *in vitro*, potwierdzoną także we wcześniejszych doniesieniach [250]. Zarówno pinorezynol jak również matairezynol hamowały fosforylację białek ścieżki sygnałowej ERK 1/2, przy czym aktywność pinorezynolu w badanym układzie była znamienne statystycznie (*p < 0,05), co obserwowano także w badaniu Jung i wsp. w modelu komórek mikrogleju BV2 poddanych działaniu pinorezynolu (10-50 μ M) izolowanego z owoców forsycji koreańskiej [48].

Z kolei selektywny wpływ badanych lignanów na inhibicję wydzielania IL-1 β w modelu monocytów/makrofagów PBMC, związaną z inicjacją stanu zapalnego oraz adhezją monocytów do komórek śródbłonna [251], potwierdzono jedynie dla 5 spośród badanych lignanów: diarktygeniny, glukozydu pinorezynolu wraz z aglikonem, a także formy aglikonowej i glukozydu matairezynolu. Wynik otrzymany dla arkyiny, wskazuje na brak znamiennego wpływu na inhibicję wydzielania IL-1 β ($85,1 \pm 15,5\%$, p > 0,05), co pozostaje sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami [252]. Obserwowane różnice mogą jednak wynikać z zastosowanego modelu komórkowego (komórki mysie vs. komórki ludzkie), a także zastosowania niższych stężeń związku badanego (20 μ M vs. 50-200 μ M).

Kolejnym elementem nowości w zakresie wiedzy o aktywności lignanów była ocena ich wpływu na wydzielanie przeciwwzapalnej IL-10, której produkcja jest szczególnie obserwowana w monocytach i makrofagach. W modelu komórek makrofagów, powstałych z monocytarnej linii THP-1 dowiedziono, że niektóre ze związków z grupy lignanów wpływają na wzrost wydzielania IL-10, po stymulacji komórek roztworem LPS (10 ng/ml). Co ciekawe,

badania przeprowadzone w modelu izolowanych komórek PBMC nie wskazywały na istotną statystycznie aktywność lignanów wobec aktywacji ekspresji receptora dla IL-10, z wyjątkiem filigeniny, pobudzającej ekspresję IL-10R do poziomu $211,0 \pm 3,4\%$ (**p < 0,001), która nie wykazywała jednak znamiennej statystycznie aktywności nasilającej produkcję IL-10 w komórkach makrofagów TDM.

Spośród badanych związków z grupy lignanów największy wpływ na sekrecję IL-10 w modelu komórek makrofagów, linii THP-1 wykazały arktyina, arktygenina, a także aglikony takie jak pinorezynol i matairezynol (aktywne w najwyższym badanym stężeniu 50 μM). Ciekawym związkiem okazała się trachelogenina, która wywierała znamienny statystycznie wpływ na wydzielanie tej cytokiny w pełnym zakresie zastosowanych stężeń (10-50 μM), powodując wzrost wydzielania IL-10 do wartości w zakresie $422 \pm 5,6\%$ - $359 \pm 5,8\%$ (**p < 0,01), w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS (100% wydzielania).

Znamienny wpływ trachelogeniny został także zaobserwowany w przypadku analizy jej wpływu na sekrecję IL-6 oraz TNF- α . Inkubacja makrofagów z roztworami trachelogeniny hamowała wydzielanie TNF- α do poziomu $26,7 \pm 2,5\%$ (**p < 0,001) dla stężenia 50 μM , $56,2 \pm 8,0\%$ (**p < 0,001) dla stężenia 20 μM oraz $60,8 \pm 6,9\%$ (**p < 0,01) dla stężenia 10 μM (wobec 100% wydzielania dla kontroli stymulowanej). Podejmując próbę wyjaśnienia mechanizmu działania trachelogeniny, warto przyjrzeć się budowie tego lignanu, klasyfikowanego podobnie jak np. arktygenina do grupy pochodnych dibenzylbutyrolaktonu. Poprzednie doniesienia korelowały obecność części butyrolaktonu jako aktywnego farmakofora odgrywającego istotną rolę w hamowaniu produkcji TNF- α przez arktygeninę w analogicznym modelu komórek makrofagów [253], co może stanowić podstawę wyjaśnienia aktywności trachelogeniny, a także innych lignanów należących do grupy pochodnych dibenzylbutyrolaktonu

Biorąc pod uwagę znaczną aktywność komórek monocytów/makrofagów w pierwszych etapach powstawania stanu zapalnego, leżącego u podłoża NCDs, elementem nowości w prezentowanych wynikach jest także znamienny statystycznie, hamujący wpływ lignanów na wydzielanie chemokiny MCP-1. Białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1/CCL2) wzmacnia odpowiedź zapalną, rekrutując kierunkową migrację i aktywację komórek makrofagów wzdłuż rosnącego, lokalnego stężenia cytokin prozapalnych [254]. Szczególnej roli białka MCP-1 upatruje się w rozwoju chorób o podłożu metabolicznym tj. otyłość czy cukrzyca typu II. Badanie w warunkach *in vitro* potwierdziło, że makrofagi izolowane ze szpiku kostnego myszy typu dzikiego chętnie migrowały do podłoża hodowlanego kondycjonowanego przez eksplantaty tkanki tłuszczowej zwierząt otyłych, wskazując na istotny udział białka

chemotaktycznego monocytów pełniącego funkcję rekrutera makrofagów podtypu M1 do miejsca zapalenia [254,255]. Wśród badanego zestawu związków z grupy lignanów, efektywną inhibicję wydzielania MCP-1 wykazywała arktyina, akrytygenina, diarktygenina, glukozyd epipinorezynolu wraz z formą aglikonu, glukozyd matairezynolu i matairezynol, a także trachelogenina, w stopniu znamiennej statystycznie. Co więcej, działanie glukozydu epipinorezynolu na inhibicję wydzielania MCP-1 prowadzące do hamowania wydzielania badanej chemokiny do poziomu $29,5 \pm 0,9\%$ (** $p < 0,001$) było porównywalne do aktywności kontroli pozytywnej – deksametazonu ($*p < 0,05$), którego znamiennej wpływ na wydzielanie MCP-1 potwierdzono uprzednio w badaniach *in vivo* [256]. Powyższa właściwość związków z grupy lignanów wydaje się więc niezwykle istotna w kontekście określenia ich roli w profilaktyce chorób o podłożu zapalnym.

Podjmując próbę analizy otrzymanych wyników warto także zwrócić uwagę na wielokierunkowe działanie jednej z markerowych pochodnych glikozydowych z grupy lignanów, scharakteryzowanych w rodzaju *Forsythia* – filiryny. Aktywność filiryny w modelu monocytów/makrofagów PBMC została wyraźnie zaznaczona w kontekście hamowania wydzielania TNF- α ($50,5 \pm 7,7\%$) i IL-6 ($55,0 \pm 7,7\%$) (** $p < 0,001$), w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS (100% wydzielania), co zostało także potwierdzone w zakresie stężeń 10-50 μM w modelu TDM. Z kolei wpływ filiryny na sekrecję IL-1 β ($66,9 \pm 10,1\%$) w modelu monocytów/makrofagów PBM nie był znamiennej statystycznie w badanej grupie ($p > 0,05$), jednak w teście t-Studenta dla pojedynczej próby wynik uzyskuje znamienność statystyczną w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS ($*p < 0,05$). Większa liczba przeprowadzonych oznaczeń lub wyższe stężenie związku mogłoby wpłynąć jednak na zmianę obserwowanej tendencji w kontekście całej grupy badawczej.

Aglikonem i jelitowym metabolitem filiryny, występującym w liściach forsycji jest filigenina. Według bazy TCMSP (ang. *Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database*) biodostępność filigeniny plasuje się na poziomie 95% (OB. $> 95\%$), przy współczynniku *drug-like* osiągającym wartość 0,57. Ponadto wykazano, że filigenina jest łatwo wchłaniania w jelitach po podaniu doustnym, jednak jej stosunkowo niska zawartość w liściach *F. suspensa* ogranicza jej stosowanie w terapii [257]. Według wcześniejszych doniesień ilość filigeniny w przetworach z liści forsycji można zwiększyć prawie 28-krotnie poprzez zastosowanie odpowiednich warunków wilgotności i temperatury w procesie fermentacji liści forsycji [258].

Filigenina efektywnie hamowała uwalnianie TNF- α i IL-6 w obu przyjętych modelach komórkowych, przy czym inhibicja uwalniania IL-6 była proporcjonalnie zależna od stężenia

w modelu TDM. Co ciekawe filigenina była także jedynym przedstawicielem grupy lignanów, którego wpływ na wzrost ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC okazał się znamienno statystycznie, przyjmując wartości $211,0 \pm 3,4\%$ (**p < 0,001).

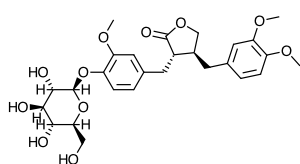
Zaobserwowana w badaniach aktywność filigeniny, ograniczająca produkcję mediatorów zapalnych w modelu komórek prawidłowych PBMC, stanowiła uzupełnienie opisanych wcześniej mechanizmów jej działania, związanych z wpływem na modulację ścieżek MAPK oraz NF- κ B, na innych modelach *in vitro* np. mysich makrofagach oraz komórkach gwiazdzistych wątroby, a także modelach *in vivo* [259,260]. W związku z tym wpływ filigeniny a także jej glukozydu – filiryiny na powyższe szlaki sygnalizacji komórkowej został przeze mnie oceniony w modelu komórek makrofagów (TDM).

Filiryna, wraz z jej aglikonem filigeniną wykazały znamienno wpływ na inhibicję fosforylacji ścieżki pERK/ERK 1/2 (**p < 0,001– filiryna, *p < 0,01– filigenina), nie wykazując aktywności hamującej wobec ścieżki p38 w badanym modelu komórkowym. Przeciwnie, zarówno filiryna jak i filigenina inicjowały wzrost fosforylacji białka p38, co koreluje z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi podobnego mechanizmu działania filiryiny również w innych modelach *in vitro* np. makrofagach pochodzących ze szpiku kostnego (BMM) [261]. Brak hamowania sygnalizacji p38 przez filiryne i filigeninę może znajdować uzasadnienie w plejotropowych właściwościach ścieżki kinazy p38 (MAPK), pośredniczącej w sygnalizacji immunologicznej. Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, które są jednocześnie aktywowane przez ten sam bodziec, często oddziałują ze sobą za pośrednictwem mechanizmów sprzężenia zwrotnego między regulatorami. Uważa się, że obniżona aktywność szlaku p38 w makrofagach może w niektórych przypadkach nasilać przewlekły stan zapalny, a także przyczyniać się do hamowania produkcji przeciwzapalnej IL-10 oraz nasilonej sygnalizacji ERK 1/2 i JNK 1/2, wynikającej z bezpośredniej fosforylacji białka wiążącego TAK1 pod wpływem bodźców prozapalnych [262]. Wzrost ekspresji ścieżki p38 wynikający z inkubacji makrofagów z roztworem filiryiny oraz filigeniny (20 μ M) przy równoczesnym znamienno statystycznie hamowaniu sygnalizacji ERK 1/2 i JNK 1/2 może stanowić częściowe potwierdzenie przytoczonej obserwacji.

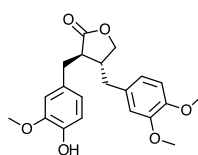
W ogólnym podsumowaniu podjętej analizy, uwzględniającej modulację ścieżek sygnalizacji MAPK oraz kinazy IKK α / β , a także produkcję mediatorów zapalnych, w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC oraz makrofagów TDM, najaktywniejszymi związkami z grupy lignanów okazały się: **arktyina, arktygenina, diarktygenina, filiryna,**

filigenina, glukozyd pinorezynolu, pinorezynol, glukozyd matairezynolu oraz matairezynol, których wzory przedstawiono na poniższej rycinie (rycina 69).

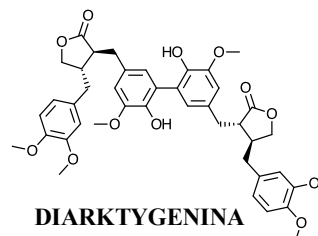
POCHODNE DIBENZYLOBUTYROLAKTONU



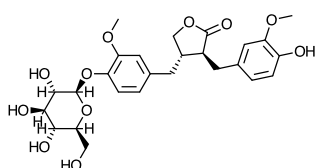
**4-O-GLUKOZYD ARKTYGENINY -
ARKTYINA**



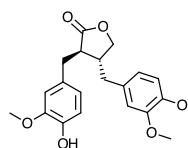
ARKTYGENINA



DIARKTYGENINA

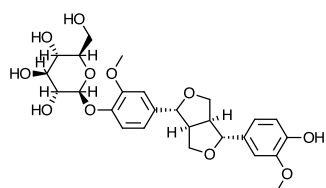


4-O-GLUKOZYD MATAIREZYNOLU

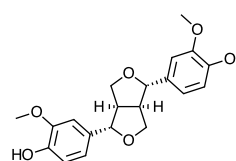


MATAIREZYNOL

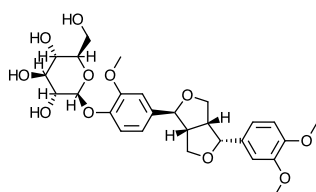
POCHODNE FUROFURANU



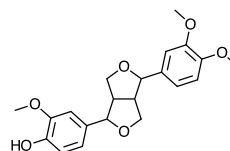
4-O-GLUKOZYD PINOREZYNOLU



PINOREZYNOL



4-O-GLUKOZYD FILIFENINY



FILIGENINA

Rycina 69: Wzory strukturalne najaktywniejszych pochodnych dibenzylobutyrolaktonu oraz furofuranu z grupy lignanów.

Funkcje obronne wrodzonego układu odpornościowego bazują na aktywności receptorów rozpoznawania patogenów (PRRs), np. receptorów toll-podobnych (TLR), uczestniczących w rozpoznawaniu konserwatywnych struktur molekularnych atakujących patogenów. Aktywacja odpowiedzi za pośrednictwem TLR prowadzi do ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej, warunkowanej aktywacją określonych szlaków sygnałowych [99].

Celem uzupełnienia luki w wiedzy na temat mechanizmów aktywności dwóch związków z grupy lignanów – arkytyny i arkytygeniny, odznaczających się znamionym

potencjałem przeciwzapalnym, w toku dalszych analiz poddano ocenie ich wpływ na modulację przekaźnictwa sygnału za pośrednictwem receptorów toll-podobnych (TLR) na poziomie ekspresji genów oraz produkcji określonych białek [201].

W związku z wcześniejszymi doniesieniami o roli bakteryjnego LPS jako kluczowego liganda receptora TLR4 [77], do dalszych szczegółowych analiz wykorzystano m.in narzędzie RT² Profiler PCR TLR pozwalające na ocenę wpływu analizowanych czynników na panel genów biorących udział w ścieżkach sygnalizacji TLR. Analiza poszczególnych etapów sygnalizacji wynikających z aktywacji receptorów TLR pozwoliła na prześledzenie szczegółowych ścieżek aktywności badanych ligandów na poziomie molekularnym, co było pierwszym tego typu doniesieniem w kontekście aktywności tych związków. W tym miejscu należy także zaznaczyć pilotażowy charakter prowadzonej analizy ekspresji genów, której wiarygodność potwierdzono na poziomie produkcji/fosforylacji białek dla wybranych ścieżek sygnałowych (metodą western blot). Podczas analizy i dyskusji wyników dla poziomów ekspresji określonych genów warto także podkreślić, że większość indukowanych mRNA cytokin ma krótkie okresy półtrwania, wynikające z obecności elementów bogatych w adenylan-urydylan (AU (ARE)) w regionie 3' nieulegającym translacji (3'UTR), które sprzyjają rozpadowi mRNA, warunkując brak ich długoterminowej stabilności [263]. Przejściowy wzrost poziomów mRNA przez kaskady sygnalizacji komórkowej pojawia się na początku inicjacji stanu zapalnego. Niestety uchwycenie momentu wysokich/niskich ekspresji dla wszystkich badanych czynników jest utrudnione poprzez kaskadową formę ich aktywacji, a także wzajemne oddziaływania na zasadzie sprzężeń zwrotnych i zróżnicowanych czasów półtrwania [201]. Przegląd literatury pozwolił na wytypowanie 6-godzinne czasu inkubacji z badanymi związkami jako optymalnego do określenia maksymalnych poziomów ekspresji genów dla kluczowych mediatorów zapalenia (IL-6, TNF- α , MCP-1), a także genów odpowiedzialnych za indukcję ścieżki NF- κ B w komórkach makrofagów [201,202,203].

Przeprowadzona analiza wskazuje na udział zarówno arktyiny jak również arktygeniny w modulacji ścieżki sygnałowej, zapoczątkowanej aktywacją TLR4, w stymulowanych komórkach makrofagów, co można zaobserwować na załączonej w **rozdziale 4.7** mapie ciepła (**rycina 49**). W toku analizy wykazano wpływ związków na ekspresję czynników uczestniczących w pierwszych etapach inicjacji bakteryjnego LPS – począwszy od ekspresji genu dla białka MD-2 (gen *LY96*) (hamowanego przez arktyinę), uznawanego za swoisty łącznik między LPS a samym TLR4, poprzez gen dla receptora CD14 (*CD14*) oraz TLR4 (gen *TLR4*) (hamowane przez oba związki). Analiza ekspresji genów wskazuje ponadto, że oba

badane lignany działają za pośrednictwem obu głównych kaskad, w ścieżkach sygnałowych specyficznych dla receptora TLR4 - zależnej od Myd88 (geny: *IRAK1*; *MYD88*; *TIRAP*; *TLR4*), a także TRAM/TRIF – zależnej (geny: *IRF3*; *PEL1*; *TBK1*; *TICAM2*; *TICAM1*). W ogólnym podsumowaniu można zaobserwować hamujący efekt obu badanych lignanów dla dwóch powyższych kaskad sygnałowych, przy większym stopniu regulacji w dół po zastosowaniu arkygeniny. Dla szlaku Myd88- niezależnego wzrost ekspresji zaobserwowano jedynie dla genu kodującego IFNA1 po zastosowaniu arkygeniny i jej spadku w wyniku działania arkyiny.

Analiza poszczególnych etapów sygnalizacji (w postaci ekspresji genów) pozwoliła na wytypowanie potencjalnych ścieżek sygnałowych, które w głównej mierze przyczyniły się do zainicjowania obserwowanych efektów przeciwzapalnego działania związków. W toku oceny stopnia produkcji białek dla 3 wybranych ścieżek sygnałowych kinaz MAP: JNK 1/2, ERK 1/2 oraz p38, a także kinazy IKK α/β wykazano istotne statystycznie hamowanie fosforylacji wszystkich badanych ścieżek po inkubacji zarówno z arkyiną, a także z arkygeniną w modelu makrofagów TDM stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS (10 ng/ml). Szczególną aktywność zaobserwowano w kontekście hamowania fosforylacji białek szlaku JNK 1/2, dla arkyiny i arkygeniny, w poszerzonym zakresie badanych stężeń (50-10 μM), co znalazło również potwierdzenie w inhibicji ekspresji genów kodujących białka c-JUN oraz c-FOS współuczestniczących w formowaniu kompleksu czynnika transkrypcyjnego wczesnej odpowiedzi AP-1 [264]. Niskie poziomy obserwowanych wartości ekspresji mogą wynikać ze stopniowego wygaszania sygnalizacji, związanej z krótkim okresem półtrwania mRNA c-Jun i c-Fos wynoszącym zaledwie 35-45 minut [265].

