

Celem niniejszego projektu było wykazanie czy standaryzowane wyciągi wodne otrzymane z ziela trzech najpopularniejszych gatunków *Epilobium* mogą wpływać na proliferację komórek prostaty hormonozależnych (LNCaP), na wydzielanie antygenu gruczołu krokowego (PSA), oraz czy ten efekt może być związany z hamowaniem aktywności acetylotransferazy histonowej (HAT). Istotnym celem pracy było wskazanie które ze związków występujących w tych wyciągach mogą odpowiadać za ich działanie: oenothaina B, kwas elagowy i jego pochodne czy flawonoidy. Nie mniej ważnym aspektem projektu było wykazanie czy urolityny są aktywnymi metabolitami związków (elagotanoidów) występujących w wyciągach z ziela badanych gatunków rodzaju *Epilobium* sp.

Niniejsze badania zostały podzielone na dwie części: część fitochemiczną i biologiczną. Część fitochemiczna stanowiła wstęp do badań biologicznych i miała na celu: scharakteryzowanie składu jakościowego i ilościowego (standaryzację) badanych wyciągów, wyizolowanie związków, wcześniej nie opisanych w badanych gatunkach rodzaju *Epilobium* oraz wskazanie głównych składników wyciągów, których działanie biologiczne zostało określone w części biologicznej niniejszej pracy. Część fitochemiczna obejmowała też zbadanie powstawania metabolitów urolityn z bogatych w elagotanoidy wyciągów *Epilobium* pod wpływem enzymów bakterii jelitowych.

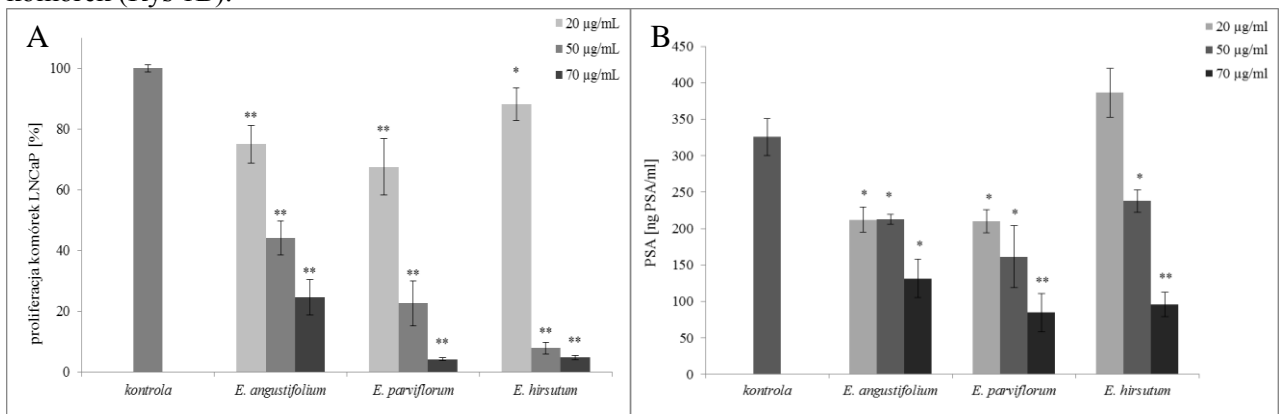
Analiza ilościowa badanych wyciągów wykazała, że są one bogate w polifenole (23,8-28,0%). Przy użyciu metody HPLC-DAD-MS/MS, wykorzystując substancje wzorcowe i/lub dane literaturowe (czasy retencji, widma UV, widma MS) zidentyfikowano 38 związków polifenolowych (z grupy elagotanoidów, flawonoidów i fenolokwasów) w badanych wyciągach. W badanych trzech gatunkach rodzaju *Epilobium* stwierdzono obecność elagotanoidu – oenoteiny B, który był związkiem dominującym w wyciągach. Przy użyciu metody HPLC-DAD oznaczono zawartość oenoteiny B w poszczególnych wyciągach. (23,5±0,3% - 15,7±0,1%). Kolejną grupą związków obecnych w badanych wyciągach była grupa flawonoidów (glikozydów flawon-3-olu) – pochodnych kwercetyny, kemferolu oraz mirycetyny. Dodatkowo zidentyfikowano kwasy fenolowe - kwas galusowy, kwas elagowy, kwas ferulochinowy, dwa izomery kwasu kawoilochinowego, trzy izomery kwasu kumarylochinowego oraz pochodne fenolokwasów. Po raz pierwszy w wyciągach z ziela trzech gatunków rodzaju *Epilobium* sp. zidentyfikowano: galoilo-HHDP-glukozę, digaloilo-HHDP-glukozę, bis-HHDP-glukozę, trigaloiloglukozę oraz pentagaloiloglukozę. Poszczególne badane wyciągi z ziela trzech gatunków rodzaju *Epilobium* charakteryzowały się dużą zawartością flawonoidów przy czym występowały różnice w składzie jakościowym wyciągów pomiędzy badanymi gatunkami. I tak flawonoidami dominującymi w wyciągach z ziela *E. angustifolium* był kwercetyny-3-*O*-glukuronid. W wyciągach z ziela *E. parviflorum* z grupy flawonoidów związkiem dominującym był mirycetyny-3-*O*-ramnozyd. Związek ten występował również w wyciągach z ziela *E. hirsutum*, jednak flawonoidem dominującym w tym gatunku był mirycetyny-3-*O*-galaktozyd.

