

Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Farmaceutyczny

mgr farm. Kinga Kaczerowska - Pietrzak

**Izolacja, identyfikacja i właściwości biologiczne związków z
ziela *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam./syn.
Stizolophus balsamitaefolius Cass.**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Gerard Nowak

Poznań 2017

Słowa kluczowe: *Centaurea balsamita* subs. *balsamita*, laktony seskwiterpenowe, germakranolidy, nowy glukozyd fenolowy, aktywność przeciwserotoninowa, migrena

Wykaz stosowanych skrótów:

ADP - adenozyndifosforan

CC - Column Chromatography (chromatografia kolumnowa)

CGRP - Calcitonin gene-related peptide (peptyd zależny od kalcytoniny)

COC-1 - cyklooksigenaza 1

COX-2 - cyklooksigenaza 2

CSD - Cortical Spreading Depression (szerząca się depresja korowa)

DMAPP - dimetyloallilpirofosforan

GABA - kwas γ -aminomasłowy

GSH - zredukowany glutation

HDAC1 - deacetylaza histonowa

HPLC - High- Performance Liquid Chromatography (wysokosprawna chromatografia cieczowa)

HR-TOF-ESI-MS - wysokorozdzielcze widmo masowe

ICHD - International Classification of Headache Disorders (Międzynarodowa Klasyfikacja Bólów Głowy)

IHS - International Headache Society (Międzynarodowe Towarzystwo Bólu Głowy)

IPP – izopentylopirofosforan

LR-ESI-MS – niskorozdzielcze widmo masowe

MS - Mass Spectrometry (spektrometria mas)

NMDA - receptor *N*-metylo-*D*-asparaginowy

NLPZ - niesteroidowe leki przeciwzapalne

NMR - Nuclear Magnetic Resonance (spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego)

NOS - nitric oxide synthase (synteza tlenku azotu)

PRP - Platelet Rich Plasma (frakcja bogatopłytkowa)

SP – substancja P

TLC - Thin Layer Chromatography (chromatografia cienkowarstwowa)

TNF- α - Tumor Necrosis Factor (czynnik martwicy nowotworu)

WHO – World Health Organization (Światowa Organizacja Zdrowia)

5-HT - serotonina

Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Gerardowi Nowakowi
za umożliwienie realizacji badań,
przekazaną wiedzę, ogromną cierpliwość, zaangażowanie,
życzliwą pomoc i opiekę naukową
przy wykonywaniu pracy

Dziękuję:

Pani prof. dr hab. Ewie Florek

Kierownikowi Laboratorium Badań Środowiskowych

Katedry i Zakładu Toksykologii

Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za możliwość przeprowadzenia badań biologicznych, cenne wskazówki

i poświęcony czas

Panu prof. zw. dr hab. Jaromirowi Budzianowskiemu

z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin

Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za pomoc w identyfikacji niektórych związków, cenne wskazówki

i poświęcony czas

Pracę dedykuję:
Rodzicom, Córcie, Mężowi i Pani Marii

Dziękuję...

SPIS TREŚCI:

I. WSTĘP	11
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	13
1. Systematyka <i>Centaurea balsamita</i> subsp. <i>balsamita</i> Lam. / syn. <i>Stizolophus balsamitaefolius</i> Cass.	13
2. Opis botaniczny <i>Stizolophus balsamitaefolius</i> Cass.	14
3. Występowanie <i>Stizolophus balsamitaefolius</i> Cass.	15
4. Laktony seskwiterpenowe	16
4.1. Biogeneza	17
4.2. Występowanie	21
4.3. Aktywność biologiczna laktonów seskwiterpenowych	22
4.3.1. Działanie przeciwmigrenowe	23
4.3.2. Działanie cytotoksyczne i przeciwnowotworowe	26
4.3.3. Działanie przeciwzapalne	30
4.3.4. Działanie przeciw pasożytnicze	32
4.3.5. Działanie przeciwbakteryjne	33
4.3.6. Działanie przeciwgrzybiczne	35
4.3.7. Działanie cytoprotekcyjne wobec błony śluzowej żołądka	36
4.4. Znaczenie laktonów seskwiterpenowych w chemotaksonomii roślin	38
5. Migrena	39
5.1. Międzynarodowa Klasyfikacja Bólów Głowy	40
5.1.1. Podział migreny według klasyfikacji IHS	42
5.2. Etiopatogeneza i patofizjologia migreny	44
5.3. Farmakoterapia migreny	50
5.3.1. Leczenie zapobiegawcze migreny	50
5.3.2. Leczenie napadu migreny	54
5.3.3. Nowe leki przeciwmigrenowe	57
5.4. Fitoterapia migreny	58
5.4.1. <i>Chrysanthemum parthenium</i> – złocień maruna	58
5.4.2. <i>Petasites hybridus</i> – lepieźnik różowy	61
5.5. Niefarmakologiczne metody zapobiegające migrenie	63