Zarówno arkyina jak i arkygenina hamowały także fosforylację białek ERK 1/2 w dwóch najwyższych badanych stężeniach 20 i 50 μM . Znamienny statystycznie efekt hamujący fosforylację białek szlaku p38 wykazano jedynie dla arkyiny badanej w stężeniu 20 i 50 μM (**rycina 53**). Co ciekawe w badaniu Cho i wsp. hamującą aktywność arkygeniny wobec fosforylacji białek szlaków ERK 1/2, JNK 1/2 i p38 obserwowano już w zakresie stężeń 0,1-1 μM , *in vitro*. W tym samym badaniu oceniono pozytywny bezpośredni wpływ arkygeniny jako skutecznego inhibitora aktywności kinazy MKK oraz czynnika transkrypcyjnego AP-1, potwierdzając tym samym aktywność związku w układzie kinaz MAP. Należy jednak dostrzec różnice wynikające z zastosowanego modelu badawczego, a także rozważyć brak możliwości bezpośredniego przełożenia aktywności związku z mysiego modelu makrofagów na ludzkie stany patologiczne [253].

Podjmując próbę dyskusji otrzymanych wyników szczególną uwagę zwraca hamująca aktywność badanych lignanów w odniesieniu do panelu genów kodujących białka sygnalizacji NF- κ B. Zarówno arktyna, jak również arktigenina hamowały ekspresję genów kodujących białka kluczowej podjednostki NF- κ B tj. *RELA* (p65), przy czym analiza cytozolowej zawartości NF- κ B p65 wskazywała na zmniejszenia ilości relatywnego białka po inkubacji z badanymi lignanami, w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS. Warto również zwrócić uwagę na hamujący wpływ arktigeniny na ekspresję genu kodującego kinazę związaną z receptorem dla IL-1 (*IRAK-1*), niezbędnej w procesie mobilizacji podjednostki p65 do jądra komórkowego. Co ciekawe, stymulująca aktywność obu badanych związków w kierunku pobudzania ekspresji inhibitora I κ B α (*NFKBIA*), może wskazywać na inny mechanizm działania, ograniczającego translokację podjednostek NF- κ B do jądra komórkowego. W celu ostatecznego potwierdzenia wpływu arktyny i arktigeniny na procesy translokacji p65 do jądra komórkowego celowym wydaje się także określenie zawartości p65 we frakcji jądrowej, stanowiąc ostateczne potwierdzenie i uzupełnienie przeprowadzonych przez mnie analiz.

Efektom hamującego działania arktyny i arktigeniny na modulację szlaku MAPK oraz NF- κ B było hamowanie ekspresji genów kluczowych mediatorów zapalnych. Szczególnie wysoką inhibicję ekspresji zaobserwowano dla genu kodującego IL-6, IL-12A oraz chemokiny MCP-1 (CCL-2), a także dla TNF- α , co zaprezentowano na **rycinach 56, 57**. Co ciekawe, aktywność arktigeniny była o 1,3-razy silniejsza w stosunku do hamowania ekspresji genu MCP-1 oraz 3-krotnie wyższa w odniesieniu do ekspresji genu dla IL-6, w porównaniu do działania arktyny, co może sugerować silniejszą aktywność aglikonu w porównaniu do glukozydu. Na podstawie macierzy PCR przeprowadzono także oznaczenie ekspresji mRNA metodą qPCR, dla 3 wybranych genów docelowych (IL-6, TNF- α , MCP-1), aby zweryfikować efekty modulacji ekspresji genów kluczowych czynników zapalnych po zastosowaniu arktyny i arktigeniny (**rycina 57**). Otrzymane wyniki (wyraźna tendencja spadkowa) bezsprzecznie pokrywały się z wynikami oceniającymi produkcję wybranych mediatorów zapalnych metodą ELISA, przeprowadzoną w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC oraz makrofagów THP-1.

Obserwacją wymagającą zaakcentowana jest także wpływ badanych lignanów na ekspresję genów dla innych mediatorów zapalnych, uczestniczących w inicjacji stanu zapalnego, także za pośrednictwem wpływu na inne komponenty układu odpornościowego.

Oprócz mechanizmów wyciszających ekspresję niektórych genów (potwierdzoną ograniczeniem produkcji białek) formą aktywności związku może także mobilizacja niektórych mechanizmów efektorowych, sprzyjając powrotowi układu do stanu homeostazy. Analiza

badanego panelu cytokin i chemokin prozapalnych po zastosowaniu obu badanych związków wskazywała na wzrost ekspresji genu *CXCL8*, kodujących produkcję IL-8. Zaobserwowana właściwość może korelować ze wzrostem stopnia rekrutacji komórek neutrofilii, komórek NK oraz limfocytów T do miejsca stanu zapalnego, niezbędnej do inicjacji początkowych etapów zapalenia, kluczowych w eliminacji patogenu. Próbę wyjaśnienia tej obserwacji może jednak stanowić praca Mahmoud i wsp., którzy obserwowali nieoczekiwanie wysoki i stabilny poziom mRNA prozapalnej chemokiny IL-8 w różnicowanych komórkach THP-1 (niezależny od p38 MAPK), o okresie półtrwania dłuższym niż 15 godzin, wynikający dodatkowo ze stabilizującego wpływu PMA [263] (co znacznie przewyższa opisany w niniejszej pracy czas inkubacji komórek z arktyiną i arktygeniną).

Szczególną uwagę zwraca także hamujący wpływ obu badanych lignanów na ekspresję genu dla IL-12, w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS. Ponadto inkubacja komórek z roztworem arktygeniny (w stopniu przeważającym wpływ arktyiny) powodowała hamowanie ekspresji dla genu ligandu chemokiny 10 z motywem C-X-C (*CXCL10*), znanego jako chemoatraktant dla limfocytów T i komórek NK, uczestniczącego w formowaniu zjawiska „burzy cytokinowej” [266]. IL-12 jest wytwarzana głównie przez monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne, w odpowiedzi na produkty bakteryjne, takie jak lipopolisacharydy (LPS) i patogeny wewnątrzkomórkowe lub w wyniku interakcji z aktywowanymi limfocytami T, łącząc wrodzone i adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne. Pozytywna regulacja wydzielania IL-12 w komórkach monocytów i makrofagów linii komórkowej THP-1 zachodzi za pośrednictwem izoformy JNK-2, z kolei hamowanie jej produkcji jest indukowane na skutek aktywacji izoformy JNK-1 szlaku JNK [267]. Powyższe zależności w pełni korelują z naszymi obserwacjami, dotyczącymi hamowania fosforylacji białek ścieżki JNK po inkubacji komórek z arktyiną i arktygeniną, stanowiąc uzupełnienie mechanizmu działania obu lignanów na poziomie komórkowych szlaków sygnalizacyjnych.

Powyżej opisany wpływ arktyiny oraz arktygeniny wymaga jednak jednoznacznego potwierdzenia na poziomie produkcji określonych białek, co może stanowić punkty wyjścia do dalszych badań *in vitro* oraz *in vivo*. Ponadto, celowym wydaje się także poszerzenie badań o wpływ związków na szlaki dla IFN (szczególnie arktygeniny), jako jednego z wiodących szlaków immunomodulujących a także szlaków JAK/STAT oraz TNFRSF1A/NF- κ B czy szlaku TLR4-CASP8. Graficzne podsumowanie aktywności obu badanych lignanów, oraz ich wpływu na procesy aktywacji szlaków komórkowych inicjowanych za pośrednictwem TLR przedstawiono na poniższej rycinie (**rycina 70**).

Aktualne strategie terapeutyczne w terapii miażdżycy i jej powikłań wskazują na kluczową rolę profilaktyki oraz prewencji, na wczesnych etapach powstawania zmian. Czynniki dietetyczne mogą wpływać na rozwój miażdżycy bezpośrednio (hiperlipidemia) lub poprzez pośredni wpływ na czynniki ryzyka, takie jak, podwyższone ciśnienie krwi czy hiperglikemia. Wnioski płynące z badania kohortowego przeprowadzonego w latach 1987-2016 dowodzą związku pomiędzy wyższym spożyciem produktów pochodzenia roślinnego, przy znacznym ograniczeniu produktów zwierzęcych, z niższym ryzykiem wystąpienia incydentów chorób sercowo-naczyniowych (o około 20%) w populacji ogólnej [268]. Z kolei według Global Burden of Disease Study, ponad 9,1 miliona przedwczesnych zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych (ang. *cardiovascular diseases*, CVDs) na całym świecie, co stanowi 52% wszystkich zgonów z powodu CVDs można przypisać ryzyku związanemu z dietą [269].

W oparciu o przyjętą hipotezę metaboliczno-immunologiczną rozwoju miażdżycy, od wielu lat poszukuje się składników aktywnych, ocenianych pod kątem działania hipolipidemicznego przy jednoczesnej aktywności przeciwzapalnej, jako potencjalnego wsparcia w prewencji incydentów sercowo-naczyniowych. Chociaż niewątpliwą przyczyną zmian miażdżycowych jest nadmierna akumulacja lipidów, to wiele doniesień wskazuje, że postępująca w ścianie naczyń reakcja zapalna koordynuje postęp i rozwój choroby [147,270]. Pomimo braku bezpośrednich dowodów na to, że selektywna interwencja w stan zapalny może znacząco poprawiać stan pacjentów w przebiegu incydentów sercowo-naczyniowych, badania kliniczne jednoznacznie wykazały, że modulacja stanu zapalnego może zapobiegać rozwojowi miażdżycy i jej powikłaniom (badanie CANTOS, czynnik badany: przeciwciało monoklonalne kanakinumab [271]; badanie LoDoCo2, czynnik badany: kolchicina [272]).

Korelując wielokierunkowe zaburzenia metaboliczne, leżące u podłożu miażdżycy, z plejotropową aktywnością surowców pochodzenia naturalnego, są one coraz częściej rozpatrywane w kontekście prewencyjnej terapii ograniczającej rozwój zaburzeń lipidowych [273-275]. Przegląd literatury wskazuje jednak, że większość z dostępnych doniesień opiera się o wyniki badań obserwacyjnych, przy braku konkretnych dowodów tłumaczących podstawy tego działania na podłożu molekularnym.

Przykładem może być wielośrodkowe, kohortowe, obserwacyjne badanie *Prevençio'n con Dieta Mediterra'nea* (PREDIMED) z 2014 roku, uwzględniające ponad 4-letnią obserwację grupy uczestników badania, w którym stwierdzono ponad 49% spadek występowania incydentów sercowo-naczyniowych i śmiertelności z przyczyn sercowo-

naczyniowych u osób spożywających produkty bogate w substancje z grupy polifenoli, w porównaniu z grupą kontrolną [276].

W pojedynczych doniesieniach, pozytywnego wpływu produktów pochodzenia roślinnego na zaburzenia lipidowe upatruje się także w obecności związków z grupy lignanów. Marblestone i in. udowodnili korzystny wpływ sekoizolarycirezynolu na redukcję poziomu LDL, cholesterolu całkowitego i lipoprotein w łagodnej hiperlipidemii [277], podczas gdy w dwóch innych badaniach skorelowano, że obecność enterolignanów w moczu była odwrotnie proporcjonalna do poziomu trójglicerydów i lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*, LDL) w surowicy, przy dodatniej korelacji z poziomem lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*, HDL), zarówno w grupie mężczyzn i kobiet [233,278].

Uwzględniając znamienne aktywność przeciwzapalną związków z grupy lignanów, w niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu tej grupy, na procesy akumulacji cholesterolu, zarówno pod kątem wychwytu lipidów przez receptory CD36, jak również ich aktywnego transportu zwrotnego z udziałem transportera ABCA1, przez pośredni wpływ szlaku Nrf-2.

Receptor CD36 uczestniczy w patogenezie wielu chorób niezakaźnych tj. miażdżycy, choroby Alzheimera pośrednicząc wraz z receptorami TLR w rozpoznawaniu zmodyfikowanych endogennych ligandów, w tym utlenionych lipoprotein (oxLDL), czy amyloidu- β oraz inicjowaniu odpowiedzi zapalnej za pośrednictwem kompleksów inflamasomu NLRP3 [279]. Według dostępnych danych literaturowych prezentowane wyniki oceniające wpływ związków z grupy lignanów (w tym lignanów spożywczych) na poziomy ekspresji receptora CD36 są jednymi z pierwszych tego typu doniesień w kontekście aktywności tej grupy polifenoli. W badaniu Drygalskiego i wsp. nie wykazano istotnego efektu hamującego na aktywność CD36 dla jelitowego metabolitu lignanów, enterolaktonu, zastosowanego w stężeniu 50 μ M, w modelu komórek HepG2, stymulowanych obecnością innej cząsteczki lipidowej – kwasu palmitynowego [280]. Mając jednak na względzie wcześniej opisane doniesienia dotyczące obecności niemetabolizowanych lignanów w krwiobiegu po spożyciu posiłku pochodzenia roślinnego, a także powszechne występowanie lignanów w produktach spożywczych i surowcach roślinnych celowym wydaje się ocena wpływu tych związków na procesy komórkowego transportu cholesterolu.

Próba określenia wpływu związków z grupy lignanów (glikozydy i aglikony), pozwoliła na potwierdzenie ich hamującego wpływu na ekspresję receptora CD36 w modelu komórek makrofagów, uprzednio inkubowanych z roztworem cholesterolu w stężeniu 20 μ g/ml (**rycina 58**). Istotne różnice pomiędzy kontrolą z zastosowaniem cholesterolu, a badanymi związkami

otrzymano dla filiryny i pinorezynolu (* $p < 0,05$) co może nadawać nowy kierunek prowadzonych badań, szczególnie w obliczu wysokiego spożycia pinorezynolu, jako jednego z wiodących lignanów w diecie Polaków. Z kolei aktywność filiryny może korelować z potencjalnie nowym zastosowaniem terapeutycznym liści czy owoców forsycji jako komponenty wspomagającej terapię zaburzeń lipidowych. Innym związkiem, dla którego zaobserwowano spadek ekspresji receptora CD36 była trachelogenina (* $p < 0,05$). Według aktualnej wiedzy, jest to pierwsza obserwacja dotycząca aktywności trachelogeniny jako potencjalnego modulatora ekspresji receptorów związanych z procesami transportu cząstek lipidowych. Pomimo ograniczonej dostępności związku w popularnych produktach dietetycznych, obecność trachelozydu (4-*O*- β -D glukozyd trachelogeniny) i trachelogeniny stwierdzono m.in. w owocach i liściach krokosza barwierskiego (*Carthamus tinctorius* L.), owocach ostrożeńca (*Cirsium* Mill.) czy łądogach roślin rodzaju *Trachelospermum* Lem., dając podstawy do poszerzonego zakresu badań w kontekście poszukiwania nowych zastosowań powyższych surowców roślinnych.

W przeciwieństwie do analizy aktywności arktygeniny, określonej w ramach niniejszej pracy, w obliczu wcześniejszych doniesień arktygenina była nieaktywna w hamowaniu ekspresji receptora CD36, co mogło jednak wynikać z zastosowanego lipidowego czynnika stymulującego [185]. Obserwowany wpływ arktygeniny w przyjętym modelu wydaje się jednak wysoce prawdopodobny, biorąc pod uwagę otrzymaną średnią wartość współczynnika zmiany wynoszącą $0,6 \pm 0,03$ (* $p < 0,05$), wskazując jednak na konieczność poszerzenia zakresu prowadzonych badań z zastosowaniem innych stężeń związku lub innej formy lipidu, w celu jednoznacznego wykluczenia lub potwierdzenia aktywności powyższego lignanu.

Analizując dostępne dane literaturowe, dowiedziona inhibicja ekspresji receptora CD36 przez związki z grupy lignanów może stanowić istotne uzupełnienie wiedzy o tej grupie polifenoli, w kontekście ich wpływu na modyfikację stopnia pochłaniania cząstek lipidowych przez komórki makrofagów [281,282]. W poniższej tabeli (**tabela 27**), podsumowano dotychczasowe doniesienia dotyczące aktywności polifenoli jako regulatorów ekspresji receptora CD36. W badaniu Drira i wsp. dowiedziono, że niektóre związki z grupy sekoirydoidów, np. oleuropeina hamują pobieranie lipidów przez komórki makrofagów [283], co zostało częściowo potwierdzone w badaniu Filipek i wsp. oceniającym wpływ dialdehydowego aglikonu sekoirydoidowego, oleaceiny w modelu izolowanych komórek PBMC [284]. Z kolei zastosowanie kemferolu hamowało translokację jądrową białka c-Jun, prowadząc do obniżenia ekspresji CD36 [285]. Korelując występowanie oleuropeiny oraz innych inhibitorów ekspresji CD36 tj. pochodnych kwercetyny i kemferolu [285] w liściach

jesionu wyniosłego poszerzenie badań w zakresie aktywności hipolipidemicznej surowca może wyznaczać nowy kierunek do podjęcia prac badawczych.

Tabela 27: Wpływ związków z grupy polifenoli na modulację ekspresji receptora CD36.

Związek badany	Model badawczy	Czynnik stymulujący	Stężenie związku badanego	Źródło
Kwercetyna	<i>In vitro</i> , J774A	10 µg/ml oxLDL	1,5,10 µM	[286]
Kemferol	<i>In vitro</i> , THP-1	100 µg/ml oxLDL	2,5, 5, 10 µg/ml	
Resweratrol	<i>In vitro</i> , THP-1	50 µg/ml oxLDL	10, 25 µM	[287]
Oleuropeina	<i>In vitro</i> , 3 T3-L1	-	100, 200, 300 µM	[283]
Hydroksytyrozol			50, 100, 150 µM	
Kwas galusowy	<i>In vitro</i> , RAW264.7	80 µg/ml oxLDL	6.25 -50 µM	[288]
Oleaceina	<i>In vitro</i> , Makrofagi PBMC	50 µg/ml oxLDL	20, 50 µM	[284]
Arktygenina	<i>In vitro</i> , THP-1	20 µg/ml cholesterol	50 µM	Niniejsza praca
Filiryina				
Pinorezynol				
Trachelogenina				

Nagromadzenie lipidów w komórkach piankowatych jest charakterystyczną cechą rozwoju wczesnych stanów miażdżycowych. Homeostaza komórkowego poziomu cholesterolu jest jednak ściśle regulowana przez kompleks transporterów zależnych od ATP, ABCA1 i ABCG1, inicjujących wydzielanie cholesterolu do zewnątrzkomórkowych akceptorów, co zostało zaobserwowane u myszy pozbawionych genów dla ABCA1/ABCG1, u których wykazano wzmożoną syntezę komórek piankowatych oraz przyspieszony proces aterogenezy [289]. Na przestrzeni lat liczne związki pochodzenia naturalnego zostały zbadane pod kątem regulacji transporterów ABC, przy czym wiadomo, że resweratrol, kwercetyna czy berberyna zależnie od stężenia indukowały ekspresję białek transporterów ABCA1 i ABCG1, pod wpływem szlaku sygnalizacji PPAR γ / LXR α [290].

W przyjętym modelu badawczym aż 7 z 8 analizowanych lignanów (50 µM) stymulowało wzrost ekspresji białka dla transportera ABCA1, w porównaniu z grupą kontrolną (**rycina 60**). Największy wpływ zaobserwowano dla arktyiny i arktygeniny, które powodowały prawie 5-krotny wzrost ekspresji białka ABCA1 w odniesieniu do grupy komórek traktowanych jedynie roztworem cholesterolu (20 µg/ml). Stymulujący efekt działania tej pary związków częściowo potwierdza wcześniejsze doniesienia Xu i wsp., którzy dowiedli istotnego wpływu arktygeniny (10-100 µM) na wzrost aktywności transporterów ABCA1, zarówno na poziomie mRNA i białka. Badanie Xu i wsp. zostało przeprowadzone w tożsamym modelu

komórkowym podkreślając początek znamiennej aktywności związku od stężenia 50 μM , co również znalazło odzwierciedlenie w prowadzonym przez nas badaniu [185].