W toku niniejszej pracy z ziela trzech gatunków rodzaju *Epilobium* wyizolowano 4 związki. Z ziela *E. angustifolium* wyizolowano dwie pochodne kwasu elagowego nieopisane wcześniej w badanej substancji roślinnej: dilakton kwasu waloneikowego i ester metylowy dilaktonu kwasu waloneikowego. Z ziela wierzbownicy kosmatej wyizolowano flawonoid: mirycetyny-3-*O*-arabinozyd, z ziela wierzbownicy drobnokwiatowej mirycetyny-3-*O*-galaktozyd. Pochodne mirycetyny wyizolowane w toku niniejszej pracy zostały wyizolowane z badanych substancjach roślinnych po raz pierwszy. Wykazano także, że pod wpływem flory bakteryjnej jelitowej z wyciągów z *Epilobium* powstają niskocząsteczkowe łatwo wchłaniane urolityny. Trzy głównie powstające urolityny zsyntetyzowano do dalszych badań biologicznych.

W części biologicznej projektu zbadano wpływ standaryzowanych wyciągów z ziela trzech gatunków rodzaju *Epilobium* na wybrane funkcje ludzkich komórek raka prostaty (LNCaP).

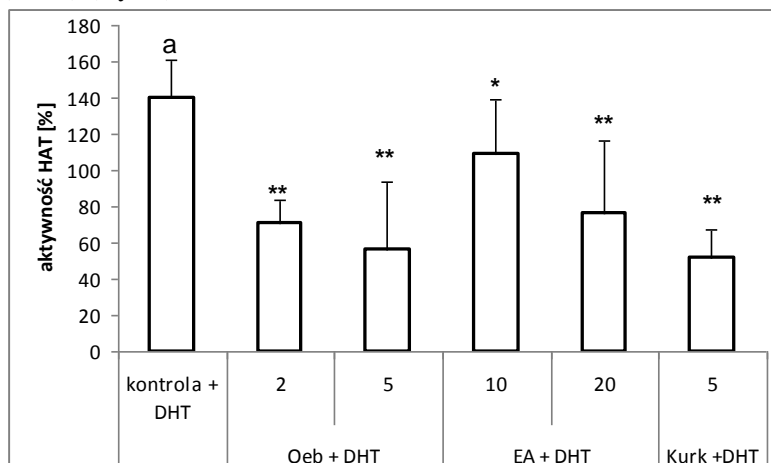
Określono wpływ wyciągów na proliferację ludzkich komórek raka prostaty hormonozależnego – LNCaP. Badane wyciągi z ziela *E. angustifolium*, *E. parviflorum* i *E. hirsutum* hamowały proliferację komórek ludzkiego raka prostaty hormonozależnego (LNCaP) w sposób zależny od stężenia wyciągu (IC₅₀=32,2±5,6 - 44,6±7,3µg/ml) w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Jednocześnie wykazano znacznie słabsze statystycznie działanie w stosunku do komórek fizjologicznych (nabłonka prostaty i fibroblastów skóry) oraz brak działania w stosunku do komórek raka prostaty hormono-niezależnego (DU 145). Inkubacja komórek LNCaP z roztworami badanych wyciągów spowodowała zmniejszenie wydzielania PSA przez komórki LNCaP. Wyciąg wodny w *E. angustifolium* oraz *E. parviflorum*, wykazywał najsilniejszy wpływ hamujący na wydzielanie antygenu gruczołu krokowego (Rys 1A)

przy jednoczesnym nieco mniejszym, lecz nie statystycznie znamionym wpływie na proliferację komórek (Rys 1B).