5.5.1. Akupunktura	63
5.5.2. Składniki mineralne, witaminowe i dietetyczne	63
III. CEL PRACY	66
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	68
1. Materiał badawczy – surowiec roślinny	68
2. Analiza fitochemiczna	68
2.1. Przygotowanie ekstraktów z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i>	68
2.2. Izolacja związków czynnych z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i> metodą chromatografii kolumnowej (ang. Column Chromatography - CC)	69
2.2.1. Zasada metody	69
2.2.2. Aparatura i sprzęt	69
2.2.3. Odczynniki	70
2.2.4. Tok analizy	70
2.3. Metody identyfikacji i ilościowego oznaczenia związków czynnych z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i>	71
2.3.1. Identyfikacja wyizolowanych związków metodą chromatografii cienkowarstwowa (ang. Thin Layer Chromatography - TLC)	71
2.3.1.1. Zasada metody	72
2.3.1.2. Aparatura i sprzęt	72
2.3.1.3. Odczynniki	73
2.3.1.4. Tok analizy	73
2.3.2. Oznaczanie temperatury topnienia związków krystalicznych z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i>	74
2.3.3. Identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie wybranych związków metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. High- Performance Liquid Chromatography - HPLC)	74
2.3.3.1. Zasada metody	74
2.3.3.2. Aparatura i sprzęt	74

2.3.3.3. Odczynniki	74
2.3.3.4. Tok analizy	75
2.3.4. Identyfikacja wyizolowanych związków metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance - NMR)	76
2.3.4.1. Zasada metody	77
2.3.4.2. Aparatura i sprzęt	77
2.3.4.3. Odczynniki	78
2.3.4.4. Tok analizy	78
2.3.5. Spektrometria mas (ang. Mass Spectrometry - MS)	79
2.3.5.1. Zasada metody	79
3. Badanie biologiczne	80
3.1. Zasada metody	80
3.2. Aparatura i sprzęt	81
3.3. Odczynniki	81
3.4. Tok analizy	82
3.4.1. Otrzymywanie frakcji wysokopłytkowej (ang. Platelet Reach Plasma - PRP)	82
3.4.2. Przygotowanie roztworów związków badanych	83
3.4.3. Przygotowanie roztworu czynnika agregacyjnego	83
3.4.4. Szczegółowy przebieg doświadczenia	83
V. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE	85
A. Analiza fitochemiczna	85
1. Chromatografia kolumnowa ekstraktu chlorku metylenu z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i> – izolacja i identyfikacja związków: A (balsaminy), B 8 α -(4'-hydroksysenecioloxy)-9 α -hydroksypartenolidu i C (stizolicyny)	85
1.1. Izolacja i identyfikacja związku A – balsamina	86
1.2. Izolacja i identyfikacja związku B – 8α-(4'-hydroksysenecioloxy)-9α-hydroksypartenolid	88
1.3. Izolacja i identyfikacja związku C – stizolina	96
2. Rechromatografia frakcji 15-45 - izolacja i identyfikacja związków D (izospiciforminy), E (stizoliny) i F (9 α -hydroksypartenolidu)	97

2.1. Izolacja i identyfikacja związku D – izospiciformina	98
2.2. Izolacja i identyfikacja związku E – stizolina	100
2.3. Izolacja i identyfikacja związku F – 9α-hydroksypartenolid	102
3. Rechromatografia frakcji nr 59-62 izolacja związku G - 8 α -(4'- hydroksy)senecioyloksy-partenolidu	103
3.1. Identyfikacja związku G - 8α-(4'-hydroksy)senecioyloksy- partenolid	103
4. Chromatografia ekstraktu octanu etylu z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i> – izolacja związku H	104
4.1. Rechromatografia frakcji 2 wyciągu octanu etylu – izolacja związku H	104
4.1.1. Identyfikacja związku H - senecian (3,3- dimetyloakrylan) 3-O-β-glukozydu 3,4 dihydroksyfenylopropanolu	105
 B. Oznaczenie ilościowe dominujących germakranolidów w metanolowym ekstrakcie z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i> metodą HPLC	118
 C. Oznaczenie aktywności przeciwserotoninowej wybranych germakranolidów i ekstraktu metanolowego z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i>	120
 VI. DYSKUSJA	126
VII. WNIOSKI	136
VIII. STRESZCZENIE	137
IX. ABSTRACT	140
X. SPIS RYCIN	143
XI. SPIS TABEL	148
XII. PIŚMIENNICTWO	149