Dwukrotny wzrost produkcji białka transportera ABCA1 zaobserwowano także po inkubacji komórek z roztworem sezaminolu, wiodącego składnika z grupy lignanów pozyskanego z nasion sezamu. Wcześniejsze doniesienia dokumentowały wpływ pochodnej sezaminolu – sezaminy na procesy modulacji ekspresji transportera ABCA1. W badaniu Liu i wsp. nie zaobserwowano jednak oczekiwanego wzrostu aktywności transportera ABCA1, w przeciwieństwie do ABCG1, po zastosowaniu badanego lignanu, co mogło jednak wynikać z relatywnie niższego stężenia związku (10 μM) [291,292].

Z wcześniejszych doniesień wiadomo, że wzmożone procesy odwrotnego transportu cholesterolu związane z aktywnością transporterów ABCA1 i ABCG1 korelowały ze wzrostem ekspresji białka oksygenazy hemowej 1 (HO-1), znanej jako wiodący czynnik przeciwzapalny i immunomodulujący komórek śródbłonka, monocytów i makrofagów podtypu M2 [107]. Egzogenna nadekspresja HO-1 za pomocą agonisty lub transferu genów za pośrednictwem adenowirusa opóźniała postęp miażdżycy u myszy z hiperlipidemią [293]. Przeciwnie, delecja genu HO-1 promowała ekspresję genów dla receptora SR-A, a także wzmożoną sekrecję reaktywnych form tlenu (ROS), cytokin i chemokin prozapalnych (IL-6, MCP-1) oraz metaloproteinaz stymulując tworzenie nowych komórek piankowatych i destabilizację blaszki miażdżycowej [294], co może wskazywać również na kluczową rolę HO-1 w działaniu przeciwmiażdżycowym [292].

Przegląd aktualnej literatury pozwala stwierdzić, że w ramach realizacji niniejszej pracy po raz pierwszy oceniono wpływ związków z grupy lignanów na aktywność wewnątrzkomórkową oksygenazy hemowej 1 (HO-1). W toku badań wykazano, że cztery spośród badanych lignanów: trachelogenina, arktygenina, SDG oraz sezaminol, badane w stężeniu 50 μM stymulowały wzrost ekspresji białka HO-1, w porównaniu z grupą kontrolną. Aż 18-krotny wzrost wewnątrzkomórkowej sekrecji HO-1 zaobserwowano po 24-godzinnej inkubacji komórek z arktygeniną, SDG i sezaminolem. Nieco mniejszy, około 10-krotny wzrost HO-1 zaobserwowano dla trachelogeniny (50 μM). Co więcej, równoczesna analiza ekspresji białka czynnika Nrf-2 w tym samym modelu badawczym, potwierdziła zależność wzrostu ekspresji białka HO-1 od aktywności ścieżki Nrf-2/HO-1 (**rycina 61**).

Na podstawie poczynionych obserwacji celowym wydaje się rozszerzenie badań o większy przekrój stężeń związków w celu określenia minimalnych dawek stymulujących wewnątrzkomórkową sekrecję HO-1, co zaprezentowano np. w pracy Kwon i wsp., stosujących

lignan dibenzocyklooktadienowy, schizandrynę w zakresie stężeń 0-200 μM [295]. Ponadto istnieją pojedyncze doniesienia dotyczące wyraźnego wzrostu sekrecji HO-1 po zastosowaniu wodnego wyciągu z owoców forsycji zwisłej, badanego w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ [296]. Może to stanowić kierunek do poszerzenia badań *in vivo* w kontekście wykorzystania badanego w niniejszej pracy surowca tzn. liści forsycji w aspekcie prewencji i terapii zaburzeń lipidowych.

Uwzględniając różne mechanizmy destabilizacji gospodarki lipidowej np. współuczestniczący stan zapalny warto także uwzględnić całościowy wpływ najaktywniejszych związków z grupy lignanów na potencjalne, wielokierunkowe aspekty ich aktywności hipolipidemicznej.

Wcześniejsze doniesienia wskazują, że ekspresja białka transportera ABCA1 w warunkach *in vitro* jest ściśle związana z wydzielaniem cytokin prozapalnych, a stan zapalny wzbudzony bakteryjnym LPS blokuje transport zwrotny cholesterolu do lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) lub apolipoproteiny (apo) A-I [297]. Czynniki zapalne, takie jak białko chemotaktyczne monocytów-1 (MCP-1) oraz IL-6 a także inne cytokiny proaterogenne, takie jak interferon (IFN)- γ oraz interleukiny IL-1 β i IL-18, hamują ekspresję transportera ABCA1, wyraźnie korelując z początkowymi stadiami rozwoju blaszki miażdżycowej. Z kolei cytokiny przeciwzapalne w tym IL-10 i transformujący czynnik wzrostu TGF- β 1, promują aktywację transportera ABCA1 [142]. Han i wsp. dowiedli, że wzrost sekrecji IL-10 koreluje ze wzrostem aktywności transportera ABCA1, zwiększając tym samym transport zwrotny cholesterolu z komórek makrofagów w celu ich ochrony przed toksyczną akumulacją wolnego cholesterolu [298].

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy pozwalają na dostrzeżenie potencjalnej zależności pomiędzy aktywnością przeciwzapalną wybranych związków z grupy lignanów, a procesami akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów. Szczególną uwagę zwraca aktywność arktyny, arktigeniny oraz trachelogeniny, inicjujących wzrost sekrecji IL-10 w modelu komórek makrofagów stymulowanych bakteryjnym LPS, a także ich znamienny wpływ na procesy transportu zwrotnego cholesterolu, za pośrednictwem transportera ABCA1. Istotny udział arktigeniny w procesach odwrotnego transportu cholesterolu i jej możliwej roli prewencyjnej w procesie formowania blaszki miażdżycowej może wynikać z potwierdzonego hamującego działania związku na procesy aktywacji kompleksu inflamasomu NLRP3, wymienianego jako jedna z form przekazywania sygnałów uczestniczących w komórkowych procesach rozwoju zaburzeń lipidowych [299]. Biorąc pod uwagę, że ekspresja białka ABCA1

może być hamowana przez bodziec prozapalny za pośrednictwem szlaku sygnałowego NF- κ B, a rozwój blaszki miażdżycowej został ograniczony w związku z hamowaniem aktywności szlaku TLR4/MyD88/NF- κ B w modelu komórek makrofagów *in vitro* [300] zaprezentowana kompleksowa analiza wpływu arktyny i arktygeniny na szlaki TLR może także stanowić wstęp do pogłębienia badań *in vivo* w kontekście ich wykorzystania ich w terapii.

Uwzględniając powyższe rozważania prezentowana praca doktorska stanowi istotny wkład do wielopoziomowej analizy składu fitochemicznego i aktywności metabolicznej surowców z wybranych gatunków roślin z rodziny Oleaceae. Uzyskane wyniki dowodzą wysokiej wartości formułacji przygotowanych z liści forsycji zwisłej i forsycji pośredniej, a także liści jesionu wyniosłego, w kontekście ich potencjalnego wykorzystania jako elementów terapii prewencyjnej NCDs.

Ponadto przedstawione wyniki mogą stanowić doskonałe wprowadzenie do dalszych analiz *in vivo* dla związków z grupy fenyloetanoloidów, sekoirydoidów oraz lignanów, pod kątem ich wykorzystania jako składników żywności funkcjonalnej lub suplementów diety we wspomagającej terapii schorzeń o podłożu zapalnym. Przeprowadzona analiza aktywności tych związków z powyższych grup polifenoli stanowi istotny wkład w stan wiedzy o mechanizmach działania komórkowego poszczególnych związków, ze szczególnym uwzględnieniem struktur dotąd nieprzebadanych (np. oleoaktozyd, pochodne nuzhenidu, epiframerozyd).

Rezultaty uzyskane dla związków z grupy lignanów stanowią klarowne podsumowanie, rzucające światło na korelację pomiędzy zróżnicowaniem budowy chemicznej związku za jego aktywnością przeciwzapalną. W tym miejscu należy podkreślić możliwość potencjalnego udziału lignanów jako elementu terapii prewencyjnej w chorobach o podłożu zapalnym, w tym związanych z nieprawidłową gospodarką cholesterolu. Podjęcie badań, uwzględniających wpływ tej grupy substancji na modulację powstawania złogów lipidowych koreluje z wysoką efektywnością ich działania przeciwzapalnego, w odpowiedzi na czynnik zapalny o niskim stopniu nasilenia.

Wyniki badań uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy stanowią istotny i bardzo ważny punkt wyjścia do poszerzenia kolejnych analiz fitochemiczno-farmakologicznych i epidemiologicznych, pozwalających na szczegółową weryfikację możliwości wykorzystania badanych surowców roślinnych jako alternatywy tradycyjnej farmakoterapii i/lub racjonalnej suplementacji.

6. Wnioski

Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczące potencjalnego zastosowania roślin z rodziny Oleaceae w profilaktyce i terapii chorób o podłożu zapalnym wskazują, że:

- **Liście roślin z rodziny Oleaceae w tym gatunki rodzaju *Forsythia* oraz *Fraxinus* są cennym źródłem związków z grupy lignanów, sekoirydoidów i fenyloetanoloidów.**
- **Wyciągi przygotowane z liści roślin z rodziny Oleaceae wykazują znamiennej aktywność przeciwzapalną.**
 - Wyciągi z liści *F. suspensa* i *F. × intermedia*, a także napar z liści *Fraxinus excelsior* wykazują istotną aktywność przeciwzapalną, wynikającą z hamowania sekrecji mediatorów zapalnych tj. TNF- α , IL-6 oraz nasilenia ekspresji receptora dla IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC.
 - Wyciągi z liści forsycji nasilają wydzielanie cytokiny przeciwzapalnej - TGF- β .
- **Najwyższa zawartość metabolitów wyspecjalizowanych z grupy polifenoli, w tym lignanów i fenyloetanoloidów jest obserwowana w początkowych stadiach sezonowej wegetacji (maj) liści *F. suspensa* i *F. × intermedia* (w porównaniu do surowca zebranego jesienią) co wskazuje na najkorzystniejszy okres zbioru liści w celu ich potencjalnego wykorzystania w fitoterapii.**
- **Związki z grupy lignanów wykazują hamujący wpływ na aktywność ścieżek sygnałowych MAPK oraz NF- κ B, regulujących procesy związane z rozwojem stanu zapalnego.**
- **Arktyina i arktygenina są aktywnymi modulatorami ekspresji ścieżek sygnałowych aktywowanych za pośrednictwem receptorów TLR.**
- **Związki z grupy lignanów (w tym lignany spożywcze) hamują procesy akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów, w mechanizmie hamowania ekspresji receptora CD36 oraz nasilają efluks cholesterolu z komórek poprzez aktywację transportera ABCA-1, w mechanizmie zależnym od ekspresji białka HO-1.**

7. Perspektywy i możliwe kierunki dalszych badań

Niniejsza praca stanowi niezwykle istotne podsumowanie aktywności przeciwzapalnej surowców należących do trzech gatunków roślin z rodziny Oleaceae: liści forsycji zwistej, liści forsycji pośredniej oraz liści jesionu wyniosłego. Cennym wkładem w aktualny stan wiedzy jest potwierdzenie aktywności przeciwzapalnej liści jesionu wyniosłego, którego stosowanie w medycynie wynika z wieloletniej tradycji, nieopartej dostateczną ilością badań przedklinicznych i klinicznych. Uzyskane rezultaty mogą stanowić bazę do przebadania naparu/wyciągów w innych modelach badawczych, bazujących na korelacji z przewlekłym stanem zapalnym o niskim stopniu nasilenia.

Ponadto, dowiedziono istotnego potencjału przeciwzapalnego dla surowca do tej pory niestosowanego w medycynie europejskiej tzn. liści forsycji, którego zasięg obejmujący tereny Polski czyni go dobrym materiałem do poszerzonych badań *in vitro* oraz *in vivo*. Pierwszym krokiem do realizacji kolejnych analiz było wytypowanie właściwego czasu zbioru surowca, w celu osiągnięcia znamiennego wpływu przeciwzapalnego. Kolejnym krokiem będzie niewątpliwie optymalizacja metody izolacji związków z grupy lignanów i fenyloetanoidów umożliwiającej jeszcze efektywniejsze procesy izolacji jednorodnych metabolitów wyspecjalizowanych.

Następnym, niezwykle ważnym kierunkiem prowadzonych badań była ocena wpływu lignanów (w tym lignanów spożywczych) na procesy akumulacji cholesterolu w modelu komórek makrofagów. Sześć z jedenastu badanych związków wykazywało istotne znaczenie ograniczające akumulację cholesterolu, co może znajdować istotne przełożenie na wykorzystanie lignanów jako elementów żywności funkcjonalnej i suplementów diety. Skomplikowana matryca rozwoju procesów miażdżycowych otwiera perspektywy do lepszego poznania aktywności związków, w tym wpływu na inne receptory związane z transportem cholesterolu, a także poszczególne szlaki sygnałowe.

8. Wykształcenie oraz dorobek naukowy

Wykształcenie

- **03.2022 – obecnie** – Specjalizacja I stopnia z zakresu farmacji klinicznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu.
- **03.2023 – 03.2024** – studia podyplomowe: Zarządzanie projektami: metodyki, praktyka, techniki, narzędzia, Politechnika Warszawska, Wydział Elektroniki i Technik Informacyjnych Instytut Automatyki i Informatyki Stosowanej.
- **10.2021 – 06.2022** – studia podyplomowe: Elementy metodologii badań empirycznych w medycynie i zastosowanie statystyki w badaniach biomedycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- **10.2020 – 06.2021** – studia podyplomowe: Prowadzenie i monitorowanie badań klinicznych, Akademia Leona Koźmińskiego w Warszawie
- **10.2018 – 03.2024** – studia doktoranckie; Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej (dawniej Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii).
- **10.2012 – 01.2018** – studia magisterskie; Uniwersytet Medyczny w Lublinie, praca magisterska wykonana w Katedrze Farmakologii i Farmakodynamiki, pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. n. farm. Sylwii Talarek.

Kursy i szkolenia certyfikowane

- **12.2023** – Certyfikat „AgilePM Foundation Certificate in Project Management”; Axelos
- **06.2023** – Certyfikat „PRINCE2® Foundation Certificate in Project Management”; Axelos
- **10.2022** – Elektroforeza dwukierunkowa 2-DE metoda i zastosowanie, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie
- **03.2022** – Charakterystyka białek.: elektroforeza SDS PAGE i Western blotting, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie
- **01.2022** – Zasady prowadzenia hodowli komórek eukariotycznych oraz ich zastosowanie w badaniach, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie
- **12.2021** – Podstawy cytometrii przepływowej- zastosowanie w diagnostyce i badaniach naukowych, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Publikacje obejmujące tematykę będącą przedmiotem niniejszej rozprawy

- Kołtun-Jasion M., Sawulska P., Patyra A., Woźniak M., Dudek MK., Filipek A., Kiss AK.; Bio-guided isolation of compounds from *Fraxinus excelsior* L. leaves with anti-inflammatory activity; International Journal of Molecular Sciences; 24(4), 3750; <https://doi.org/10.3390/ijms24043750>
IF = 6,208; Punkty MNiSW = 140.
- Patyra A., **Kołtun-Jasion M.**, Jakubiak O., Kiss AK.; Extraction Techniques and Analytical Methods for Isolation and Characterization of Lignans; Plants, 11(17), 2023; <https://doi.org/10.3390/plants11172323>; **IF = 4.658; Punkty MNiSW = 70.**

Inne publikacje i monografie

- Bielecka-Papierz G., Serefko A., Szopa A., Talarek S., Wróbel A., Szewczyk B., Radziwoń-Zaleska M., **Kołtun-Jasion M.**, Poleszak E.; The role of the L-arginine-NO-cGMP-dependent pathway in the development of sensitization to mephedrone effects on the locomotor activity in mice; Behavioural Brain Research; 2:437:114103; doi: 10.1016/j.bbr.2022.114103; **IF = 3,352; Punkty MNiSW = 100.**
- **Kołtun-Jasion M.**, Kiss AK.; Roślinne adaptogeny – charakterystyka i wykorzystanie w terapii (Plant adaptogens – characteristics and application in therapy), Nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Red nauk. Jędrzej Nyckowiak, Jacek Leśny Łódź 2023, Młodzi Naukowcy, Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. (MNiSW = 5) status: zaakceptowane do publikacji.
- **Kołtun-Jasion M.**, Kiss AK.; Zaparcia w populacji pacjentów geriatrycznych (The problem of constipations in the geriatric population), Nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Red nauk. Jędrzej Nyckowiak, Jacek Leśny Łódź 2023, Młodzi Naukowcy, Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. (MNiSW = 5) status: zaakceptowane do publikacji.

Publikacje w trakcie przygotowania

- **Kołtun-Jasion M.**, Patyra A, Dudek MK, Filipek A, Oiry C, Kiss AK.; Dietary lignans effect on inflammation underlying metabolic disorders. Journal of Agricultural and Food Chemistry 202#, #(#), #. IF=6.1; MEiN=140.

Komunikaty zjazdowe obejmujące wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie

- **Kołtun-Jasion M.**, Filipek A., Kiss AK.; Wpływ związków z grupy lignanów na procesy akumulacji cholesterol w komórkach makrofagów; XVIII Ogólnokrajowa Konferencja Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, 23-24.11.2023; Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska; Autor prezentujący, Materiały konferencyjne - jesień, ISBN (wydanie cyfrowe) 978-83-67991-07-0; **Poster.**
- **Kołtun-Jasion M.**, Wrzosek M., Kiss AK.; Arctigenin – an effective modulator of gene expression related to the TLR pathways; GA Society Congress, 01-05.07.2023; Dublin,

Irlandia; Autor prezentujący, (*Planta Medica*: 89: 89: 1276–1437; doi: 10.1055/s-0043-1774129); **Poster**.