Rys 1. Wpływ wyciągów wodnych z ziela *E. angustifolium*, *E. parviflorum* i *E. hirsutum* na wydzielanie antygeny gruczołu krokowego (A) oraz na proliferację komórek (B) przez komórki LNCaP po 72 h inkubacji komórek. Wyniki przedstawiano jako średnią ± błąd standardowy, $P < 0,05(*)$ i $< 0,01(**)$.

Może to wskazywać, że wpływ wyciągów na wydzielanie PSA nie związane tylko z działaniem zmniejszającym żywotność komórek ale może być wynikiem oddziaływania na receptor androgenowy lub co wykazano w kolejnych doświadczeniach z wpływem na zmniejszenie aktywności acetylotransferazy histonowej (HAT). Wyciąg wodny w *Epilobium angustifolium* (EA), w stężeniach 10 i 20 µg/ml statystycznie znamionnie hamował aktywność HAT stymulowaną dihydrotestosteronem (DHT) (Rys 2).



Rys 2. Wpływ wyciągów wodnego z ziela *E. angustifolium* (EA), oenotheiny B (OeB) oraz kontroli pozytywnej kurkuminy (Kurk) na aktywność acetylotransferazy histonowej (HAT). Wyniki przedstawiano jako średnią ± błąd standardowy, za 100% aktywności przyjęto aktywność HAT komórek nie stymulowanych DHT, $P < 0,01(a)$ vs kontrola - DHT; $P < 0,05(*)$ i $< 0,01(**)$ vs kontrola + DHT, .

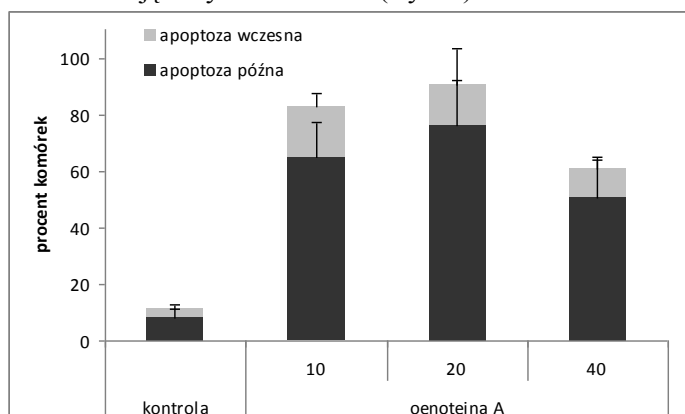
Wstępne wyniki (ocena mikroskopowa połączona z barwieniem bisbenzamidem) wskazały, że w wyniku inkubacji z badanymi wyciągami, pojawiają się liczne komórki apoptotyczne.

Dlatego wykonano dogłębniejsze badania wpływu wyciągów na apoptozę ludzkich komórek raka prostaty hormonozależnego - LNCaP (przy użyciu cytometrii przepływową). Badane wyciągi zwiększały apoptozę komórek ludzkiego raka prostaty hormonozależnego (LNCaP) w sposób zależny od stężenia wyciągu w porównaniu z komórkami kontrolnymi (ponad 50% komórek apoptotycznych przy stężeniu 20 µg/ml). Biorąc pod uwagę silny wpływ badanych wyciągów na apoptozę komórek LNCaP wykonano dalsze badania wskazujące na działanie ekstraktów poprzez szlak wewnętrzny apoptozy: znaczący wpływ na spadek potencjału mitochondrialnego komórek LNCaP oraz znamienne

zwiększenie aktywności enzymatyczną kaspazy-3. Dotychczas nie wykazano wpływu wyciągów z różnych gatunków rodzaju *Epilobium* na apoptozę komórek LNCaP.