I. WSTĘP

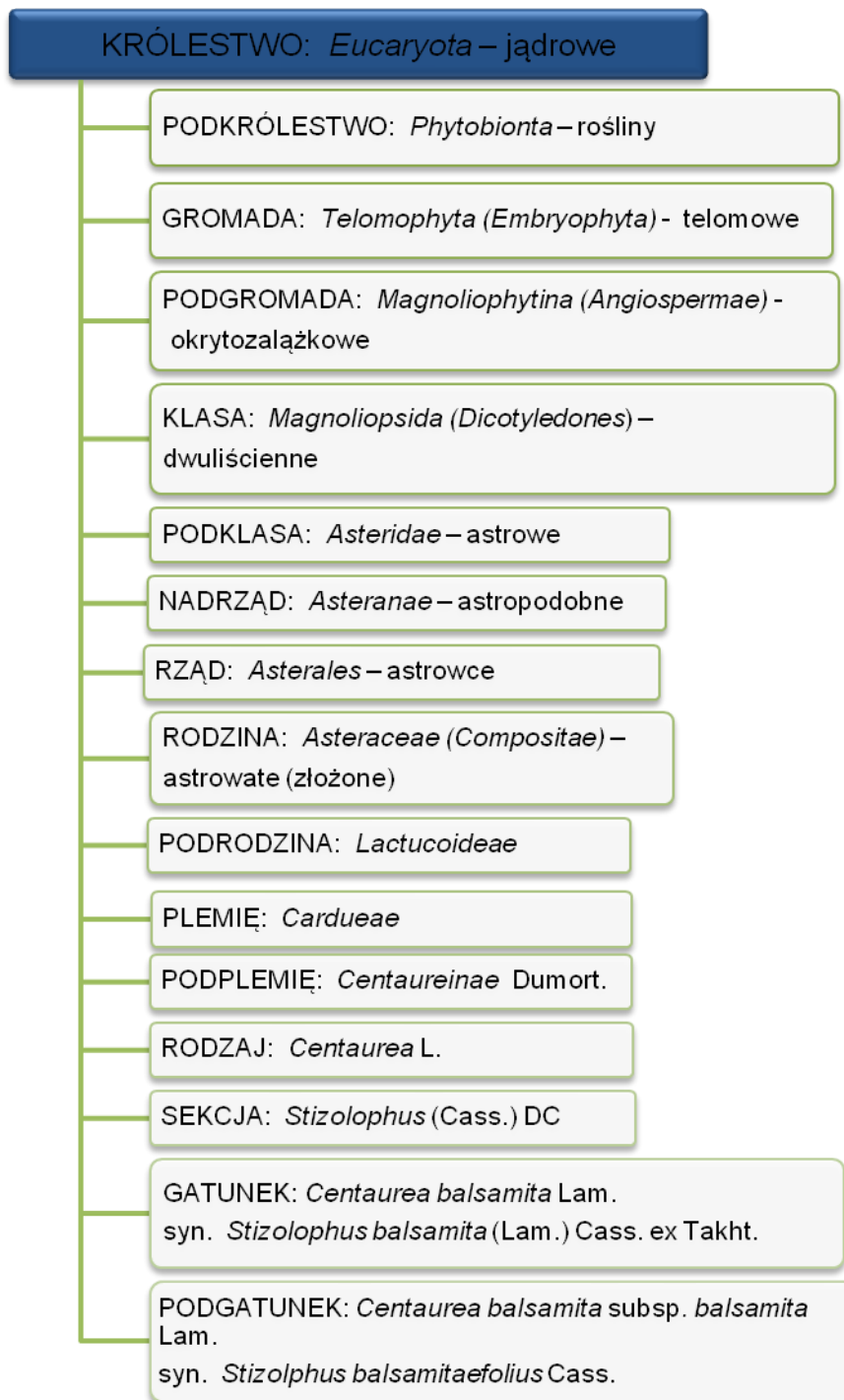
Zastosowanie ziół w leczeniu znane jest od dawna. Przez lata używane były leki, które w swym składzie zawierały surowce roślinne a także pochodzenia zwierzęcego i mineralnego. Często ich działanie połączone było z mistycyzmem, astrologią i okultyzmem [Dewick, 1998]. Na tych podwalinach powstała współczesna fitoterapia- gałąź medycyny konwencjonalnej, która bazuje na surowcach roślinnych, o określonym składzie i mechanizmie działania oraz dawkowaniu, których aktywność lecznicza została zweryfikowana i potwierdzona badaniami naukowymi. Fitoterapia zajmuje się terapeutycznym i profilaktycznym zastosowaniem surowców zielarskich lub aktywnych farmakologicznie substancji pochodzenia roślinnego w wielu jednostkach chorobowych, między innymi w migrenie (*hemicrania*) [Lamer-Zarawska i wsp., 2007].

Na obecną chwilę etiologia migreny pozostaje nadal nieznana, a jej patomechanizm nie jest do końca wyjaśniony. Przyczyną tego stanu rzeczy jest złożoność i wieloczynnikowość choroby. Według jednej z aktualnych definicji migrenę, określa się jako częste, przewlekłe i naruszające sprawność organizmu zaburzenia nerwowo-naczyniowe, odznaczające się napadami silnego bólu głowy [Stępień, 2009]. Wielobjawowość (fotofobia, nudności, wymioty, zwroty i ból głowy) oraz problem ze znalezieniem etiologii problemu powoduje, że farmakoterapia migreny jest bardzo skomplikowana. Często sprowadza się do podawania leków przerywających ostry ból oraz leków uśmierzających objawy towarzyszące (NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne), leki przeciwwymiotne, tryptany – wykazujące powinowactwo do receptorów serotoninowych 5-HT, alkaloidy sporyszu). Spośród surowców roślinnych stosowanych w fitoterapii migreny najbardziej popularnym jest wyciąg z ziela złocienia maruny (*Chrysanthemum parthenium*), którego głównym związkiem jest partenolid – lakton seskwiterpenowy z grupy germakranolidów. Szereg badań naukowych potwierdza aktywność farmakologiczną partenolidu. Wśród nich najczęściej opisywanymi są: działanie antyagregacyjne, przeciwzapalne, zdolność do hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi. Daje to podstawy, aby przypisać partenolidowi właściwości profilaktyczne i lecznicze w migrenie [Koprowska i Czyż, 2010]. Na rynku europejskim dostępne są preparaty MigraHerb[®] (Wielka Brytania), Arkocaps Partenelle[®] (Szwajcaria), Cefagran[®] (Niemcy),