- **Koltun-Jasion M.**, Komoń M., Więckiewicz M., Kiss AK; Anti-inflammatory effects of natural raw materials as potential therapeutic enhancers for *Lipopolysaccharide*-induced inflammation; International Bioresource Conclave & Ethnopharmacology Congress, 24-26.02.2023, Imphal, Manipur, Indie; Autor prezentujący, **Poster**.
- **Koltun-Jasion M.**, Sawulska P., Patyra A., Dudek MK., Filipek A., Kiss AK.; Ash leaves (*Fraxinus excelsior* L.) – phytochemical analysis and *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory activity; PSE Meeting 2022 - Natural Products in Drug Discovery and Development – advances and perspectives, 19-22.09.2022; Iasi, Rumunia, Autor prezentujący, **Wystąpienie ustne**.
- Patyra A., **Koltun-Jasion M.**, Schwartz J, Kiss AK; Exploring the anti-diabetic and anti-inflammatory effects of lignans coming from wood waste materials; PSE Meeting 2022 – Natural Products in Drug Discovery and Development – advances and perspectives, 19-22.09.2022; Iasi, Rumunia, Współautor, **Poster**.
- **Koltun-Jasion M.**, Kiss AK.; Anti-inflammatory properties of *Forsythia* spp. leaves in a human model of monocytes/macrophages.; Trends in Natural Products Research: A PSE Young Scientists' Meeting; 23-26.05.2022, Kolymbari, Kreta, Grecja; Autor prezentujący, **Poster**.
- **Koltun-Jasion M.**, Wrzesień A., Patyra A., Kiss AK.; Impact of lignans on the secretion of heme oxygenase and pro-inflammatory cytokines; ACCORD 2022 – Interdisciplinary Conference on Drug Sciences; 26-28.05.2022, Warszawa, Polska; Autor prezentujący **Poster**.
- Komoń M., **Kotun-Jasion M.**, Kiss AK, Analiza fitochemiczna wyciągów i naparu z kłącza lepiężnika różowego (*Petasites hybridus*); Fizyka Medyczna – Farmacja Fizyczna, 20.05.2023, Warszawa, Polska; Współautor, **Poster**.
- **Koltun-Jasion M.**, Sawulska P., Filipek A., Kiss AK; The activity of infusion, and its fractions from *Fraxinus excelsior*'s leaves, on the expression of IL-10 receptor on the surface of monocyte/macrophage cells; II Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi „DocUMED”; 24.10.2021, Łódź, Polska; Autor prezentujący, **Wystąpienie ustne**.
- **Koltun-Jasion M.**, Filipek A., Kiss AK.; Wpływ związków pochodzenia naturalnego na ekspresję receptora IL-10 w komórkach ludzkich monocytów/makrofagów wyizolowanych z krwi obwodowej.; XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 22-24. 09. 2021, Lublin, Polska; Autor prezentujący, **Poster**.

Inne komunikaty zjazdowe

- **Koltun-Jasion M.**, Komoń M., Bajlak J., Kiss AK; *Cistus spp.* as a source of compounds with anti-inflammatory activity in human neutrophils and human respiratory epithelium cells, Current Approach and Future Perspectives, PSE Meeting, 12-13.10.2023; Antalya, Turcja; Autor prezentujący, (*Planta Medica*: 89: 1276–1437, 2023 doi:10.1055/s-0043-1774133), **Poster**.
- **Koltun-Jasion M.**, Sadowska A., Kiss AK; Phytochemical characterisation and *in vitro* anti-inflammatory evaluation in immune cell models of *Eucommia ulmoides* Oliv. bark extracts; GA Society Congress, 01-05.07.2023; Dublin, Irlandia; Autor prezentujący, **Poster**.
- **Koltun-Jasion M.**, Komoń M., Kiss AK; Comparison of three species of the *Cistus* genus for anti-inflammatory effects in a human neutrophil cell model; Aktualne kierunki badan w naukach farmaceutycznych – I Ogólnopolskie Forum Młodych, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 02.03.2023; Lublin, Polska; Autor prezentujący, **Wystąpienie ustne**.

Udział w projektach naukowych

- Analiza preparatów zawierających kłącze różeńca górskiego (*Rhodiola rosea* L.) jako potencjalnych modulatorów stanu zapalnego w komórkach mikrogleju, WF4/3/F/MG/N/23; rola: **Wykonawca projektu**.
- Surowce pochodzenia naturalnego jako element terapii schorzeń o podłożu zapalnym, FW25/1/F/MG/N/22; rola: **Wykonawca projektu**.
- Działanie przeciwzapalne surowców pochodzenia naturalnego jako potencjalnych czynników wspomagających terapię w infekcjach dróg oddechowych, FW25/2/F/MB/N/22/23, rola: **Kierownik projektu**.

Nagrody, wyróżnienia i stypendia za działalność naukową

- XVIII Ogólnokrajowa Konferencja Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, 23-24.11.2023; Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska; **Wyróżnienie dla autorów najlepszych posterów**.
- PSE Meeting 2023 – Current Approach and Future Perspectives, 12-13.10.2023; Antalya, Turcja, **Travel Grant**.
- Aktualne kierunki badan w naukach farmaceutycznych – I Ogólnopolskie Forum Młodych, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 02.03.2023; Lublin, Polska; **Wyróżnienie dla autorów najlepszych wystąpień ustnych**.

- PSE Meeting 2022 – Natural Products in Drug Discovery and Development – advances and perspectives, 19-22.09.2022; Iasi, Rumunia, **Travel Grant**.
- Stypendium projakościowe dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2021/2022.

Działalność dydaktyczna

- Prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów III roku, kierunku Farmacja z analizy mikroskopowej surowców roślinnych, w ramach przedmiotu Farmakognozja.
- Prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów IV roku, kierunku Farmacja z wykorzystania preparatów pochodzenia naturalnego w codziennej praktyce aptecznej, w ramach przedmiotu Lek pochodzenia naturalnego
- Pełnienie roli opiekuna 4 prac magisterskich (2 prace zakwalifikowane do finału Konkursu Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego WUM).
- Praca z członkami Koła Naukowego „Herbarium” przy Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej. W efekcie pracy w ramach Koła Naukowego powstały 3 komunikaty zjazdowe (w tym jeden w formie ustnej, 2 w formie posterów) zaprezentowane na konferencjach krajowych oraz zagranicznych

9. Spis rycin i tabel

SPIS TABEL

Tabela 1: Charakterystyka gatunków należących do rodziny oliwkowatych (Oleaceae).	20
Tabela 2: Charakterystyka morfologiczna wybranych gatunków rodzaju <i>Forsythia</i>	24
Tabela 3: Charakterystyka fitochemiczna wybranych gatunków rodzaju <i>Forsythia</i>	27
Tabela 4: Charakterystyka receptorów toll-podobnych.	55
Tabela 5: Odczynniki do analizy fitochemicznej.	63
Tabela 6: Inne materiały do analizy fitochemicznej.	63
Tabela 7: Aparatura używana do analizy fitochemicznej.	64
Tabela 8: Surowce roślinne oraz wyciągi użyte do badań.	65
Tabela 9: Związki użyte do badań biologicznych.	66
Tabela 10: Lista odczynników stosowanych do izolacji i hodowli komórkowych.	70
Tabela 11: Lista odczynników stosowanych do eksperymentów laboratoryjnych.	70
Tabela 12: Wykaz stosowanego sprzętu laboratoryjnego.	73
Tabela 13: Charakterystyka przyjętych modeli badawczych.	77
Tabela 14: Wykaz przeciwciał użytych do przeprowadzenia oznaczeń z użyciem metody western blot.	88
Tabela 15: Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.	93
Tabela 16: Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem pojedynczych sond.	94
Tabela 17: Charakterystyka genów analizowanych w ramach RT2 Profiler PCR Array TLR oraz białek przez nie kodowanych.	96
Tabela 18: Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem pojedynczych sond.	97
Tabela 19: Charakterystyka wyciągów przygotowanych z trzech gatunków liści forsycji, zebranych w różnych okresach wegetacji.	101
Tabela 20: Analiza fitochemiczna wyciągów alkoholowo-wodnych przygotowanych z liści forsycji zwisłej, forsycji pośredniej oraz forsycji europejskiej, zebranych w 2 różnych okresach wegetacji.	105
Tabela 21: Analiza składu frakcji octanowej wyciągu z liści forsycji pośredniej (<i>Forsythia × intermedia</i>).	107
Tabela 22: Analiza fitochemiczna naparu przygotowanego z liści jesionu wyniosłego (<i>Fraxinus excelsior</i>).	111
Tabela 23: Jednorodne związki chemiczne wyizolowane z roślin rodziny Oleaceae lub pozyskane w ramach hydrolizy enzymatycznej.	113
Tabela 24: Analiza ilościowa składu wyciągu metanolowego przygotowanego z liści forsycji pośredniej (<i>F. suspensa</i>), zebranych w 2 różnych porach wegetacji, wartości podane jako wartości procentowe.	174
Tabela 25: Analiza ilościowa składu wyciągu metanolowego przygotowanego z liści forsycji pośredniej (<i>F. × intermedia</i>), zebranych w 2 różnych porach wegetacji, wartości podane jako wartości procentowe.	174
Tabela 26: Podsumowanie zawartości związków z grupy lignanów w produktach spożywczych oraz surowcach roślinnych.	184
Tabela 27: Wpływ związków z grupy polifenoli na modulację ekspresji receptora CD36.	200

SPIS RYCIN

Rycina 1: Rozmieszczenie rodzaju <i>Forsythia</i> Vahl.	21
Rycina 2: Wybrane części morfologiczne gatunków <i>F. suspensa</i> , <i>F. × intermedia</i> oraz <i>F. europaea</i>	23
Rycina 3: Rozmieszczenie rodzaju <i>Fraxinus</i>	31
Rycina 4: Liście oraz owoce jesionu wyniosłego.	32
Rycina 5: Sterylne choroby zapalne.	35
Rycina 6: Schematyczna prezentacja komórki makrofagów – receptory oraz pełnione funkcje.	41
Rycina 7: Struktura krio-EM kompleksu receptora IL-10.	45
Rycina 8: Procesy uczestniczące w powstawaniu blaszki miażdżycowej – wpływ mediatorów zapalnych.	50
Rycina 9: Schemat przekazu sygnałów za pośrednictwem receptorów TLR oraz szlaków pokrewnych.	60
Rycina 10: Schemat izolacji komórek PBMC z ludzkiej krwi obwodowej.	75
Rycina 11: Schemat hodowli komórek monocytów/makrofagów PBMC.	75
Rycina 12: Metody różnicowania monocytarnej linii komórek THP-1.	77
Rycina 13: Wizualizacja zmian wynikających z procesu różnicowania komórek monocytów do komórek makrofagów, pod wpływem czynnika różnicującego PMA.	80
Rycina 14: Przebieg analizy z użyciem zestawu RT ² Profiler PCR Array TLR.	94
Rycina 15: Schemat rozkładu genów na płycie RT2 Profiler PCR Array TLR.	95

Rycina 16: Reprezentatywne chromatogramy wyciągów przygotowanych z 3 gatunków liści forsycji, zebranych w dwóch różnych porach wegetacji.....	102
Rycina 17: Chromatogramy LC-DAD-MS, wyciągu octanowego z liści forsycji pośredniej (<i>Forsythia × intermedia</i>).....	106
Rycina 18: Schemat frakcjonowania i analizy fitochemicznej wyciągu metanolowo-wodnego przygotowanego z liści forsycji pośredniej (<i>Forsythia × intermedia</i>) zebranych w maju.	108
Rycina 19: Schemat frakcjonowania i analizy fitochemicznej wyciągu metanolowo-wodnego przygotowanego z liści forsycji zwistej (<i>Forsythia suspensa</i>) zebranych w maju.	109
Rycina 20: Schemat analizy fitochemicznej naparu z liści jesionu wyniosłego i jego frakcji wraz ze wskazaniem związków dominujących w poszczególnych subfrakcjach wyciągów metanolowych 20% i 50%.	110
Rycina 21: Chromatogram LC-DAD, naparu przygotowanego z liści jesionu wyniosłego	111
Rycina 22: Wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji.....	115
Rycina 23: Sekrecja TNF- α oraz IL-6 przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji.....	116
Rycina 24: Sekrecja transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β), przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji.	117
Rycina 25: Ekspresja receptora IL-10R na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z wyciągami, z liści forsycji.....	118
Rycina 26: Wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z naparem, frakcjami i subfrakcjami z liści jesionu wyniosłego.	119
Rycina 27: Sekrecja TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC, po 24-godzinnej inkubacji z naparem, frakcjami i subfrakcjami z liści jesionu wyniosłego	121
Rycina 28: Ekspresja receptora IL-10R w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z naparem, frakcjami i subfrakcjami z liści jesionu wyniosłego.....	122
Rycina 29: Ekspresja receptora IL-10R po 24-godzinnej inkubacji z naparem, frakcjami oraz najaktywniejszych subfrakcji wyciągów 20% i 50% z liści jesionu wyniosłego.	123
Rycina 30: Wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami.....	125
Rycina 31: Sekrecja TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami.....	127
Rycina 32: Ekspresja receptora IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami.....	128
Rycina 33: Ekspresja receptora IL-10R na powierzchni komórek PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami.	129
Rycina 34: Wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez komórki monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi lignanami.	131
Rycina 35: Sekrecja TNF- α , IL-6 IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi lignanami.	133
Rycina 36: Ekspresja receptora IL-10 na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi lignanami.	134
Rycina 37: A. Ekspresja receptora IL-10R na powierzchni komórek monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi enterolignanami.	135
Rycina 38: Wpływ badanych związków z grupy lignanów oraz lipopolisacharydu i deksametaznu na aktywność metaboliczną komórek makrofagów, określona z wykorzystaniem testu MTT.....	138
Rycina 39: Sekrecja TNF- α , przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów.	139
Rycina 40: Sekrecja IL-6, przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów.	140
Rycina 41: Sekrecja IL-10 przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów.	141
Rycina 42: Sekrecja MCP-1, przez komórki stymulowanych makrofagów, po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami z grupy lignanów.	142
Rycina 43: Mapa ciepła prezentująca podsumowanie aktywności przeciwzapalnej badanych związków z grupy lignanów.....	143
Rycina 44: Kaskada przekazywania sygnału z udziałem kinaz MAP.....	144
Rycina 45: Wpływ lignanów na aktywację ścieżek sygnałowych MAPK oraz kinazy IKK α/β	146
Rycina 46: Liczbowe zróżnicowanie ilości genów ulegających zmianie ekspresji pod wpływem działania arktyniny i arktyniny, w modelu komórek makrofagów stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS.....	148

Rycina 47: Diagram Venna prezentujący różnice w ilości genów, których ekspresja uległa obniżeniu pod wpływem działania arktyny i arktyniny, w odniesieniu do kontroli stymulowanej LPS.	149
Rycina 48: Mapa ciepła przedstawiająca porównawczy wpływ arktyny i arktyniny na średnie wartości ekspresji panelu 84 genów, uczestniczących w przekazaniu sygnału za pośrednictwem receptorów TLR.	151
Rycina 49: Analiza zmian ekspresji 16 genów uczestniczących w kodowaniu białek efektorowych i receptorów komórek makrofagów uczestniczących w regulacji sygnalizacji za pośrednictwem receptorów TLR, pod wpływem działania arktyny i arktyniny.....	153
Rycina 50: Aktywacja ścieżki NF- κ B na drodze klasycznej i alternatywnej.....	154
Rycina 51: Analiza zmian ekspresji genów należących do ścieżek sygnałowych NF- κ B pod wpływem działania arktyny i arktyniny.....	156
Rycina 52: Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białka NF- κ B/p65 w modelu makrofagów inkubowanych z arktyną i arktyniną, stymulowanych LPS.....	157
Rycina 53: Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białek p-p38/p38 w modelu makrofagów inkubowanych z arktyną i arktyniną, stymulowanych LPS.....	158
Rycina 54: Analiza zmian ekspresji 8 genów kodujących białka należące do ścieżek sygnałowych JNK/p38 MAPK, pod wpływem działania arktyny i arktyniny w komórkach makrofagów.....	159
Rycina 55: Analiza obecności formy ufosforylowanej i całkowitej białek pERK1/2/ERK1/2 w modelu makrofagów inkubowanych z arktyną i arktyniną, stymulowanych LPS.....	160
Rycina 56: Analiza zmian ekspresji 7 genów należących do ścieżek sygnałowych dla interferonu oraz 10 genów dla cytokin i chemokin zapalnych, pod wpływem działania arktyny i arktyniny w komórkach makrofagów.....	162
Rycina 57: Analiza ekspresji mRNA TNF- α IL-6, MCP-1 pod wpływem działania arktyny i arktyniny, w stymulowanych makrofagach.....	163
Rycina 58: Mikroskopowa wizualizacja stopnia akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów TDM, po inkubacji z wybranymi związkami z grupy lignanów.....	164
Rycina 59: Analiza poziomu ekspresji białka receptora CD36 w makrofagach po zastosowaniu badanych lignanów.....	165
Rycina 60: Analiza poziomu ekspresji białka transportera ABCA1 w makrofagach po inkubacji z wybranymi związkami z grupy lignanów.....	166
Rycina 61: Analiza stopnia ekspresji białka HO-1, oraz ekspresji ścieżki Nrf-2 w badanych lizatach komórkowych po inkubacji z wybranymi związkami z grupy lignanów.....	167
Rycina 62: Procentowa zawartość wybranych grup polifenoli zidentyfikowanych w ekstraktach metanolowo-wodnych przygotowanych z liści forsycji pośredniej oraz forsycji zwisłej, zebranych we wrześniu oraz w maju.....	172
Rycina 63: Procentowa zawartość wybranych związków polifenolowych w wyciągu metanolowym, przygotowanym z liści forsycji zwisłej zebranych w 2 różnych porach wegetacji.....	174
Rycina 64: Procentowa zawartość wybranych związków polifenolowych w wyciągu metanolowym przygotowanym z liści forsycji pośredniej, zebranych w 2 różnych porach wegetacji.....	174
Rycina 65: Sekrecja TNF- α , IL-6 IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami.....	175
Rycina 66: Sekrecja A. TNF- α , B. IL-6 C. IL-1 β w modelu stymulowanych LPS monocytów/makrofagów PBMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami.....	178
Rycina 67: Wzory strukturalne nuzhenidu oraz jego aktywnych biologicznie pochodnych.....	182
Rycina 68: Procesy biotransformacji arktyny z udziałem mikrobioty jelitowej.....	185
Rycina 69: Wzory strukturalne najaktywniejszych pochodnych dibenzylolbutyrolaktonu oraz furofuranu z grupy lignanów.....	191
Rycina 70: Wpływ związków z grupy lignanów - arktyny i arktyniny na przekazanie sygnału za pośrednictwem receptorów TLR oraz szlaków pokrewnych.....	196