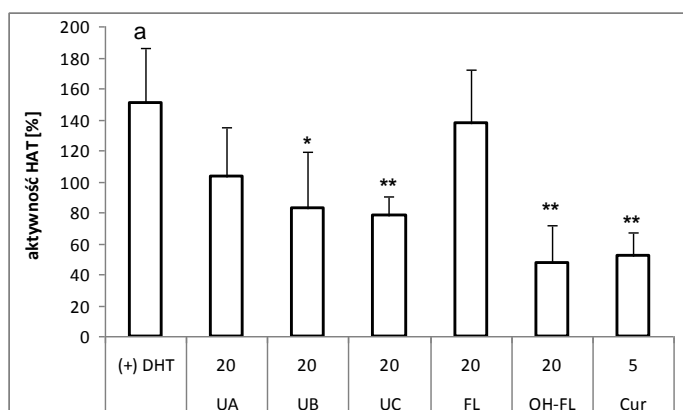
Duża zawartość oenoteiny B w badanych w pracy wyciągach wodnych może sugerować, że związek ten jest odpowiedzialny za działanie biologiczne wyciągów zaobserwowane w niniejszej pracy. Biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonych badań biologicznych jak również różnice w składzie jakościowym i ilościowym pomiędzy badanymi wyciągami główne/dominujące składniki wyciągów zostały wybrane i ich wpływ na wybrane funkcje komórek LNCaP został określony. Wybrano związek dominujący we wszystkich wyciągach wodnych – oenoteinę B oraz 3 flawonoidy: kwercetyny-3-*O*-glukuronid, kemferolu-3-*O*-glukuronid (związki dominujące w ziele *E. angustifolium*), mirycetyny-3-*O*-ramnozyd (związek charakterystyczny dla ziele *E. parviflorum* i *E. hirsutum*). Dodatkowo wybrano kwas galusowy, kwas elagowy i dilakton kwasu waloneikowego ponieważ oba mogą powstawać w czasie rozkładu oenoteiny B.

Wszystkie badane związki były aktywne w stosunku do komórek LNCaP ale obecny elagotanoid oenoteina B był najsilniejszym inhibitorem proliferacji ($IC_{50}=7.8\pm 0.8 \mu M$) oraz wydzielania PSA ($IC_{50}=21.9\pm 3.2 \mu M$). Dodatkowo wykazano korelację pomiędzy zawartością oenoteiny B w badanych wyciągach wodnych a ich zdolnością do hamowania proliferacji komórek ($r 0.99$) i wydzielania PSA ($r 0.92$). Także oenoteina B była odpowiedzialna za obserwowaną apoptozę komórek LNCaP (Rys. 3) oraz inhibicję aktywności HAT (Rys. 2).



Rys 3. Wpływ, oenoteiny B na apoptozę komórek LNCaP. Wyniki przedstawiano jako średnią \pm błąd standardowy.

Ponieważ niektóre elagotanoidy mogą być metabolizowane przez bakterie flory jelitowej do urolityn – polifenoli o mniejszej masie cząsteczkowej, które dobrze wchłaniają się z jelita i mogą być oznaczone we krwi w stężeniu nawet ponad $15 \mu M$. W niniejszych badaniach wykazano po raz pierwszy, że elagotanoidy z bogatego w oenoteinę B wyciągu wodnego z ziele *Epilobium* ulegają metabolizmowi do urolityn. Udokumentowano, że już po 24 h inkubacji wyciągu z bakteriami ludzkiej flory jelitowej wytwarzana jest urolityna C i urolityna A. Po 48 h produkowana jest nadal urolityna A oraz urolityna B. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, w toku niniejszej pracy, określono wpływ urolityn na żywotność, proliferację, apoptozę, wydzielanie PSA oraz na aktywność HAT (Rys. 4) w komórkach LNCaP. Wykazano, że we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach, urolityny były aktywnymi metabolitami. Nie były one tak aktywne jak główny składnik wyciągów – oenoteina B, ale wykazany efekt był statystycznie znamieny i zaobserwowany w stężeniach ($10-20 \mu M$) które mogą być osiągalne we krwi po podaniu doustnym.



Rys 2. Wpływ urolityny A (UA), urolityny B (UB), urolityny C (UC), flutamidu (FL), hydroksyflutamidu (OH-FL) oraz kontroli pozytywnej kurkuminy (Cur) na aktywność acetylotransferazy histonowej (HAT). Wyniki przedstawiano jako średnią \pm błąd standardowy, za 100% aktywności przyjęto aktywność HAT komórek nie stymulowanych DHT, $P < 0,01$ (a) vs kontrola – DHT; $P < 0,05$ (*) i $< 0,01$ (**) vs kontrola + DHT.

Reasumując wyniki niniejszej pracy przedstawiają farmakologiczne wyjaśnienie aktywności biologicznej wyciągów z różnych gatunków rodzaju *Epilobium* oraz częściowo potwierdzają celowość ich stosowania w leczeniu schorzeń prostaty. Wszystkie badane gatunki rodzaju *Epilobium* były aktywne w stosunku do komórek LNCaP pomimo pewnych różnic w ich składzie jakościowym i ilościowym. Aktywność biologiczna wyciągów z ziela trzech gatunków rodzaju *Epilobium* sp. związana jest z obecnością różnych związków – głównie oenoteiny B. Niemniej jednak metabolity elagotanoidów (urolityny) mogą również determinować aktywność biologiczną tych substancji roślinnych.