Nemagran® (Niemcy), które zawierają w swym składzie ziele złocienia maruny i są lekami stosowanymi w migrenie [Dietlmeier, 2013]. Dużą niedogodnością dla producentów leków stosujących ten surowiec jest zmienny skład partenolidu, a także trudności w oznaczeniu stężenia związku czynnego, ze względu na jego rozkład podczas analizy metodą HPLC. To było przyczyną wycofania z runku popularnego preparatu – Mariomigran, produkowanego przez Zakłady Zielarskie Phytopharm Klęka. Przyczynia się to do dalszego poszukiwania nowych surowców roślinnych, zawierających związki o podobnej aktywności co partenolid, które stwarzałyby możliwości zaprojektowania leku ze standaryzowanym ekstraktem roślinnym. Takie warunki może spełniać wybrana do badań fitochemicznych i biologicznych *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. W częściach nadziemnych tej rośliny spodziewano się uzyskać związki o podobnej strukturze jak w innych gatunkach rodzaju *Stizolophus*, tj. pochodne partenolidu, które wykazywały właściwości przeciwserotoninowe, o mocy porównywaną z propranololem i werapamilem. Są to leki syntetyczne od lat używane jako środki skutecznie zmniejszające siłę bólu migrenowego i częstotliwość jego występowania [Arnason et al., 1995]. Przeprowadzone badania fitochemiczne i biologiczne dają nadzieję, iż wyciąg z ziela *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. może stanowić materiał do dalszych badań ukierunkowanych na tworzenia leku roślinnego, pomocnego w leczeniu migreny. Jednocześnie wyizolowane związki będą mogły stanowić markery chemotaksonomiczne dla jednostki botanicznej, którą reprezentuje badana roślina.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Systematyka *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. / syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass.



Ryc. 1 Systematyka *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. [Dittrich et al., 1980].

2. Opis botaniczny *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. / syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass.

Według Flory Irańskiej *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. jest jednoroczną rośliną o wyprostowanej łodydze, dorastającą do 120 cm. Posiada łodygę koloru słomkowego, gładką, bez włosków, która w połowie wysokości ulega rozgałęzieniu do kilku długich jedno-koszyczkowych gałązek w najwyższym punkcie. Gałązki boczne są koloru słomkowego, gładkie, bez włosków. Liście *Stizolophus balsamitaefolius* są w kształcie podłużnie-lancetowatym, całe ząbkowane, rzadko dolne z szorstkim zębem u podstawy. Ponadto w dotyku szorstkie z bardzo krótkimi włoskami, dolne podłużne, osadzone na krótkich ogonkach (do 3 cm), więdną podczas kwitnienia. Liście środkowe i górne stopniowo zmniejszają się ku górze, ulegają zwężeniu, zakończone są ząbkiem o długości do 3 mm. Okrywa kwiatowa jest kształtu kulisto-jajowatego z płaską podstawą, o długości od 18 do 25 mm i szerokości do 24 mm. Liczne przydatki w kolorze od żółtawego do jasnobrązowego okrywające większą część podstawy listków okrywy mają budowę lancetowatą. Zaopatrzone są w 7-12 regularnych rzęsek po każdej stronie, stopniowo ulegają zwężeniu, aby kończyć się ostrym kolcem w wymiarach od 3 do 4mm. Najbardziej wewnętrzne listki okrywy tworzą przewężenie koszyczka, z często występującym czerwonym punktem. Kwiaty brzeżne są barwy żółtej i zawierają prątniki. Owoc stanowią brunatno nabiegłe niełupki wielkości do 6mm, zaopatrzone w puch kielichowy o długości od 2 do 5mm, który pokryty jest krótkimi, szorstkimi szczecinkami. Jest to element odróżniający badaną roślinę od *Stizolophus balsamita* subsp. *kermanensis* (Bornm.) Wagenitz [Dittrich et al., 1980].



Ryc. 2 *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. / syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass.

3. Występowanie *Stizolophus balsamitaefolius* Cass.

Stizolophus balsamitaefolius przedstawiona na Rycinie 3, w środowisku naturalnym występuje w rejonie Morza Kaspijskiego, między innymi w Turcji, na Kaukazie i w Azji Centralnej. Rośnie w przydrożnych poboczach, na polach i nieużytkach. Spotykana jest nawet na kamienistych polach wapiennych oraz stepach. Preferuje stanowiska suche i słoneczne. Rośnie na glebach piaszczysto-gliniastych i suchych [Dittrich et al.,1980].



Ryc. 3 *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. / syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. - pokrój

4. Laktony seskwiterpenowe

Laktony seskwiterpenowe (utlenione pochodne seskwiterpenów) – to chemicznie zróżnicowana grupa metabolitów wtórnych, licząca ponad 4000 różnych struktur.

Najczęściej występują w roślinach wyższych. Są to bezbarwne, lipofilne substancje o charakterystycznym gorzkim smaku [Rodríguez, 1976]. Jest to grupa związków naturalnych, najczęściej występująca w gatunkach podplemienia *Centaureinae* (*Asteraceae*). Obok laktonów seskwiterpenowych znajdowane są tu też poliacetyleny, lignany i flawonoidy.