10. Wykaz literatury

1. Garden, K. Oleaceae Hoffmanns. & Link. Dostęp online: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30001336-2> (dostęp dnia: 13.11.2023).
2. Akhtar, N.; Hayat, M.Q.; Hafiz, I.A.; Abbasi, N.A.; Malik, S.I.; Habib, U.; Hussain, A.; Potter, D. Comparative palynology and taxonomic implication of *Jasminum* L. (Oleaceae) species from Pakistan on the bases of scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech* **2021**, *84*, 2325-2336, doi:10.1002/jemt.23787.
3. Huang, Y.L.; Oppong, M.B.; Guo, Y.; Wang, L.Z.; Fang, S.M.; Deng, Y.R.; Gao, X.M. The Oleaceae family: A source of secoiridoids with multiple biological activities. *Fitoterapia* **2019**, *136*, 104155, doi:10.1016/j.fitote.2019.04.010.
4. Mansour, K.A.; Elbermawi, A.; Al-Karmalawy, A.A.; Lahloub, M.F.; El-Neketi, M. Cytotoxic effects of extracts obtained from plants of the Oleaceae family: bio-guided isolation and molecular docking of new secoiridoids from *Jasminum humile*. *Pharm Biol* **2022**, *60*, 1374-1383, doi:10.1080/13880209.2022.2098346.
5. Tokar, M.; Klimek, B. The content of lignan glycosides in *Forsythia* flowers and leaves. *Acta Pol Pharm* **2004**, *61*, 273-278.
6. Zhu, W.; Wang, Z.; Sun, Y.; Yang, B.; Wang, Q.; Kuang, H. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of genus *Syringa*: A comprehensive review. *J Ethnopharmacol* **2021**, *266*, 113465, doi:10.1016/j.jep.2020.113465.
7. Eddouks, M.; Maghrani, M. Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *94*, 149-154, doi:10.1016/j.jep.2004.05.005.
8. Commission Regulation (European Union) No 432/2012, **17.05.2012** - Establishing a list of permitted health claims made on foods, **2012**.
9. Europejska Agencja Leków: Community herbal monograph on *Fraxinus excelsior* L. or *Fraxinus angustifolia* Vahl, folium. **12.07.2011**, EMA/HMPC/239271/2011.
10. Europejska Agencja Leków: European Union herbal monograph on *Olea europaea* L., folium. **31.01.2017**, EMA/HMPC/359238/2016.
11. Kadereit, J.W. The Families and Genera of Vascular Plants. *Springer Berlin Heidelberg* **2004**, 299. ISSN 2730-6259.
12. IUCN Red List. Dostęp online: www.iucnredlist.org (dostęp dnia: 05.07.2023).
13. Suszka, B. Arboretum Kórnickie; *Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk*; 1955; pp. 91-110.
14. Włodzimierz Seneta, J.D. Dendrologia; *Wydawnictwo Naukowe PWN*: Warszawa, 2012. IBSN: 978-83-0115-369-4.
15. Dong, Z.; Lu, X.; Tong, X.; Dong, Y.; Tang, L.; Liu, M. *Forsythiae Fructus*: A Review on its Phytochemistry, Quality Control, Pharmacology and Pharmacokinetics. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22091466.
16. Wang, Z.; Xia, Q.; Liu, X.; Liu, W.; Huang, W.; Mei, X.; Luo, J.; Shan, M.; Lin, R.; Zou, D.; et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl: A review. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *210*, 318-339, doi:10.1016/j.jep.2017.08.040.
17. Liu, L.; Sun, Y.; Wen, C.; Jiang, T.; Tian, W.; Xie, X.; Cui, X.; Lu, R.; Feng, J.; Jin, A.; et al. Metabolome analysis of genus *Forsythia* related constituents in *Forsythia suspensa* leaves and fruits using UPLC-ESI-QQQ-MS/MS technique. *PLoS One* **2022**, *17*, e0269915, doi:10.1371/journal.pone.0269915.
18. Qu, H.; Li, B.; Li, X.; Tu, G.; Lü, J.; Sun, W. Qualitative and quantitative analyses of three bioactive compounds in different parts of *Forsythia suspensa* by high-

- performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Microchemical Journal* **2008**, *89*, 159-164, doi:10.1016/j.microc.2008.02.002.
19. Hińczewska, M. Sezonowa zmienność zawartości polifenoli w liściach wybranych gatunków rodzaju *Forsythia* Vahl (Oleaceae). Praca dyplomowa, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny, Łódź, 2019.
 20. Shao, S.; Feng, Z.; Yang, Y.; Jiang, J.; Zhang, P. Eight new phenylethanoid glycoside derivatives possessing potential hepatoprotective activities from the fruits of *Forsythia suspensa*. *Fitoterapia* **2017**, *122*, 132-137, doi:10.1016/j.fitote.2017.09.008.
 21. Kicel, A.; Owczarek, A.; Michel, P.; Skalicka-Woźniak, K.; Kiss, A.K.; Olszewska, M.A. Application of HPLC, UHPLC-PDA-ESI-MS3 and HPLC-PDA methods for rapid, one-step preparative separation and quantification of rutin in *Forsythia flowers*. *Industrial Crops and Products* **2015**, *76*, 86-94, doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.019.
 22. Zhang, Q.; Lu, Z.; Li, X.; Zheng, Y.; Yao, D.; Gu, Y.; Huo, C.; Cong, B. Triterpenoids and Steroids from the Leaves of *Forsythia suspensa*. *Chemistry of Natural Compounds* **2015**, *51*, 178-180, doi:10.1007/s10600-015-1236-5.
 23. Ge, Y.; Wang, Y.; Chen, P.; Wang, Y.; Hou, C.; Wu, Y.; Zhang, M.; Li, L.; Huo, C.; Shi, Q.; et al. Polyhydroxytriterpenoids and Phenolic Constituents from *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, *64*, 125-131, doi:10.1021/acs.jafc.5b04509.
 24. Jiao, J.; Gai, Q.-Y.; Luo, M.; Wang, W.; Gu, C.-B.; Zhao, C.-J.; Zu, Y.-G.; Wei, F.-Y.; Fu, Y.-J. Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal *Forsythia suspensa* leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity. *Food Research International* **2013**, *53*, 857-863, doi:10.1016/j.foodres.2012.12.018.
 25. Jia, J.; Zhang, F.; Li, Z.; Qin, X.; Zhang, L. Comparison of Fruits of *Forsythia suspensa* at Two Different Maturation Stages by NMR-Based Metabolomics. *Molecules* **2015**, *20*, 10065-10081. doi:10.3390/molecules200610065.
 26. Wang, Z.; Xia, Q.; Liu, X.; Liu, W.; Huang, W.; Mei, X.; Luo, J.; Shan, M.; Lin, R.; Zou, D.; et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl: A review. *J Ethnopharmacol* **2018**, *210*, 318-339, doi:10.1016/j.jep.2017.08.040.
 27. Guo, H.; Liu, A.H.; Ye, M.; Yang, M.; Guo, D.A. Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 715-729, doi:10.1002/rcm.2875.
 28. Chang, M.J.; Hung, T.M.; Min, B.S.; Kim, J.C.; Woo, M.H.; Choi, J.S.; Lee, H.K.; Bae, K. Lignans from the Fruits of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl Protect High-Density Lipoprotein during Oxidative Stress. *Biosci Biotechnol Biochem* **2008**, *72*, 2750-2755, doi:10.1271/bbb.80392.
 29. Piao, X.L.; Jang, M.H.; Cui, J.; Piao, X. Lignans from the fruits of *Forsythia suspensa*. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 1980-1984, doi:10.1016/j.bmcl.2008.01.115.
 30. Wang, F.N.; Ma, Z.Q.; Liu, Y.; Guo, Y.Z.; Gu, Z.W. New Phenylethanoid Glycosides from the Fruits of *Forsythia Suspensa* (Thunb.) Vahl. *Molecules* **2009**, *14*, 1324-1331. doi:10.3390/molecules14031324.
 31. Zhang, F.; Yang, Y.-N.; Feng, Z.-M.; Jiang, J.-S.; Zhang, P.-C. Four new phenylethanoid and flavonoid glycoside dimers from the fruits of *Forsythia suspensa* and their neuroprotective activities. *RSC Advances* **2017**, *7*, 24963-24969, doi:10.1039/C7RA04229A.

32. Schmitt, J.; Petersen, M. Pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia × intermedia* cell suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2002**, *68*, 91-98, doi:10.1023/A:1012909131741.
33. Michalak, B.; Filipek, A.; Chomicki, P.; Pyza, M.; Woźniak, M.; Żyżyńska-Granica, B.; Piwowarski, J.P.; Kicel, A.; Olszewska, M.A.; Kiss, A.K. Lignans From *Forsythia × Intermedia* Leaves and Flowers Attenuate the Pro-inflammatory Function of Leukocytes and Their Interaction With Endothelial Cells. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 401, doi:10.3389/fphar.2018.00401.
34. Zürn, M.; Tóth, G.; Ausbüttel, T.; Mucsi, Z.; Horváti, K.; Bősze, S.; Sütöri-Diószegi, M.; Pályi, B.; Kis, Z.; Noszál, B. Tissue-Specific Accumulation and Isomerization of Valuable Phenylethanoid Glycosides from *Plantago* and *Forsythia* Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 3880. doi:10.3390/ijms22083880.
35. Joseph P. Hou, Y.J. The Healing Power of Chinese Herbs and Medicinal Recipes; **2005**. ISBN 9780789022028.
36. Qu, H.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Li, B.; Sun, W. Antioxidant and antibacterial activity of two compounds (forsythiaside and forsythin) isolated from *Forsythia suspensa*. *J Pharm Pharmacol* **2008**, *60*, 261-266, doi:10.1211/jpp.60.2.0016.
37. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015 ed.). Beijing: China Medical Science Publisher.
38. Yoshida, T.; Sakane, N.; Wakabayashi, Y.; Umekawa, T.; Kondo, M. Thermogenic, anti-obesity effects of bofu-tsusho-san in MSG-obese mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1995**, *19*, 717-722.
39. Nishibe, S.; Mitsui-Saitoh, K.; Sakai, J.; Fujikawa, T. The Biological Effects of *Forsythia* Leaves Containing the Cyclic AMP Phosphodiesterase 4 Inhibitor Phillyrin. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26082362.
40. Li, H.B.; Chen, F. Preparative isolation and purification of phillyrin from the medicinal plant *Forsythia suspensa* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* **2005**, *1083*, 102-105, doi:10.1016/j.chroma.2005.06.025.
41. Zhou, M.; Huo, J.; Wang, C.; Wang, W. UPLC/Q-TOF MS Screening and Identification of Antibacterial Compounds in *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl Leaves. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, *12*, doi:10.3389/fphar.2021.704260.
42. Zheng, X.; Chen, Z.; Shi, S.; Yan, H.; Zhou, J.; Jiang, L.; Wang, H.; Hou, G.; Jiang, Z. Forsythiaside A improves Influenza A virus infection through TLR7 signaling pathway in the lungs of mice. *BMC Complement Med Ther* **2022**, *22*, 164, doi:10.1186/s12906-022-03644-8.
43. Xu, X.; Saadeldeen, F.S.A.; Xu, L.; Zhao, Y.; Wei, J.; Wang, H.D.; Liu, Z.; Kang, W. The Mechanism of Phillyrin from the Leaves of *Forsythia suspensa* for Improving Insulin Resistance. *Biomed Res Int* **2019**, *2019*, 3176483, doi:10.1155/2019/3176483.
44. Coon, T.A.; McKelvey, A.C.; Weathington, N.M.; Birru, R.L.; Lear, T.; Leikauf, G.D.; Chen, B.B. Novel PDE4 inhibitors derived from Chinese medicine *Forsythia*. *PLoS One* **2014**, *9*, e115937, doi:10.1371/journal.pone.0115937.
45. Wu, C.; Rajagopalan, S. Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic strategy for metabolic disorders. *Obes Rev* **2016**, *17*, 429-441, doi:10.1111/obr.12385.
46. Zhang, Y.; Feng, F.; Chen, T.; Li, Z.; Shen, Q.W. Antidiabetic and antihyperlipidemic activities of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl (fruit) in streptozotocin-induced diabetes mice. *J Ethnopharmacol* **2016**, *192*, 256-263, doi:10.1016/j.jep.2016.07.002.
47. Xue, H.-H.; Li, J.-J.; Li, S.-F.; Guo, J.; Yan, R.-P.; Chen, T.-G.; Shi, X.-H.; Wang, J.-D.; Zhang, L.-W. Phillygenin Attenuated Colon Inflammation and Improved Intestinal Mucosal Barrier in DSS-induced Colitis Mice via TLR4/Src Mediated MAPK and NF-

- κB Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 2238. doi: 10.3390/ijms24032238.
48. Jung, H.W.; Mahesh, R.; Lee, J.G.; Lee, S.H.; Kim, Y.S.; Park, Y.K. Pinorensinol from the fruits of *Forsythia koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia. *Neurosci Lett* **2010**, *480*, 215-220, doi:10.1016/j.neulet.2010.06.043.
 49. Fu, Y.; Pan, F.; Zhao, L.; Zhao, S.; Yi, J.; Cai, S. Interfering effects on the bioactivities of several key proteins of COVID-19/variants in diabetes by compounds from Lianqiao leaves: *In silico* and *in vitro* analyses. *Int J Biol Macromol* **2022**, *207*, 715-729, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.145.
 50. Ai, X.; Dong, X.; Wang, I.; Han, X.; Luo, C. Acute toxicity test and micronucleus test of *Forsythia suspensa* leaves in mice. *J. Anhui Agri. Sci* **2011**, *11*, 6397-6398.
 51. Grime, J.P.; Hodgson, J.G.; Hunt, R. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species; *Springer*: **2014**. eBook ISBN978-94-017-1094-7. doi:10.1007/978-94-017-1094-7.
 52. Farmakopea Polska, wydanie XII, Prezes Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, W.M.i.P.B. **2020**, *II*, 1659-1661.
 53. Caudullo, G., Houston Durrant, T., **2016**. *Fraxinus angustifolia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e0101d2+.
 54. Gucker, C.L. *Fraxinus pennsylvanica*. USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory. <https://www.fs.usda.gov>, (dostęp dnia: 20.07.2023).
 55. Thomas, P.A. Biological Flora of the British Isles: *Fraxinus excelsior*. *Journal of Ecology* **2016**, *104*, 1158-1209. doi: <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12566>.
 56. Kostova, I.; Iossifova, T. Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 85-106, doi:10.1016/j.fitote.2006.08.002.
 57. Kang, K.S.; Lee, W.; Jung, Y.; Lee, J.H.; Lee, S.; Eom, D.W.; Jeon, Y.; Yoo, H.H.; Jin, M.J.; Song, K.I.; et al. Protective effect of esculin on streptozotocin-induced diabetic renal damage in mice. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 2069-2076, doi:10.1021/jf403840c.
 58. Thuong, P.T.; Pokharel, Y.R.; Lee, M.Y.; Kim, S.K.; Bae, K.; Su, N.D.; Oh, W.K.; Kang, K.W. Dual Anti-oxidative Effects of Fraxetin Isolated from *Fraxinus rhynchophylla*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2009**, *32*, 1527-1532, doi:10.1248/bpb.32.1527.
 59. Sambles, C.M.; Salmon, D.L.; Florance, H.; Howard, T.P.; Smirnoff, N.; Nielsen, L.R.; McKinney, L.V.; Kjær, E.D.; Buggs, R.J.A.; Studholme, D.J.; et al. Ash leaf metabolomes reveal differences between trees tolerant and susceptible to ash dieback disease. *Scientific Data* **2017**, *4*, 170190, doi:10.1038/sdata.2017.190.
 60. Borkowski, B. Rośliny lecznicze w fitoterapii, Poznań, **2000**; Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich, Tom I.
 61. Charakterystyka produktu leczniczego, Phytodolor, (570 mg + 190 mg + 190 mg)/ml, krople doustne (dostęp dnia: 20.07.2023).
 62. Phillips, C.M.; Chen, L.W.; Heude, B.; Bernard, J.Y.; Harvey, N.C.; Duijts, L.; Mensink-Bout, S.M.; Polanska, K.; Mancano, G.; Suderman, M.; et al. Dietary Inflammatory Index and Non-Communicable Disease Risk: A Narrative Review. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11081873.
 63. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO); Noncommunicable diseases report. Dostęp online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (dostęp dnia: 13.11.2023).

64. Radu, F.; Potcovaru, C.-G.; Salmen, T.; Filip, P.V.; Pop, C.; Fierbințeanu-Braticievici, C. The Link between NAFLD and Metabolic Syndrome. *Diagnostics* **2023**, *13*, 614. doi: 10.3390/diagnostics13040614.
65. Noubiap, J.J.; Nansseu, J.R.; Lontchi-Yimagou, E.; Nkeck, J.R.; Nyaga, U.F.; Ngouo, A.T.; Tounouga, D.N.; Tianyi, F.L.; Foka, A.J.; Ndoadougue, A.L.; et al. Global, regional, and country estimates of metabolic syndrome burden in children and adolescents in 2020: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Child Adolesc Health* **2022**, *6*, 158-170, doi:10.1016/s2352-4642(21)00374-6.
66. Visseren, F.L.J.; Mach, F.; Smulders, Y.M.; Carballo, D.; Koskinas, K.C.; Bäck, M.; Benetos, A.; Biffi, A.; Boavida, J.M.; Capodanno, D.; et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* **2021**, *42*, 3227-3337, doi:10.1093/eurheartj/ehab484.
67. Dobrowolski, P.; Prejbisz, A.; Kuryłowicz, A.; Baska, A.; Burchardt, P.; Chlebus, K.; Dzida, G.; Jankowski, P.; Jaroszewicz, J.; Jaworski, P.; et al. Metabolic syndrome - a new definition and management guidelines: A joint position paper by the Polish Society of Hypertension, Polish Society for the Treatment of Obesity, Polish Lipid Association, Polish Association for Study of Liver, Polish Society of Family Medicine, Polish Society of Lifestyle Medicine, Division of Prevention and Epidemiology Polish Cardiac Society, "Club 30" Polish Cardiac Society, and Division of Metabolic and Bariatric Surgery Society of Polish Surgeons. *Arch Med Sci* **2022**, *18*, 1133-1156, doi:10.5114/aoms/152921.
68. Ruiz-Canela, M.; Bes-Rastrollo, M.; Martínez-González, M.A. The Role of Dietary Inflammatory Index in Cardiovascular Disease, Metabolic Syndrome and Mortality. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17081265.
69. Biswas, T.; Townsend, N.; Huda, M.M.; Maravilla, J.; Begum, T.; Pervin, S.; Ghosh, A.; Mahumud, R.A.; Islam, S.; Anwar, N.; Prevalence of multiple non-communicable diseases risk factors among adolescents in 140 countries: A population-based study. *EClinicalMedicine* **2022**, *52*, 101591, doi:10.1016/j.eclinm.2022.101591.
70. Rogero, M.M.; Calder, P.C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10040432.
71. Izaola, O.; de Luis, D.; Sajoux, I.; Domingo, J.C.; Vidal, M. Inflammation and obesity (lipoinflammation). *Nutr Hosp* **2015**, *31*, 2352-2358, doi:10.3305/nh.2015.31.6.8829.
72. Austermann, J.; Roth, J.; Barczyk-Kahlert, K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11121979.
73. Laria, A.; Lurati, A.; Marrazza, M.; Mazzocchi, D.; Re, K.A.; Scarpellini, M. The macrophages in rheumatic diseases. *Journal of inflammation research* **2016**, *9*:9:1-11, doi:10.2147/JIR.S82320.
74. Pérez-Diego, M.; Angelina, A.; Martín-Cruz, L.; de la Rocha-Muñoz, A.; Maldonado, A.; Sevilla-Ortega, C.; Palomares, O. Cannabinoid WIN55,212-2 reprograms monocytes and macrophages to inhibit LPS-induced inflammation. *Frontiers in Immunology* **2023**, *14*, doi:10.3389/fimmu.2023.1147520.
75. Strehl, C.; Buttgereit, F. Optimized glucocorticoid therapy: teaching old drugs new tricks. *Mol Cell Endocrinol* **2013**, *380*, 32-40, doi:10.1016/j.mce.2013.01.026.
76. Boutagy, N.E.; McMillan, R.P.; Frisard, M.I.; Hulver, M.W. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie* **2016**, *124*, 11-20, doi:10.1016/j.biochi.2015.06.020.
77. Lu, Y.-C.; Yeh, W.-C.; Ohashi, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **2008**, *42*, 145-151, doi:https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006.