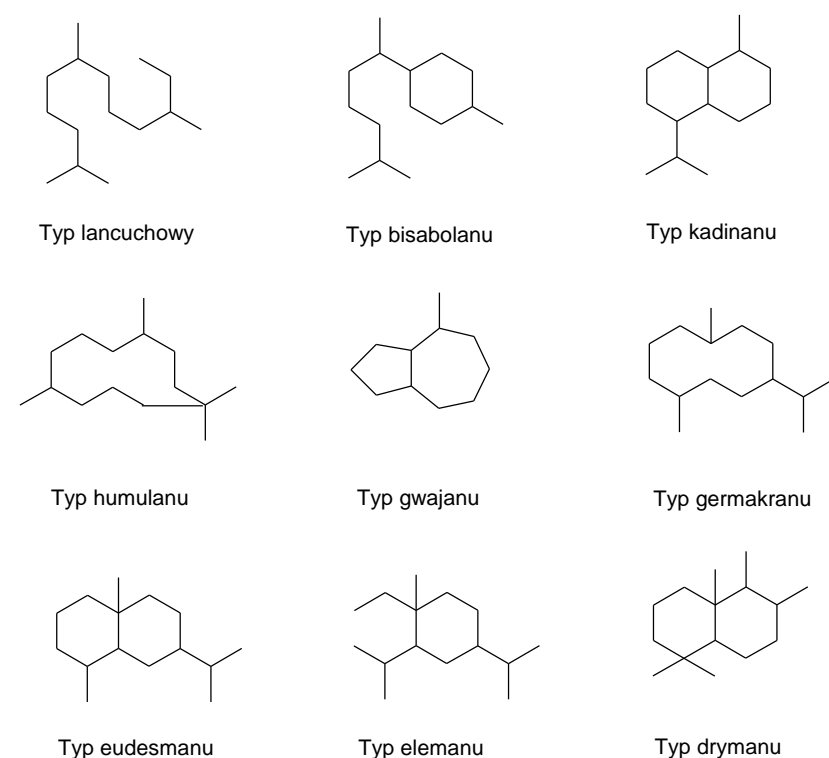
Seskwiterpeny to związki organiczne wywodzące się z terpenów (izoprenoidy).

W swej strukturze zawierają trzy reszty izoprenowe C_5H_8 . Są rozpowszechnione w świecie roślinnym jako węglowodory o wzorze ogólnym $C_{15}H_{24}$ lub jako tlenowe ich pochodne, tj. laktony, alkohole, aldehydy, ketony [Lamer-Zalewska i wsp., 2007].

Do tej grupy należą składniki olejków eterycznych, żywic oraz związki nietlotne.

Poznano już ponad 500 różnych seskwiterpenów, charakteryzujących się strukturą łańcuchową (np. farnesol) lub cykliczną (jedno, dwu, trój i czterocykliczne).

Znanych jest ponad 30 podstawowych układów strukturalnych w grupie seskwiterpenów. Rycina 4 przedstawia najważniejsze z nich.



Ryc. 4 Podstawowe struktury seskwiterpenów [Fischer et al., 1979; Kohlmünzer, 2003]

Przedstawicielami seskwiterpenów są m.in.: farnezol występujący w olejku eterycznym kwiatostanów lipy, α -bisabolol – składnik olejku eterycznego z koszyczków rumianku pospolitego, kadinen znaleziony w olejku eterycznym igieł sosny [Kohlmünzer, 2003].

Seskwiterpeny o nietypowej strukturze pierścienia to pochodne kariofilenu pozyskiwane z rodziny *Betulaceae*, czy pochodne cedronu znajdujące się w jałowcach.

Laktony seskwiterpenowe stanowią biologicznie aktywne związki, występujące w wielu rodzinach, m.in.: *Acanthaceae*, *Anacardiaceae*, *Apiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Rutaceae*, *Winteraceae* i *Hepatideae* i *Asteraceae* (największa liczba przedstawicieli) [Chaturvedi, 2011].

Wśród nich wyróżniamy:

- Eudesmanolidy (typ eudesmanu): np. alantolakton (*Inulae rad.*)
- Germakranolidy (typ germakranu): np. partenolid (*Chrysanthemi herb.*)
- Gwajanolidy (typ gwajanu): np. cykoriozyd B i C, sonchuzyd (*Cichorii rad.*, Cynaropikryna (*Cynarae fol., herb.*)
- Pseudogwajanolidy (typ pseudogwajanu): np. helenalina, dihydrohelenalina (*Arnicae anth.*) [Fischer et al., 1979] (Rycina 4).

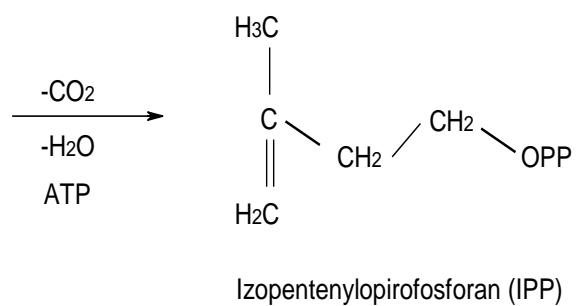
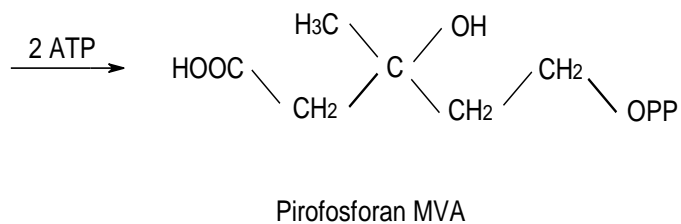
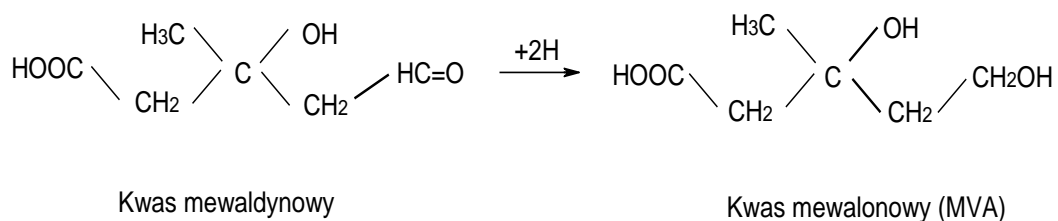
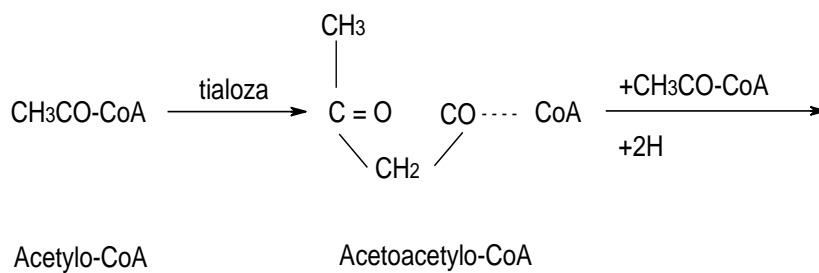
4.1. Biogeneza