78. Huang, H.-T.; Chen, P.-S.; Kuo, Y.-M.; Tzeng, S.-F. Intermittent peripheral exposure to lipopolysaccharide induces exploratory behavior in mice and regulates brain glial activity in obese mice. *Journal of Neuroinflammation* **2020**, *17*, 163, doi:10.1186/s12974-020-01837-x.
79. Mehta, N.N.; Heffron, S.P.; Patel, P.N.; Ferguson, J.; Shah, R.D.; Hinkle, C.C.; Krishnamoorthy, P.; Shah, R.; Tabita-Martinez, J.; Terembula, K.; et al. A human model of inflammatory cardio-metabolic dysfunction; a double blind placebo-controlled crossover trial. *Journal of Translational Medicine* **2012**, *10*, 124, doi:10.1186/1479-5876-10-124.
80. Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1761-1772, doi:10.2337/db06-1491.
81. Aljada, A.; Mohanty, P.; Ghanim, H.; Abdo, T.; Tripathy, D.; Chaudhuri, A.; Dandona, P. Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am J Clin Nutr* **2004**, *79*, 682-690, doi:10.1093/ajcn/79.4.682.
82. Kumar, A.; Sakhare, K.; Bhattacharya, D.; Chattopadhyay, R.; Parikh, P.; Narayan, K.P.; Mukherjee, A. Communication in non-communicable diseases (NCDs) and role of immunomodulatory nutraceuticals in their management. *Frontiers in Nutrition* **2022**, *9*, doi:10.3389/fnut.2022.966152.
83. Mukherjee, P.; Chattopadhyay, A.; Grijalva, V.; Dorreh, N.; Lagishetty, V.; Jacobs, J.P.; Clifford, B.L.; Vallim, T.; Mack, J.J.; Navab, M.; et al. Oxidized phospholipids cause changes in jejunum mucus that induce dysbiosis and systemic inflammation. *J Lipid Res* **2022**, *63*, 100153, doi:10.1016/j.jlr.2021.100153.
84. Hwang, S.W.; Kim, J.H.; Lee, C.; Im, J.P.; Kim, J.S. Intestinal alkaline phosphatase ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 4-dependent pathway. *Eur J Pharmacol* **2018**, *820*, 156-166, doi:10.1016/j.ejphar.2017.12.026.
85. Nani, A.; Murtaza, B.; Sayed Khan, A.; Khan, N.A.; Hichami, A. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols Contained in Mediterranean Diet in Obesity: Molecular Mechanisms. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26040985.
86. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* **2018**, *5*, doi:10.3389/fnut.2018.00087.
87. Governa, P.; Bains, G.; Borgonetti, V.; Cettolin, G.; Giachetti, D.; Magnano, A.R.; Miraldi, E.; Biagi, M. Phytotherapy in the Management of Diabetes: A Review. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23010105.
88. Feldman, F.; Koudoufio, M.; Desjardins, Y.; Spahis, S.; Delvin, E.; Levy, E. Efficacy of Polyphenols in the Management of Dyslipidemia: A Focus on Clinical Studies. *Nutrients* **2021**, *13*, 672, doi:10.3390/nu13020672.
89. Akinyemi, O.; Oyewole, S.; Jimoh, K. Medicinal plants and sustainable human health: a review. *Horticulture International Journal* **2018**, *2*, 194-195, doi: 10.15406/hij.2018.02.00051.
90. Atanasov, A.G.; Zotchev, S.B.; Dirsch, V.M.; Orhan, I.E.; Banach, M.; Rollinger, J.M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.; Bauer, R.; Bayer, E.A.; et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20*, 200-216, doi:10.1038/s41573-020-00114-z.
91. Hao, D.C.; He, C.N.; Spjut, R.W.; Xiao, P.G. Editorial: Plant-derived natural compounds in drug discovery: The prism perspective between plant phylogeny, chemical composition, and medicinal efficacy. *Front Plant Sci* **2022**, *13*, 1042695, doi:10.3389/fpls.2022.1042695.

92. Italiani, P.; Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* **2014**, *5*, 514, doi:10.3389/fimmu.2014.00514.
93. Wei, Q.; Deng, Y.; Yang Q.; Zhan A.; Wang L. The markers to delineate different phenotypes of macrophages related to metabolic disorders. *Frontiers in Immunology* **2023**, *14*, doi:10.3389/fimmu.2023.1084636.
94. Coillard, A.; Segura, E. *In vivo* Differentiation of Human Monocytes. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.01907.
95. Orecchioni, M.; Ghosheh, Y.; Pramod, A.B.; Ley, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.01084.
96. Kapellos T.; Bonaguro L.; Gemund I.; Reusch N.; Saglam A.; Hinkley E.; Schultze J.; Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Frontiers Immunol.* **2019**, ;10:2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035.
97. Wong, K.L.; Yeap, W.H.; Tai, J.J.Y.; Ong, S.M.; Dang, T.M.; Wong, S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research* **2012**, *53*, 41-57, doi:10.1007/s12026-012-8297-3.
98. Lazarov, T.; Juarez-Carreño, S.; Cox, N.; Geissmann, F. Physiology and diseases of tissue-resident macrophages. *Nature* **2023**, *618*, 698-707, doi:10.1038/s41586-023-06002-x.
99. Amarante-Mendes, G.P.; Adjemian, S.; Branco, L.M.; Zanetti, L.C.; Weinlich, R.; Bortoluci, K.R. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.02379.
100. Stout, R.D.; Jiang, C.; Matta, B.; Tietzel, I.; Watkins, S.K.; Suttles, J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* **2005**, *175*, 342-349, doi:10.4049/jimmunol.175.1.342.
101. Jensen, M.; Thorsen, N.W.; Hallberg, L.A.E.; Häggglund, P.; Hawkins, C.L. New insight into the composition of extracellular traps released by macrophages exposed to different types of inducers. *Free Radical Biology and Medicine* **2023**, *202*, 97-109, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.025.
102. Fleetwood, A.J.; Lawrence, T.; Hamilton, J.A.; Cook, A.D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* **2007**, *178*, 5245-5252, doi:10.4049/jimmunol.178.8.5245.
103. Kennedy, A.; Fearon, U.; Veale, D.; Godson, C. Macrophages in Synovial Inflammation. *Frontiers in Immunology* **2011**, *2*, doi:10.3389/fimmu.2011.00052.
104. Hamilton, J.A. GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.02055.
105. Weis, N.; Weigert, A.; Von Knethen, A.; Brüne, B. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Molecular Biology of the Cell* **2009**, *20*, 1280-1288, doi:10.1091/mbc.E08-10-1005.
106. Silva, R.C.M.C.; Vasconcelos, L.R.; Travassos, L.H. The different facets of heme-oxygenase 1 in innate and adaptive immunity. *Cell Biochemistry and Biophysics* **2022**, *80*, 609-631, doi:10.1007/s12013-022-01087-z.
107. Naito, Y.; Takagi, T.; Higashimura, Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2014**, *564*, 83-88, doi:10.1016/j.abb.2014.09.005.

108. Wang, C.Y.; Lee, S.S. Analysis and identification of lignans in *Phyllanthus urinaria* by HPLC-SPE-NMR. *Phytochem Anal* **2005**, *16*, 120-126, doi:10.1002/pca.830.
109. Chen, S.; Kapturczak, M.H.; Wasserfall, C.; Glushakova, O.Y.; Campbell-Thompson, M.; Deshane, J.S.; Joseph, R.; Cruz, P.E.; Hauswirth, W.W.; Madsen, K.M.; et al. Interleukin 10 attenuates neointimal proliferation and inflammation in aortic allografts by a heme oxygenase-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 7251-7256, doi:10.1073/pnas.0502407102.
110. Ogborne, R.M.; Rushworth, S.A.; Charalambos, C.A.; O'Connell, M.A. Haem oxygenase-1: A target for dietary antioxidants. *Biochemical Society Transactions*, **2004**; pp. 1003-1005, doi: 10.1042/BST0321003.
111. Son, Y.; Chung, H.-T.; Pae, H.-O. Differential effects of resveratrol and its natural analogs, piceatannol and 3,5,4'-trans-trimethoxystilbene, on anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages. *BioFactors* **2014**, *40*, 138-145, doi:10.1002/biof.1108.
112. Drechsler, Y.; Dolganiuc, A.; Norkina, O.; Romics, L.; Li, W.; Kodys, K.; Bach, F.H.; Mandrekar, P.; Szabo, G. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes. *Journal of Immunology* **2006**, *177*, 2592-2600, doi:10.4049/jimmunol.177.4.2592.
113. Park, E.J.; Kim, Y.M.; Park, S.W.; Kim, H.J.; Lee, J.H.; Lee, D.U.; Chang, K.C. Induction of HO-1 through p38 MAPK/Nrf2 signaling pathway by ethanol extract of *Inula helenium* L. reduces inflammation in LPS-activated RAW 264.7 cells and CLP-induced septic mice. *Food Chem Toxicol* **2013**, *55*, 386-395, doi:10.1016/j.fct.2012.12.027.
114. Funes, S.C.; Rios, M.; Fernández-Fierro, A.; Covián, C.; Bueno, S.M.; Riedel, C.A.; Mackern-Oberti, J.P.; Kalergis, A.M. Naturally Derived Heme-Oxygenase 1 Inducers and Their Therapeutic Application to Immune-Mediated Diseases. *Frontiers in Immunology* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01467.
115. Heine, G.H.; Ulrich, C.; Seibert, E.; Seiler, S.; Marell, J.; Reichart, B.; Krause, M.; Schlitt, A.; Köhler, H.; Girndt, M. CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* **2008**, *73*, 622-629, doi:10.1038/sj.ki.5002744.
116. Gautier, E.L.; Jakubzick, C.; Randolph, G.J. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2009**, *29*, 1412-1418, doi:10.1161/atvbaha.108.180505.
117. Ouyang, W.; Rutz, S.; Crellin, N.K.; Valdez, P.A.; Hymowitz, S.G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* **2011**, *29*, 71-109, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312.
118. Shouval, D.S.; Biswas, A.; Goettel, J.A.; McCann, K.; Conaway, E.; Redhu, N.S.; Mascanfroni, I.D.; Al Adham, Z.; Lavoie, S.; Ibourk, M.; et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity* **2014**, *40*, 706-719, doi:10.1016/j.immuni.2014.03.011.
119. Saraiva, M.; Vieira, P.; O'Garra, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med* **2020**, *217*, doi:10.1084/jem.20190418.
120. Saxton, R.A.; Garcia, K.C. Cryo-EM structure of the IL-10 receptor complex provides a blueprint for ligand engineering. *Febs j* **2022**, *289*, 8032-8036, doi:10.1111/febs.16207.
121. Saxton, R.A.; Tsutsumi, N.; Su, L.L.; Abhiraman, G.C.; Mohan, K.; Henneberg, L.T.; Aduri, N.G.; Gati, C.; Garcia, K.C. Structure-based decoupling of the pro- and anti-

- inflammatory functions of interleukin-10. *Science* **2021**, *371*, doi:10.1126/science.abc8433.
122. Wei, H.; Li, B.; Sun, A.; Guo, F. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv Exp Med Biol* **2019**, *1172*, 79-96, doi:10.1007/978-981-13-9367-9_4.
 123. Hutchins, A.P.; Diez, D.; Miranda-Saavedra, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics* **2013**, *12*, 489-498, doi:10.1093/bfgp/elt028.
 124. Chang, E.Y.; Guo, B.; Doyle, S.E.; Cheng, G. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol* **2007**, *178*, 6705-6709, doi:10.4049/jimmunol.178.11.6705.
 125. Ziegler-Heitbrock, L.; Lötzerich, M.; Schaefer, A.; Werner, T.; Frankenberger, M.; Benkhart, E. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *J Immunol* **2003**, *171*, 285-290, doi:10.4049/jimmunol.171.1.285.
 126. Perez-Asensio, F.J.; Perpiñá, U.; Planas, A.M.; Pozas, E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *J Cell Sci* **2013**, *126*, 4208-4219, doi:10.1242/jcs.127803.
 127. Rajbhandari, P.; Thomas, B.J.; Feng, A.C.; Hong, C.; Wang, J.; Vergnes, L.; Sallam, T.; Wang, B.; Sandhu, J.; Seldin, M.M.; et al. IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell* **2018**, *172*, 218-233.e217, doi:10.1016/j.cell.2017.11.019.
 128. Lira, F.S.; Rosa, J.C.; Pimentel, G.D.; Seelaender, M.; Damaso, A.R.; Oyama, L.M.; Oller do Nascimento, C. Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF-κB pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine* **2012**, *57*, 98-106, doi:10.1016/j.cyto.2011.10.001.
 129. Zigmond, E.; Bernshtein, B.; Friedlander, G.; Walker, C.R.; Yona, S.; Kim, K.W.; Brenner, O.; Krauthgamer, R.; Varol, C.; Müller, W.; et al. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* **2014**, *40*, 720-733, doi:10.1016/j.immuni.2014.03.012.
 130. Matsukawa, A.; Takeda, K.; Kudo, S.; Maeda, T.; Kagayama, M.; Akira, S. Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils. *J Immunol* **2003**, *171*, 6198-6205, doi:10.4049/jimmunol.171.11.6198.
 131. King, A.; Balaji, S.; Le, L.D.; Crombleholme, T.M.; Keswani, S.G. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2014**, *3*, 315-323, doi:10.1089/wound.2013.0461.
 132. Roth, G.A.; Mensah, G.A.; Johnson, C.O.; Addolorato, G.; Ammirati, E.; Baddour, L.M.; Barengo, N.C.; Beaton, A.Z.; Benjamin, E.J.; Benziger, C.P.; et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* **2020**, *76*, 2982-3021, doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010.
 133. Soehnlein, O.; Libby, P. Targeting inflammation in atherosclerosis — from experimental insights to the clinic. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20*, 589-610, doi:10.1038/s41573-021-00198-1.
 134. Pickett, J.R.; Wu, Y.; Zacchi, L.F.; Ta, H.T. Targeting endothelial vascular cell adhesion molecule-1 in atherosclerosis: drug discovery and development of vascular cell adhesion molecule-1-directed novel therapeutics. *Cardiovascular Research* **2023**, *119*, 2278-2293, doi:10.1093/cvr/cvad130.
 135. Roy, P.; Orecchioni, M.; Ley, K. How the immune system shapes atherosclerosis: roles of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* **2022**, *22*, 251-265, doi:10.1038/s41577-021-00584-1.
 136. Björkegren, J.L.M.; Lusis, A.J. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell* **2022**, *185*, 1630-1645, doi:10.1016/j.cell.2022.04.004.

137. Jebari-Benslaiman, S.; Galicia-García, U.; Larrea-Sebal, A.; Olaetxea, J.R.; Alloza, I.; Vandenbroeck, K.; Benito-Vicente, A.; Martín, C. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23063346.
138. Cardoso, L.; Weinbaum, S. Microcalcifications, Their Genesis, Growth, and Biomechanical Stability in Fibrous Cap Rupture. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1097*, 129-155, doi:10.1007/978-3-319-96445-4_7.
139. Yang, C.; Deng, Z.; Li, J.; Ren, Z.; Liu, F. Meta-analysis of the relationship between interleukin-6 levels and the prognosis and severity of acute coronary syndrome. *Clinics (Sao Paulo)* **2021**, *76*, e2690, doi:10.6061/clinics/2021/e2690.
140. Feingold, K.R.; Kazemi, M.R.; Magra, A.L.; McDonald, C.M.; Chui, L.G.; Shigenaga, J.K.; Patzek, S.M.; Chan, Z.W.; Londos, C.; Grunfeld, C. ADRP/ADFP and Mall expression are increased in macrophages treated with TLR agonists. *Atherosclerosis* **2010**, *209*, 81-88, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.042.
141. Stöger, J.L.; Boshuizen, M.C.; Brufau, G.; Gijbels, M.J.; Wolfs, I.M.; van der Velden, S.; Pöttgens, C.C.; Vergouwe, M.N.; Wijnands, E.; Beckers, L.; et al. Deleting myeloid IL-10 receptor signalling attenuates atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice by altering intestinal cholesterol fluxes. *Thromb Haemost* **2016**, *116*, 565-577, doi:10.1160/th16-01-0043.
142. Kong, P.; Cui, Z.-Y.; Huang, X.-F.; Zhang, D.-D.; Guo, R.-J.; Han, M. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022**, *7*, 131, doi:10.1038/s41392-022-00955-7.
143. Chistiakov, D.A.; Bobryshev, Y.V.; Orekhov, A.N. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* **2016**, *20*, 17-28, doi:10.1111/jcmm.12689.
144. Matsuo, M. ABCA1 and ABCG1 as potential therapeutic targets for the prevention of atherosclerosis. *Journal of Pharmacological Sciences* **2022**, *148*, 197-203, doi:10.1016/j.jpsh.2021.11.005.
145. Piechota, M.; Banaszewska, A.; Dudziak, J.; Slomczynski, M.; Plewa, R. Highly Upregulated Expression of CD36 and MSR1 in Circulating Monocytes of Patients with Acute Coronary Syndromes. *The Protein Journal* **2012**, *31*, 511-518, doi:10.1007/s10930-012-9431-8.
146. Sun, Y.; Li, X. Cholesterol efflux mechanism revealed by structural analysis of human ABCA1 conformational states. *Nature Cardiovascular Research* **2022**, *1*, 238-245, doi:10.1038/s44161-022-00022-y.
147. Libby, P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* **2021**, *592*, 524-533, doi:10.1038/s41586-021-03392-8.
148. Khera, A.V.; Emdin, C.A.; Drake, I.; Natarajan, P.; Bick, A.G.; Cook, N.R.; Chasman, D.I.; Baber, U.; Mehran, R.; Rader, D.J.; et al. Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease. *N Engl J Med* **2016**, *375*, 2349-2358, doi:10.1056/NEJMoa1605086.
149. Lu, Y.; Jia, Y.P. Quercetin upregulates ABCA1 expression through liver X receptor alpha signaling pathway in THP-1 macrophages. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2016**, *20*, 3945-3952.
150. Malekpour-Dehkordi, Z.; Javadi, E.; Doosti, M.; Paknejad, M.; Nourbakhsh, M.; Yassa, N.; Gerayesh-Nejad, S.; Heshmat, R. S-Allylcysteine, a garlic compound, increases ABCA1 expression in human THP-1 macrophages. *Phytother Res* **2013**, *27*, 357-361, doi:10.1002/ptr.4713.
151. Helal, O.; Berrougui, H.; Loued, S.; Khalil, A. Extra-virgin olive oil consumption improves the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux and increases ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages. *British Journal of Nutrition* **2013**, *109*, 1844-1855, doi: 10.1017/S0007114512003856.

152. Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **2010**, *11*, 373-384, doi:10.1038/ni.1863.
153. Duan, T.; Du, Y.; Xing, C.; Wang, H.Y.; Wang, R.-F. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in Immunology* **2022**, *13*, doi:10.3389/fimmu.2022.812774.
154. Akira, S.; Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **2004**, *4*, 499-511, doi:10.1038/nri1391.
155. Sahoo, B.R. Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR). *Int J Biol Macromol* **2020**, *161*, 1602-1617, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.293.
156. Gołąb Jakub, J.M., Lasek Witold, Stokłosa Tomasz. *Immunologia*; Polskie Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2021. ISBN: 9788301194505.
157. Kawasaki, T.; Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* **2014**, *5*, 461, doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
158. El-Zayat, S.R.; Sibaii, H.; Mannaa, F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre* **2019**, *43*, 187, doi:10.1186/s42269-019-0227-2.
159. Li, D.; Wu, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2021**, *6*, 291, doi:10.1038/s41392-021-00687-0.
160. Fitzgerald, K.A.; Kagan, J.C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* **2020**, *180*, 1044-1066, doi:10.1016/j.cell.2020.02.041.
161. Laird, M.H.; Rhee, S.H.; Perkins, D.J.; Medvedev, A.E.; Piao, W.; Fenton, M.J.; Vogel, S.N. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* **2009**, *85*, 966-977, doi:10.1189/jlb.1208763.
162. Zhang, Y.; Liang, X.; Bao, X.; Xiao, W.; Chen, G. Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: Current research and prospective. *Eur J Med Chem* **2022**, *235*, 114291, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114291.
163. Chu, Y.-T.; Liao, M.-T.; Tsai, K.-W.; Lu, K.-C.; Hu, W.-C. Interplay of Chemokines Receptors, Toll-like Receptors, and Host Immunological Pathways. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2384. doi:10.3390/biomedicines11092384.
164. Lin, S.C.; Lo, Y.C.; Wu, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* **2010**, *465*, 885-890, doi:10.1038/nature09121.
165. Clark, K.; Nanda, S.; Cohen, P. Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, *14*, 673-685, doi:10.1038/nrm3644.
166. Fitzgerald, K.A.; Rowe, D.C.; Barnes, B.J.; Caffrey, D.R.; Visintin, A.; Latz, E.; Monks, B.; Pitha, P.M.; Golenbock, D.T. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **2003**, *198*, 1043-1055, doi:10.1084/jem.20031023.
167. Honda, K.; Ohba, Y.; Yanai, H.; Negishi, H.; Mizutani, T.; Takaoka, A.; Taya, C.; Taniguchi, T. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **2005**, *434*, 1035-1040, doi:10.1038/nature03547.
168. Yamamoto, M.; Sato, S.; Hemmi, H.; Hoshino, K.; Kaisho, T.; Sanjo, H.; Takeuchi, O.; Sugiyama, M.; Okabe, M.; Takeda, K.; et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **2003**, *301*, 640-643, doi:10.1126/science.1087262.
169. Liew, F.Y.; Xu, D.; Brint, E.K.; O'Neill, L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 446-458, doi:10.1038/nri1630.
170. Wang, H.; Reddy, S.T.; Fogelman, A.M. The role of gut-derived oxidized lipids and bacterial lipopolysaccharide in systemic inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **2022**, *33*, 277-282, doi:10.1097/mol.0000000000000841.