Szlak biosyntezy laktonów seskwiterpenowych zaczyna się od pięciowęglowych jednostek prenylowych: izopentylopirofosforanu (IPP) oraz izomeru dimetyloallilopirofosforanu (DMAPP). IPP i DMAPP powstają na drodze dwóch niezależnych szlaków, w odrębnych obszarach wewnątrzkomórkowych. Rycina 5 przedstawia schemat tworzenia IPP, który powstaje w wyniku kondensacji trzech cząsteczek acetylo-CoA. W wyniku działania enzymów: acetylotransferazy acetylo-CoA i syntezy hydroksymetyloglutarylo-CoA powstają kolejno acetylo-CoA i β -hydroksy- β -metyloglutarylo-CoA. Następnie w wyniku redukcji grupy karboksylowej wiążącej koenzym A do grupy alkoholowej powstaje kwas mewalonowy (produktem

pośrednim jest kwas mewaldowy). Dalszym etapem biosyntezy jest stopniowe przyłączanie reszt fosforanowych i utworzenie mewlonylo-5-pirofosforanu, katalizowane przez kinazę mewalonianową i kinazę fosfomewalonianową. W wyniku udziału cząstek ATP tworzy się 3-fosfo-pirofosfomewalonian, który przekształca się w izopentylopirofosforan.

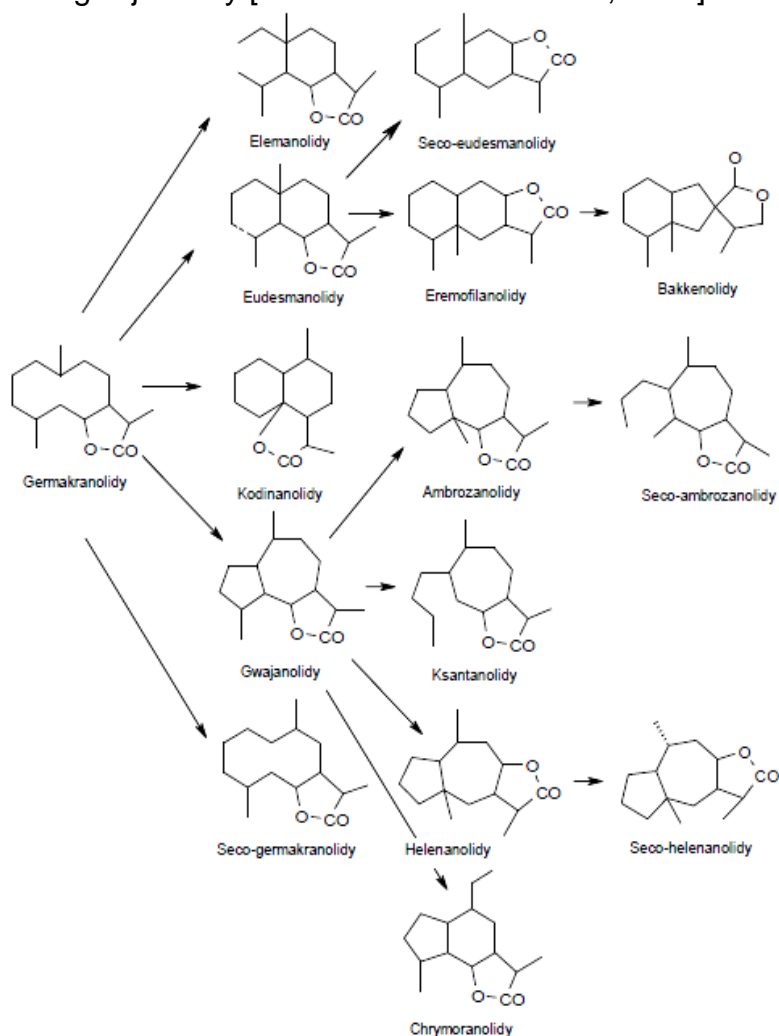
IPP ulega izomeryzacji do dimetyloallilpirofosforanu, który jest tzw. starterem w reakcji przyłączania IPP, której pierwszym produktem jest pirofosforan geranylu. Dalsza kondensacja jednostek „aktywnego izoprenu”, tj. dwóch cząsteczek izopentylofosforanu i jego izomeru: dimetyloallilpirofosforanu powoduje powstanie farnezylopirofosforanu – kluczowego związku w biogenezie laktonów seskwiterpenowych. Następnie utlenieniu do grupy karbonylowej ulega węgiel C-12, wprowadzone zostaje podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla C-11 i C-13, dochodzi do hydroksylacji węgla C-6 lub C-8 (numeracja węgli na stronie 27). Kończącym etapem jest laktonizacja w wyniku której utworzony zostaje γ -lakton [Kączkowski, 1993].

Prekursory laktonowe ulegają wielu modyfikacjom strukturalnym, tj. rozerwaniu pierścienia, cyklizacji, migracji wiązań podwójnych lub grup metylowych, a to prowadzi do powstania laktonów seskwiterpenowych o różnych typach szkieletów węglowych [Kisiel, 1990].



Ryc. 5 Biogeneza laktonów seskwiterpenowych [wg Kohlmünzer, 2003; wg Kączkowski, 1993]

Po raz pierwszy biogenetyczny schemat laktonów seskwiterpenowych podał Herz w 1977 roku (Rycina 6). Na podstawie budowy szkieletów węglowych pogrupował związki laktonowe w czterech kolumnach, reprezentujących kolejne etapy biogenezy. Szkielety, które powstają z hipotetycznego prekursora farnezylowego, przy tej samej liczbie modyfikacji strukturalnych, przynależą do tego samego etapu [Herz, 1977]. Seaman uszeregował poszczególne typy szkieletów węglowych w cztery kolumny, określające kolejne etapy biogenezy. Stwierdził, że w pierwszym etapie biosyntezy laktonów seskwiterpenowych powstają germakranolidy (znane są 4 izomery konfiguracyjne tych związków: 1a. germakranolid, 1b. melampolid, 1c. helenanolid, 1d. cis,cis-germakradienolid) [Seaman, 1982]. Następnie w wyniku jednej modyfikacji pierścienia węglowego powstają eudesmanolidy i gwajanolidy, stanowią produkty pośrednie większości pozostałych typów szkieletów węglowych laktonów. Trzeci etap reprezentują pseudogwajanolidy i sekoeudesmanolidy, a kolejny sekopseudogwajanolidy [Grech-Baran i Pietrosiuk, 2010].

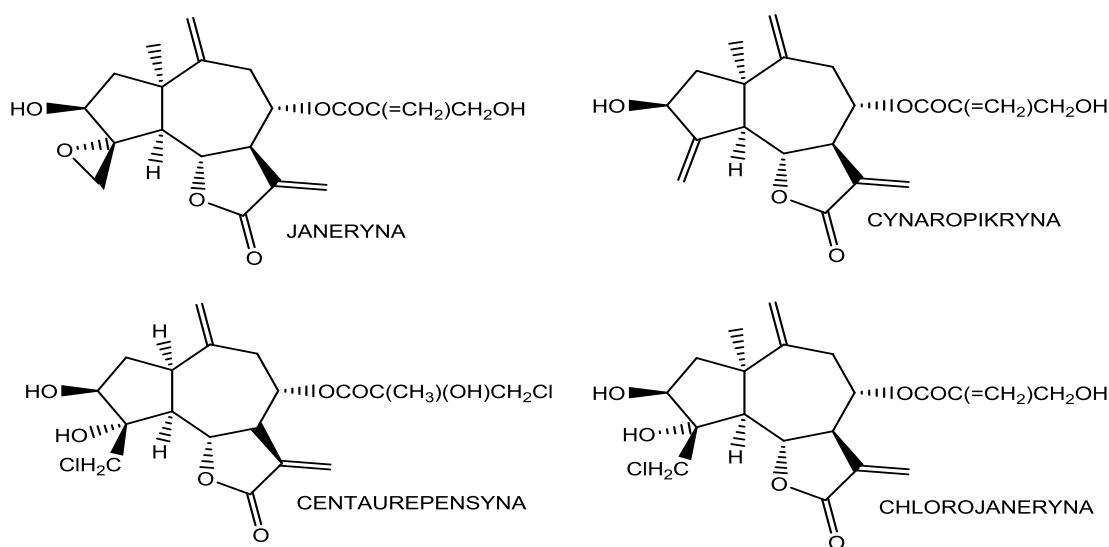


Ryc. 6 Schemat biogenezy laktonów seskwiterpenowych [wg Grech-Baran i Pietrosiuk, 2010]

4.2. Występowanie

Laktony seskwiterpenowe najpowszechniej występują w podplemieniu *Centaureinae* – szczególnie w rodzajach: *Centaurea* L., *Psephellus* Lam., *Chartolepis* Cass., *Rhaponticum* Cass., *Leuzea* DC.

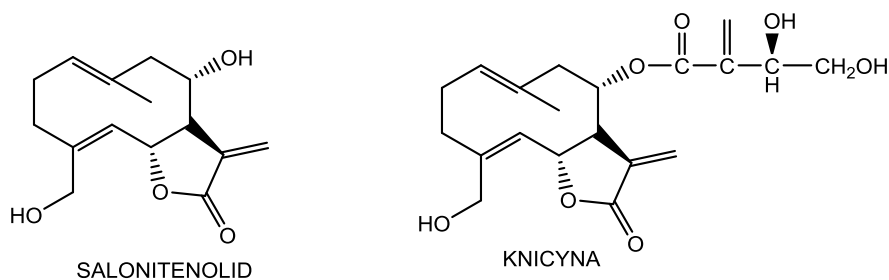
W rodzaju *Centaurea* L. najczęściej występującymi laktonami seskwiterpenowymi są gwajanolidy: janeryna, cynaropikryna, centaurepensyna i chlorojaneryna przedstawione na Rycinie 7.