171. Yang, J.; Wise, L.; Fukuchi, K.-i. TLR4 Cross-Talk With NLRP3 Inflammasome and Complement Signaling Pathways in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.00724.
172. Massis, L.; Zamboni, D. Innate Immunity to Legionella Pneumophila. *Frontiers in Microbiology* **2011**, *2*, doi:10.3389/fmicb.2011.00109.
173. Lai, C.Y.; Su, Y.W.; Lin, K.I.; Hsu, L.C.; Chuang, T.H. Natural Modulators of Endosomal Toll-Like Receptor-Mediated Psoriatic Skin Inflammation. *J Immunol Res* **2017**, *2017*, 7807313, doi:10.1155/2017/7807313.
174. Narayanankutty, A.; Sasidharan, A.; Job, J.T. Targeting Toll like Receptors in Cancer: Role of TLR Natural and Synthetic Modulators. *Curr Pharm Des* **2020**, *26*, 5040-5053, doi:10.2174/1381612826666200720235058.
175. Chen, L.; Yu, J. Modulation of Toll-like receptor signaling in innate immunity by natural products. *International Immunopharmacology* **2016**, *37*, 65-70, doi:10.1016/j.intimp.2016.02.005.
176. Oyebo, O.; Kandala, N.B.; Chilton, P.J.; Lilford, R.J. Use of traditional medicine in middle-income countries: a WHO-SAGE study. *Health Policy Plan* **2016**, *31*, 984-991, doi:10.1093/heapol/czw022.
177. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* **2020**, *83*, 770-803, doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
178. Patyra, A.; Dudek, M.K.; Kiss, A.K. LC-DAD-ESI-MS/MS and NMR Analysis of Conifer Wood Specialized Metabolites. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11203332.
179. Filipek, A.; Wyszomierska, J.; Michalak, B.; Kiss, A.K. Syringa vulgaris bark as a source of compounds affecting the release of inflammatory mediators from human neutrophils and monocytes/macrophages. *Phytochemistry Letters* **2019**, *30*, 309-313, doi:10.1016/j.phytol.2019.02.008.
180. Dudek, M.K.; Michalak, B.; Woźniak, M.; Czerwińska, M.E.; Filipek, A.; Granica, S.; Kiss, A.K. Hydroxycinnamoyl derivatives and secoiridoid glycoside derivatives from Syringa vulgaris flowers and their effects on the pro-inflammatory responses of human neutrophils. *Fitoterapia* **2017**, *121*, 194-205, doi:10.1016/j.fitote.2017.07.008.
181. Woźniak, M.; Michalak, B.; Wyszomierska, J.; Dudek, M.K.; Kiss, A.K. Effects of Phytochemically Characterized Extracts From Syringa vulgaris and Isolated Secoiridoids on Mediators of Inflammation in a Human Neutrophil Model. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 349, doi:10.3389/fphar.2018.00349.
182. Zapolska-Downar, D.; Siennicka, A.; Chełstowski, K.; Widecka, K.; Goracy, I.; Hałasa, M.; Machaliński, B.; Naruszewicz, M. Is there an association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and functional activation of monocytes and macrophage in young patients with essential hypertension? *J Hypertens* **2006**, *24*, 1565-1573, doi:10.1097/01.hjh.0000239292.32883.38.
183. Zapolska-Downar, D.; Naruszewicz, M.; Zapolski-Downar, A.; Markiewski, M.; Bukowska, H.; Millo, B. Ibuprofen inhibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and non-smokers. *Eur J Clin Invest* **2000**, *30*, 1002-1010, doi:10.1046/j.1365-2362.2000.00742.x.
184. Sharif, O.; Bolshakov, V.N.; Raines, S.; Newham, P.; Perkins, N.D. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunology* **2007**, *8*, 1, doi:10.1186/1471-2172-8-1.
185. Xu, X.; Li, Q.; Pang, L.; Huang, G.; Huang, J.; Shi, M.; Sun, X.; Wang, Y. Arctigenin promotes cholesterol efflux from THP-1 macrophages through PPAR- γ /LXR- α signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *441*, 321-326, doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.050.

186. Qin, J.; Zhang, J.; Shi, M.; Xi, L.; Zhang, J. Effect of *Fonsecaea monophora* on the Polarization of THP-1 Cells to Macrophages. *Mycopathologia* **2020**, *185*, 467-476, doi:10.1007/s11046-020-00444-x.
187. Liu, T.; Huang, T.; Li, J.; Li, A.; Li, C.; Huang, X.; Li, D.; Wang, S.; Liang, M. Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLoS One* **2023**, *18*, e0286056, doi:10.1371/journal.pone.0286056.
188. Mohd Yasin, Z.N.; Mohd Idrus, F.N.; Hoe, C.H.; Yvonne-Tee, G.B. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation* **2022**, *128*, 67-82, doi:10.1016/j.diff.2022.10.001.
189. Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 12827. doi: 10.3390/ijms222312827.
190. Shang, L.; Deng, D.; Buskermolen, J.K.; Roffel, S.; Janus, M.M.; Krom, B.P.; Crielaard, W.; Gibbs, S. Commensal and Pathogenic Biofilms Alter Toll-Like Receptor Signaling in Reconstructed Human Gingiva. *Front Cell Infect Microbiol* **2019**, *9*, 282, doi:10.3389/fcimb.2019.00282.
191. Branco, A.; Pereira, N.Z.; Yoshikawa, F.S.Y.; Oliveira, L.; Teixeira, F.M.E.; Oliveira, L.M.; Pietrobon, A.J.; Torrealba, M.P.; de Lima, J.F.; Duarte, A.; et al. Proinflammatory profile of neonatal monocytes induced by microbial ligands is downmodulated by histamine. *Sci Rep* **2019**, *9*, 13721, doi:10.1038/s41598-019-50227-8.
192. Yuen, T.; Wurmbach, E.; Pfeffer, R.L.; Ebersole, B.J.; Sealfon, S.C. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, e48, doi:10.1093/nar/30.10.e48.
193. Ren, G.; Juhl, M.; Peng, Q.; Fink, T.; Porsborg, S.R. Selection and validation of reference genes for qPCR analysis of differentiation and maturation of THP-1 cells into M1 macrophage-like cells. *Immunol Cell Biol* **2022**, *100*, 822-829, doi:10.1111/imcb.12590.
194. Kitagawa, S., Nishibe, S., Benecke, R., and Thieme, H. . Phenolic compounds from *Forsythia* leaves II. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 3667–3670, doi:10.1248/cpb.36.3667.
195. Kiss, A.K.; Michalak, B.; Patyra, A.; Majdan, M. UHPLC-DAD-ESI-MS/MS and HPTLC profiling of ash leaf samples from different commercial and natural sources and their *in vitro* effects on mediators of inflammation. *Phytochem Anal* **2020**, *31*, 57-67, doi:10.1002/pca.2866.
196. Yuan, J.; Dong, X.; Yap, J.; Hu, J. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology* **2020**, *13*, 113, doi:10.1186/s13045-020-00949-4.
197. Gao, Q.; Yang, M.; Zuo, Z. Overview of the anti-inflammatory effects, pharmacokinetic properties and clinical efficacies of arctigenin and arctiin from *Arctium lappa* L. *Acta Pharmacol Sin* **2018**, *39*, 787-801, doi:10.1038/aps.2018.32.
198. Wu, D.; Jin, L.; Huang, X.; Deng, H.; Shen, Q.K.; Quan, Z.S.; Zhang, C.; Guo, H.Y. Arctigenin: pharmacology, total synthesis, and progress in structure modification. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2022**, *37*, 2452-2477, doi:10.1080/14756366.2022.2115035.
199. Raman, M.; Chen, W.; Cobb, M.H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **2007**, *26*, 3100-3112, doi:10.1038/sj.onc.1210392.
200. Chanput, W.; Mes, J.J.; Savelkoul, H.F.; Wichers, H.J. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct* **2013**, *4*, 266-276, doi:10.1039/c2fo30156c.

201. Chanput, W.; Mes, J.; Vreeburg, R.A.; Savelkoul, H.F.; Wichers, H.J. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct* **2010**, *1*, 254-261, doi:10.1039/c0fo00113a.
202. Schildberger, A.; Rossmann, E.; Eichhorn, T.; Strassl, K.; Weber, V. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* **2013**, 697972, doi:10.1155/2013/697972.
203. Ubanako, P.; Xelwa, N.; Ntwasa, M. LPS induces inflammatory chemokines via TLR-4 signalling and enhances the Warburg Effect in THP-1 cells. *PLoS One* **2019**, *14*, e0222614, doi:10.1371/journal.pone.0222614.
204. Xie, M.; Yu, Y.; Kang, R.; Zhu, S.; Yang, L.; Zeng, L.; Sun, X.; Yang, M.; Billiar, T.R.; Wang, H.; et al. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Nature Communications* **2016**, *7*, 13280, doi:10.1038/ncomms13280.
205. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2017**, *2*, 17023, doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
206. Qi, X.F.; Kim, D.H.; Yoon, Y.S.; Jin, D.; Huang, X.Z.; Li, J.H.; Deung, Y.K.; Lee, K.J. Essential involvement of cross-talk between IFN- γ and TNF- α in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J Cell Physiol* **2009**, *220*, 690-697, doi:10.1002/jcp.21815.
207. Cambier, S.; Gouwy, M.; Proost, P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cellular & Molecular Immunology* **2023**, *20*, 217-251, doi:10.1038/s41423-023-00974-6.
208. Consoli, V.; Sorrenti, V.; Grosso, S.; Vanella, L. Heme Oxygenase-1 Signaling and Redox Homeostasis in Physiopathological Conditions. *Biomolecules* **2021**, *11*, 589. doi:10.3390/biom11040589.
209. Światowa Organizacja Zdrowia; Noncommunicable Diseases. Dostęp online: https://www.who.int/health-topics/noncommunicable-diseases#tab=tab_2 (dostęp dnia: 13.11.2023).
210. Światowa Organizacja Zdrowia; Noncommunicable diseases progress monitor 2022. Geneva: 2022. ISBN: 9789240047761.
211. Alkhatib, D.H.; Jaleel, A.; Tariq, M.N.M.; Feehan, J.; Apostolopoulos, V.; Cheikh Ismail, L.; Stojanovska, L.; Dhaheri, A.S.A. The Role of Bioactive Compounds from Dietary Spices in the Management of Metabolic Syndrome: An Overview. *Nutrients* **2021**, *14*, doi:10.3390/nu14010175.
212. Światowa Organizacja Zdrowia: New report shows progress and missed opportunities in the control of NCDs at the national level. Dostęp online: <https://www.who.int/news/item/12-05-2022-new-report-shows-progress-and-missed-opportunities-in-the-control-of-ncds-at-the-national-level>; (dostęp dnia: 13.11.2023).
213. Hwang, Y.H.; Kim, D.G.; Li, W.; Yang, H.J.; Yim, N.H.; Ma, J.Y. Anti-inflammatory effects of *Forsythia suspensa* in dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Ethnopharmacol* **2017**, *206*, 73-77, doi:10.1016/j.jep.2017.05.011.
214. Lee, Y.; Choi, S.Q. Quantitative analysis for lipophilic drug transport through a model lipid membrane with membrane retention. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2019**, *134*, 176-184, doi:10.1016/j.ejps.2019.04.020.
215. Zhu, Q.; Lu, Y.; He, X.; Liu, T.; Chen, H.; Wang, F.; Zheng, D.; Dong, H.; Ma, J. Entropy and Polarity Control the Partition and Transportation of Drug-like Molecules

- in Biological Membrane. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 17749, doi:10.1038/s41598-017-18012-7.
216. Jakubczyk, K.; Koprowska, K.; Gottschling, A.; Janda-Milczarek, K. Edible Flowers as a Source of Dietary Fibre (Total, Insoluble and Soluble) as a Potential Athlete's Dietary Supplement. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:10.3390/nu14122470.
 217. Fu, K.; Li, Y.; Dai, S.; Li, Y. Exploration of the Molecular Basis of *Forsythia* Fruit in the Prevention and Treatment of Cholestatic Liver Injury through Network Pharmacology and Molecular Docking. *Nutrients* **2023**, *15*, doi:10.3390/nu15092065.
 218. Qu, J.; Yan, X.; Li, C.; Wen, J.; Lu, C.; Ren, J.; Peng, Y.; Song, S. Comparative Evaluation of Raw and Ripe Fruits of *Forsythia suspensa* by HPLC–ESI-MS/MS Analysis and Anti-Microbial Assay. *Journal of Chromatographic Science* **2017**, *55*, 451-458, doi:10.1093/chromsci/bmw203.
 219. Sanjabi, S.; Oh, S.A.; Li, M.O. Regulation of the immune response by TGF- β : from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2017**, *9*, a022236.
 220. Wojdasiewicz, P.; Poniatowski Ł, A.; Szukiewicz, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* **2014**, *2014*, 561459, doi:10.1155/2014/561459.
 221. Mirsanei, Z.; Heidari, N.; Hazrati, A.; Asemami, Y.; Niknam, B.; Yousefi, Z.; Jafari, R. Oleuropein reduces LPS-induced inflammation via stimulating M2 macrophage polarization. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2023**, *163*, 114857, doi:10.1016/j.biopha.2023.114857.
 222. Feng, Z.; Li, X.; Lin, J.; Zheng, W.; Hu, Z.; Xuan, J.; Ni, W.; Pan, X. Oleuropein inhibits the IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in human osteoarthritis chondrocytes. *Food Funct* **2017**, *8*, 3737-3744, doi:10.1039/c7fo00823f.
 223. Castejón, M.L.; Montoya, T.; Alarcón-de-la-Lastra, C.; González-Benjumea, A.; Vázquez-Román, M.V.; Sánchez-Hidalgo, M. Dietary oleuropein and its acyl derivative ameliorate inflammatory response in peritoneal macrophages from pristane-induced SLE mice via canonical and noncanonical NLRP3 inflammasomes pathway. *Food Funct* **2020**, *11*, 6622-6631, doi:10.1039/d0fo00235f.
 224. Cui, Y.; Gao, H.; Han, S.; Yuan, R.; He, J.; Zhuo, Y.; Feng, Y.L.; Tang, M.; Feng, J.; Yang, S. Oleuropein Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury *In Vitro* and *In Vivo* by Regulating Toll-Like Receptor 4 Dimerization. *Front Pharmacol* **2021**, *12*, 617314, doi:10.3389/fphar.2021.617314.
 225. Engelhardt, K.R.; Shah, N.; Faizura-Yeop, I.; Kocacik Uygun, D.F.; Frede, N.; Muise, A.M.; Shteyer, E.; Filiz, S.; Chee, R.; Elawad, M.; et al. Clinical outcome in IL-10- and IL-10 receptor-deficient patients with or without hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol* **2013**, *131*, 825-830, doi:10.1016/j.jaci.2012.09.025.
 226. Jung, M.; Sola, A.; Hughes, J.; Kluth, D.C.; Vinuesa, E.; Viñas, J.L.; Pérez-Ladaga, A.; Hotter, G. Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2. *Kidney International* **2012**, *81*, 969-982, doi:10.1038/ki.2011.446.
 227. Duell, B.L.; Carey, A.J.; Tan, C.K.; Cui, X.; Webb, R.I.; Totsika, M.; Schembri, M.A.; Derrington, P.; Irving-Rodgers, H.; Brooks, A.J.; et al. Innate transcriptional networks activated in bladder in response to uropathogenic *Escherichia coli* drive diverse biological pathways and rapid synthesis of IL-10 for defense against bacterial urinary tract infection. *J Immunol* **2012**, *188*, 781-792, doi:10.4049/jimmunol.1101231.

228. Shi, J.; Shi, S.; Xie, W.; Zhao, M.; Li, Y.; Zhang, J.; Li, N.; Bai, X.; Cai, W.; Hu, X.; et al. IL-10 alleviates lipopolysaccharide-induced skin scarring via IL-10R/STAT3 axis regulating TLR4/NF- κ B pathway in dermal fibroblasts. *J Cell Mol Med* **2021**, *25*, 1554-1567, doi:10.1111/jcmm.16250.
229. Vivarelli, S.; Costa, C.; Teodoro, M.; Giambò, F.; Tsatsakis, A.M.; Fenga, C. Polyphenols: a route from bioavailability to bioactivity addressing potential health benefits to tackle human chronic diseases. *Archives of Toxicology* **2023**, *97*, 3-38, doi:10.1007/s00204-022-03391-2.
230. Wang, Q.Q.; Han, S.; Li, X.X.; Yuan, R.; Zhuo, Y.; Chen, X.; Zhang, C.; Chen, Y.; Gao, H.; Zhao, L.C.; et al. Nuezhenide Exerts Anti-Inflammatory Activity through the NF- κ B Pathway. *Curr Mol Pharmacol* **2021**, *14*, 101-111, doi:10.2174/1874467213666200611141337.
231. Peñalvo, J.L.; Haajanen, K.M.; Botting, N.; Adlercreutz, H. Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **2005**, *53*, 9342-9347, doi:10.1021/jf051488w.
232. Milder, I.E.J.; Feskens, E.J.M.; Arts, I.C.W.; de Mesquita, H.B.B.; Hollman, P.C.H.; Kromhout, D. Intake of the Plant Lignans Secoisolariciresinol, Matairesinol, Lariciresinol, and Pinoresinol in Dutch Men and Women. *The Journal of Nutrition* **2005**, *135*, 1202-1207, doi:10.1093/jn/135.5.1202.
233. Peñalvo, J.L.; López-Romero, P. Urinary enterolignan concentrations are positively associated with serum HDL cholesterol and negatively associated with serum triglycerides in U.S. adults. *J Nutr* **2012**, *142*, 751-756, doi:10.3945/jn.111.150516.
234. Smeds, A.I.; Saarinen, N.M.; Hurmerinta, T.T.; Penttinen, P.E.; Sjöholm, R.E.; Mäkelä, S.I. Urinary excretion of lignans after administration of isolated plant lignans to rats: the effect of single dose and ten-day exposures. *Journal of Chromatography B* **2004**, *813*, 303-312, doi:10.1016/j.jchromb.2004.10.033.
235. Yoder, S.C.; Lancaster, S.M.; Hullar, M.A.J.; Lampe, J.W. Chapter 7 - Gut Microbial Metabolism of Plant Lignans: Influence on Human Health. In *Diet-Microbe Interactions in the Gut*, Tuohy, K., Del Rio, D., Eds.; Academic Press: San Diego, **2015**; pp. 103-117.
236. Dean, B.; Chang, S.; Doss, G.A.; King, C.; Thomas, P.E. Glucuronidation, oxidative metabolism, and bioactivation of enterolactone in rhesus monkeys. *Arch Biochem Biophys* **2004**, *429*, 244-251, doi:10.1016/j.abb.2004.06.023.
237. Quartieri, A.; García-Villalba, R.; Amaretti, A.; Raimondi, S.; Leonardi, A.; Rossi, M.; Tomàs-Barberà, F. Detection of novel metabolites of flaxseed lignans *in vitro* and *in vivo*. *Mol Nutr Food Res* **2016**, *60*, 1590-1601, doi:10.1002/mnfr.201500773.
238. Adolphe, J.L.; Whiting, S.J.; Juurlink, B.H.J.; Thorpe, L.U.; Alcorn, J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *British Journal of Nutrition* **2010**, *103*, 929-938, doi:10.1017/S0007114509992753.
239. Gao, Q.; Zhang, Y.; Wo, S.; Zuo, Z. Hydrolysis is the dominating *in vivo* metabolism pathway for arctigenin: identification of novel metabolites of arctigenin by LC/MS/MS after oral administration in rats. *Planta Med* **2013**, *79*, 471-479, doi:10.1055/s-0032-1328332.
240. Xie, L.-H.; Ahn, E.-M.; Akao, T.; Abdel-Hafez, A.A.-M.; Nakamura, N.; Hattori, M. Transformation of Arctiin to Estrogenic and Antiestrogenic Substances by Human Intestinal Bacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2003**, *51*, 378-384, doi:10.1248/cpb.51.378.
241. Zaineddin, A.K.; Vrieling, A.; Buck, K.; Becker, S.; Linseisen, J.; Flesch-Janys, D.; Kaaks, R.; Chang-Claude, J. Serum enterolactone and postmenopausal breast cancer

- risk by estrogen, progesterone and herceptin 2 receptor status. *Int J Cancer* **2012**, *130*, 1401-1410, doi:10.1002/ijc.26157.
242. Prasad, K. Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *Int J Angiol* **2000**, *9*, 220-225, doi:10.1007/bf01623898.
243. Clavel, T.; Doré, J.; Blaut, M. Bioavailability of lignans in human subjects. *Nutr Res Rev* **2006**, *19*, 187-196, doi:10.1017/s0954422407249704.
244. Jan, K.C.; Ku, K.L.; Chu, Y.H.; Hwang, L.S.; Ho, C.T. Tissue distribution and elimination of estrogenic and anti-inflammatory catechol metabolites from sesaminol triglucoside in rats. *J Agric Food Chem* **2010**, *58*, 7693-7700, doi:10.1021/jf1009632.
245. Gong, X.; Luan, Q.; Zhou, X.; Zhao, Y.; Zhao, C. UHPLC-ESI-MS/MS determination and pharmacokinetics of pinoresinol glucoside and chlorogenic acid in rat plasma after oral administration of *Eucommia ulmoides* Oliv extract. *Biomed Chromatogr* **2017**, *31*, doi:10.1002/bmc.4008.
246. Niemeyer, H.B.; Honig, D.M.; Kulling, S.E.; Metzler, M. Studies on the metabolism of the plant lignans secoisolariciresinol and matairesinol. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 6317-6325, doi:10.1021/jf030263n.
247. Peñalvo, J.L.; Nurmi, T.; Haajanen, K.; Al-Maharik, N.; Botting, N.; Adlercreutz, H. Determination of lignans in human plasma by liquid chromatography with coulometric electrode array detection. *Anal Biochem* **2004**, *332*, 384-393, doi:10.1016/j.ab.2004.05.046.
248. Smeds, A.I.; Hakala, K.; Hurmerinta, T.T.; Kortela, L.; Saarinen, N.M.; Mäkelä, S.I. Determination of plant and enterolignans in human serum by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal* **2006**, *41*, 898-905, doi:10.1016/j.jpba.2005.12.036.
249. Hitti, E.; Iakovleva, T.; Brook, M.; Deppenmeier, S.; Gruber, A.D.; Radzioch, D.; Clark, A.R.; Blackshear, P.J.; Kotlyarov, A.; Gaestel, M. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetrapirolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol* **2006**, *26*, 2399-2407, doi:10.1128/mcb.26.6.2399-2407.2006.
250. Wu, Q.; Wang, Y.; Li, Q. Matairesinol exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in sepsis-mediated brain injury by repressing the MAPK and NF- κ B pathways through up-regulating AMPK. *Aging (Albany NY)* **2021**, *13*, 23780-23795, doi:10.18632/aging.203649.
251. Martin, W.J.; Walton, M.; Harper, J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. *Arthritis Rheum* **2009**, *60*, 281-289, doi:10.1002/art.24185.
252. Lee, S.; Shin, S.; Kim, H.; Han, S.; Kim, K.; Kwon, J.; Kwak, J.-H.; Lee, C.-K.; Ha, N.-J.; Yim, D.; et al. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF- κ B pathways. *Journal of Inflammation* **2011**, *8*, 16, doi:10.1186/1476-9255-8-16.
253. Cho, M.K.; Jang, Y.P.; Kim, Y.C.; Kim, S.G. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF- α inhibition. *International Immunopharmacology* **2004**, *4*, 1419-1429, doi:https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.06.011.
254. Deshmane, S.L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* **2009**, *29*, 313-326, doi:10.1089/jir.2008.0027.

255. Jiao, P.; Chen, Q.; Shah, S.; Du, J.; Tao, B.; Tzamelis, I.; Yan, W.; Xu, H. Obesity-Related Upregulation of Monocyte Chemotactic Factors in Adipocytes : Involvement of Nuclear Factor- κ B and c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathways. *Diabetes* **2009**, *58*, 104-115, doi:10.2337/db07-1344.
256. Zhou, Y.; Ling, E.A.; Dheen, S.T. Dexamethasone suppresses monocyte chemoattractant protein-1 production via mitogen activated protein kinase phosphatase-1 dependent inhibition of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in activated rat microglia. *J Neurochem* **2007**, *102*, 667-678, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04535.x.
257. Song, W.; Wu, J.; Yu, L.; Peng, Z. Evaluation of the Pharmacokinetics and Hepatoprotective Effects of Phillygenin in Mouse. *Biomed Res Int* **2018**, *2018*, 7964318, doi:10.1155/2018/7964318.
258. Wang, Q.; Zhang, J.; Yan, Z.; Wang, L.; Zhang, L. Research on fermentation technology for the conversion from phillyrin to phillygenin in *Forsythia suspense* leaves. *Chemical Research and Application* **2020**, *32*, 144-149.
259. Zhou, M.; Tang, Y.; Liao, L.; Liu, M.; Deng, Y.; Zhao, X.; Li, Y. Phillygenin inhibited LPS-induced RAW 264.7 cell inflammation by NF- κ B pathway. *European Journal of Pharmacology* **2021**, *899*, 174043, doi:https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174043.
260. Zhang, P.; Jin, Y.; Xia, W.; Wang, X.; Zhou, Z. Phillygenin inhibits inflammation in chondrocytes via the Nrf2/NF- κ B axis and ameliorates osteoarthritis in mice. *Journal of Orthopaedic Translation* **2023**, *41*, 1-11, doi:https://doi.org/10.1016/j.jot.2023.03.002.
261. Wang, J.; Chen, G.; Zhang, Q.; Zhao, F.; Yu, X.; Ma, X.; Liu, M. Phillyrin Attenuates Osteoclast Formation and Function and Prevents LPS-Induced Osteolysis in Mice. *Frontiers in Pharmacology* **2019**, *10*, doi:10.3389/fphar.2019.01188.
262. Cheung, P.C.; Campbell, D.G.; Nebreda, A.R.; Cohen, P. Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *Embo j* **2003**, *22*, 5793-5805, doi:10.1093/emboj/cdg552.
263. Mahmoud, L.; Al-Enezi, F.; Al-Saif, M.; Warsy, A.; Khabar, K.S.; Hitti, E.G. Sustained stabilization of Interleukin-8 mRNA in human macrophages. *RNA Biol* **2014**, *11*, 124-133, doi:10.4161/rna.27863.
264. Nagesh, R.; Kiran Kumar, K.M.; Naveen Kumar, M.; Patil, R.H.; Sharma, S.C. Regulation of Jun and Fos AP-1 transcription factors by JNK MAPKs signaling cascade in areca nut extract treated KB cells. *Biochem Biophys Rep* **2021**, *27*, 101090, doi:10.1016/j.bbrep.2021.101090.
265. Okada, S.; Obata, S.; Hatano, M.; Tokuhisa, T. Dominant-negative effect of the c-fos family gene products on inducible NO synthase expression in macrophages. *Int Immunol* **2003**, *15*, 1275-1282, doi:10.1093/intimm/dxg126.
266. Coperchini, F.; Chiovato, L.; Rotondi, M. Interleukin-6, CXCL10 and Infiltrating Macrophages in COVID-19-Related Cytokine Storm: Not One for All But All for One! *Frontiers in Immunology* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.668507.
267. Utsugi, M.; Dobashi, K.; Ono, A.; Ishizuka, T.; Hisada, T.; Koga, Y.; Shimizu, Y.; Kawata, T.; Matsuzaki, S.-i.; Aoki, H.; et al. JNK1 and JNK2 differently regulate IL-12 production in THP-1 macrophage cells. *Cytokine* **2010**, *51*, 127-131, doi:10.1016/j.cyto.2010.04.002.
268. Kim, H.; Caulfield, L.E.; Garcia-Larsen, V.; Steffen, L.M.; Coresh, J.; Rebholz, C.M. Plant-Based Diets Are Associated With a Lower Risk of Incident Cardiovascular Disease, Cardiovascular Disease Mortality, and All-Cause Mortality in a General Population of Middle-Aged Adults. *J Am Heart Assoc* **2019**, *8*, e012865, doi:10.1161/jaha.119.012865.

269. Collaborators, G.R.F. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1923-1994, doi:10.1016/s0140-6736(18)32225-6.
270. Zhu, Y.; Xian, X.; Wang, Z.; Bi, Y.; Chen, Q.; Han, X.; Tang, D.; Chen, R. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules* **2018**, *8*, doi:10.3390/biom8030080.
271. Ridker, P.M.; Libby, P.; MacFadyen, J.G.; Thuren, T.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Koenig, W.; Shimokawa, H.; Everett, B.M.; Glynn, R.J. Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Heart J* **2018**, *39*, 3499-3507, doi:10.1093/eurheartj/ehy310.
272. Nidorf, S.M.; Fiolet, A.T.L.; Mosterd, A.; Eikelboom, J.W.; Schut, A.; Opstal, T.S.J.; The, S.H.K.; Xu, X.F.; Ireland, M.A.; Lenderink, T.; et al. Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med* **2020**, *383*, 1838-1847, doi:10.1056/NEJMoa2021372.
273. Song, X.; Wang, X.; Wang, D.; Zheng, Z.; Li, J.; Li, Y. Natural drugs targeting inflammation pathways can be used to treat atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, *13*, doi:10.3389/fphar.2022.998944.
274. Penson, P.E.; Banach, M. Natural compounds as anti-atherogenic agents: Clinical evidence for improved cardiovascular outcomes. *Atherosclerosis* **2021**, *316*, 58-65, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.11.015.
275. Ruiz-León, A.M.; Lapuente, M.; Estruch, R.; Casas, R. Clinical Advances in Immunonutrition and Atherosclerosis: A Review. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.00837.
276. Tresserra-Rimbau, A.; Rimm, E.B.; Medina-Remón, A.; Martínez-González, M.A.; de la Torre, R.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Gómez-Gracia, E.; Lapetra, J.; Arós, F.; et al. Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2014**, *24*, 639-647, doi:10.1016/j.numecd.2013.12.014.
277. Marblestone B.; The effects of flaxseed SDG on perimenopausal women with mild hyperlipidemia. *Dissertations* **2008**, 364, doi: <https://doi.org/10.22371/07.2008.007>
278. Koemel, N.A.; Senior, A.M.; Benmarhnia, T.; Holmes, A.; Okada, M.; Oulhote, Y.; Parker, H.M.; Shah, S.; Simpson, S.J.; Raubenheimer, D.; et al. Diet Quality, Microbial Lignan Metabolites, and Cardiometabolic Health among US Adults. *Nutrients* **2023**, *15*, 1412. doi:10.3390/nu15061412
279. Sheedy, F.J.; Grebe, A.; Rayner, K.J.; Kalantari, P.; Ramkhelawon, B.; Carpenter, S.B.; Becker, C.E.; Ediriweera, H.N.; Mullick, A.E.; Golenbock, D.T.; et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature Immunology* **2013**, *14*, 812-820, doi:10.1038/ni.2639.
280. Drygalski, K.; Berk, K.; Charytoniuk, T.; Iłowska, N.; Łukaszuk, B.; Chabowski, A.; Konstantynowicz-Nowicka, K. Does the enterolactone (ENL) affect fatty acid transporters and lipid metabolism in liver? *Nutr Metab (Lond)* **2017**, *14*, 69, doi:10.1186/s12986-017-0223-1.
281. Wang, H.; Wang, C.; Zou, Y.; Hu, J.; Li, Y.; Cheng, Y. Natural polyphenols in drug delivery systems: Current status and future challenges. *Giant* **2020**, *3*, 100022, doi:10.1016/j.giant.2020.100022.

282. Zhang, S.; Xu, M.; Zhang, W.; Liu, C.; Chen, S. Natural Polyphenols in Metabolic Syndrome: Protective Mechanisms and Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 6110. doi: 10.3390/ijms22116110
283. Drira, R.; Chen, S.; Sakamoto, K. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life Sciences* **2011**, *89*, 708-716, doi:10.1016/j.lfs.2011.08.012.
284. Filipek, A.; Mikołajczyk, T.P.; Guzik, T.J.; Naruszewicz, M. Oleacein and Foam Cell Formation in Human Monocyte-Derived Macrophages: A Potential Strategy against Early and Advanced Atherosclerotic Lesions. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 64. doi:10.3390/ph13040064
285. Li, X.Y.; Kong, L.X.; Li, J.; He, H.X.; Zhou, Y.D. Kaempferol suppresses lipid accumulation in macrophages through the downregulation of cluster of differentiation 36 and the upregulation of scavenger receptor class B type I and ATP-binding cassette transporters A1 and G1. *Int J Mol Med* **2013**, *31*, 331-338, doi:10.3892/ijmm.2012.1204.
286. Choi, J.-S.; Bae, J.-Y.; Kim, D.S.; Li, J.; Kim, J.-L.; Lee, Y.-J.; Kang, Y.-H. Dietary Compound Quercitrin Dampens VEGF Induction and PPAR γ Activation in Oxidized LDL-Exposed Murine Macrophages: Association with Scavenger Receptor CD36. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 1333-1341, doi:10.1021/jf9032443.
287. Voloshyna, I.; Hai, O.; Littlefield, M.J.; Carsons, S.; Reiss, A.B. Resveratrol mediates anti-atherogenic effects on cholesterol flux in human macrophages and endothelium via PPAR γ and adenosine. *European Journal of Pharmacology* **2013**, *698*, 299-309, doi:10.1016/j.ejphar.2012.08.024.
288. Chen, X.-L.; Liang, P.-L.; Gong, M.-J.; Xu, Y.; Zhang, L.; Qiu, X.-H.; Zhang, J.; Huang, Z.-H.; Xu, W. Polyphenolics from *Syzygium brachythyrsum* Inhibits Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Macrophage-Derived Foam Cell Formation and Inflammation. *Foods* **2022**, *11*, 3543, doi: 10.3390/foods11213543
289. Yvan-Charvet, L.; Ranalletta, M.; Wang, N.; Han, S.; Terasaka, N.; Li, R.; Welch, C.; Tall, A.R. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* **2007**, *117*, 3900-3908, doi:10.1172/jci33372.
290. Yu, X.-H.; Fu, Y.-C.; Zhang, D.-W.; Yin, K.; Tang, C.-K. Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* **2013**, *424*, 245-252, doi:10.1016/j.cca.2013.06.006.
291. Liu, N.; Wu, C.; Sun, L.; Zheng, J.; Guo, P. Sesamin enhances cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. *Molecules* **2014**, *19*, 7516-7527, doi:10.3390/molecules19067516.
292. Uitz, E.; Bahadori, B.; McCarty, M.F.; Moghadasian, M.H. Practical strategies for modulating foam cell formation and behavior. *World J Clin Cases* **2014**, *2*, 497-506, doi:10.12998/wjcc.v2.i10.497.
293. Juan, S.H.; Lee, T.S.; Tseng, K.W.; Liou, J.Y.; Shyue, S.K.; Wu, K.K.; Chau, L.Y. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **2001**, *104*, 1519-1525, doi:10.1161/hc3801.095663.
294. Orozco, L.D.; Kapturczak, M.H.; Barajas, B.; Wang, X.; Weinstein, M.M.; Wong, J.; Deshane, J.; Bolisetty, S.; Shaposhnik, Z.; Shih, D.M.; et al. Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ Res* **2007**, *100*, 1703-1711, doi:10.1161/circresaha.107.151720.
295. Kwon, D.H.; Cha, H.J.; Choi, E.O.; Leem, S.H.; Kim, G.Y.; Moon, S.K.; Chang, Y.C.; Yun, S.J.; Hwang, H.J.; Kim, B.W.; et al. Schisandrin A suppresses lipopolysaccharide-

- induced inflammation and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages by suppressing the NF- κ B, MAPKs and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling. *Int J Mol Med* **2018**, *41*, 264-274, doi:10.3892/ijmm.2017.3209.
296. Jeong, Y.H.; Hwang, Y.H.; Kim, T.I.; Oh, Y.C.; Ma, J.Y. *Forsythia* Fruit Prevents Fulminant Hepatitis in Mice and Ameliorates Inflammation in Murine Macrophages. *Nutrients* **2021**, *13*, doi:10.3390/nu13082901.
297. Wang, Y.; Moser, A.H.; Shigenaga, J.K.; Grunfeld, C.; Feingold, K.R. Downregulation of liver X receptor-alpha in mouse kidney and HK-2 proximal tubular cells by LPS and cytokines. *J Lipid Res* **2005**, *46*, 2377-2387, doi:10.1194/jlr.M500134-JLR200.
298. Han, X.; Kitamoto, S.; Wang, H.; Boisvert, W.A. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Faseb j* **2010**, *24*, 2869-2880, doi:10.1096/fj.09-148155.
299. Zhang, S.; Jiang, L.; Che, F.; Lu, Y.; Xie, Z.; Wang, H. Arctigenin attenuates ischemic stroke via SIRT1-dependent inhibition of NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun* **2017**, *493*, 821-826, doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.062.
300. Luo, H.; Wang, J.; Qiao, C.; Ma, N.; Liu, D.; Zhang, W. Pycnogenol attenuates atherosclerosis by regulating lipid metabolism through the TLR4-NF- κ B pathway. *Exp Mol Med* **2015**, *47*, e191, doi:10.1038/emm.2015.74.