Ryc. 7 Najczęściej występujące gwajanolidy w rodzaju *Centaurea*

Związki te wyizolowano między innymi w *C. adjarica*, *C. bella*, *C. thracica*, *C. marschalliana*, *C. phaeopapoides* [Geppert et al., 1983; Nowak et al., 1989].

Germakranolidy znajdujące się w tym rodzaju rzadziej. Interesujące jest to, że gatunki „germakranolidowe” wyróżniają się charakterystycznym kolcem kończącym listek okrywy kwiatostanu [Nowak et al., 1994]. Najczęściej znajdujące germakranolidy w *Centaurea* (Rycinina 8) to - salonitenolid (został wyizolowany z: *C. salonitana*, *C. crithmifolia*, *C. friderici*, *C. paniculata*, *C. calcitrapa*, *C. pontica*, *C. eriophora*, *C. alba*) i knicyna (została wyizolowana z: *C. vallesiaca*, *C. calcitrapa*, *C. aspera*, *C. sphaerocephala*, *C. sulphurea*) [Fischer et al., 1979].



Ryc. 8 Najczęściej występujące germakranolidy w rodzaju *Centaurea*

Gwajanolidy o podobnej strukturze jak w *Centaurea* występują również w rodzajach: ***Chartolepis*, *Leuzea*, *Psephellus*.**

W rodzajach ***Stizolophus* Cass.** (syn. *Centaurea* sect. *Stizolophus*) i ***Zoegea* L.** wyizolowano germakranolidy pochodne partenolidu (balsamina, stizolina, stizolicyna, izospiciformina, przedstawione na (Rycinie 45) [Nawrot et al., 2015; Nowak 1992; Nowak et al., 1989].

4.3. Aktywność biologiczna laktonów seskwiterpenowych

Już w latach 70-tych XX wieku zauważono, że laktony seskwiterpenowe oprócz różnorodność strukturalnej, wykazują wielokierunkową aktywność biologiczną. Liczne badania farmakologiczne i kliniczne potwierdziły możliwość ich stosowania w leczeniu [Nawrot et al., 2017]

Jak dotąd potwierdzono następujące działanie farmakologiczne laktonów seskwiterpenowych:

- przeciwmigrenowe
- przeciwnowotworowe, cytotoksyczne
- przeciwzapalne
- przeciwbakteryjne
- przeciwgrzybicze
- przeciw pasożytnicze
- antyarytmiczne
- przeciwwrzdodowe
- diuretyczne

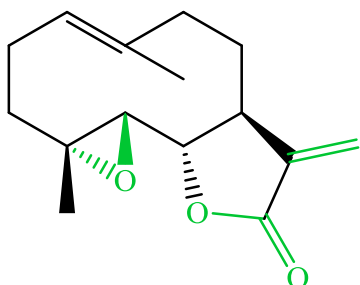
- hipoglikemiczne
- hipotensyjne
- przeciwastmatyczne
- uspokajające
- alergogenne

Aktywność biologiczna laktonów seskwiterpenowych wynika z obecności ugrupowania α -metyleno- γ -laktonowego, które odpowiada za łączenie się z grupami sulfhydryłowymi wewnątrzkomórkowego, zredukowanego glutationu lub L-cysteiny. Umożliwia to hamowanie aktywności enzymów komórkowych na drodze reakcji addycji nukleofilowej typu Michael'a [Grech-Baran i Pietrosiuk, 2010; Heptinstall et al., 1987].

4.3.1. Działanie przeciwmigrenowe

Najbardziej znanym surowcem roślinnym o udowodnionym działaniu przeciwmigrenowym jest ziele złoczenia maruna (*Chrysanthemi partheni herba*).

Głównym związkiem odpowiedzialnym za jego aktywność biologiczną jest partenolid, lakton seskwiterpenowy pochodny germakranu [Abad et al., 1995; ESCOP Monographs, 2003]. Partenolid przedstawiony na Rycinie 9 w swej strukturze zawiera trzy elementy odpowiedzialne za efekt farmakologiczny: 4,5 epoksyd, ugrupowanie laktonowe i sprzężony z nim egzometylen. Aktywność biologiczna polega na alkilowaniu ugrupowań nukleofilowych np. grupy sulfhydrylowej enzymów, w reakcji addycji nukleofilowej typu Michaela [Schneider, 1985].



Ryc. 9 Wzór partenolidu z elementami struktury odpowiedzialnymi za efekt farmakologiczny

Istnieje wiele teorii próbujących wyjaśnić patomechanizm migreny. Wielce prawdopodobne jest, że sygnał generowany w OUN przekazywany jest za przyczyną nerwów współczulnych do naczyń mózgowych, płytek krwi, gdzie uwalniana jest serotonina (5-HT). Pod wpływem tego związku następuje skurcz naczyń mózgowych, a to odpowiada za aurę migrenową. Następnie 5-HT metabolizowana do kwasu 5-hydroksyindolowego wydalona zostaje z moczem. Spadek stężenia serotoniny w surowicy krwi powoduje zmniejszenie napięcia ścian naczyń krwionośnych, ich rozszerzenie oraz zwiększenie przepuszczalności dla substancji obniżających próg wrażliwości nocycceptorów zlokalizowanych w przestrzeni okołonaczyniowej. Stwierdzono także istotny wzrost zdolności płytek krwi do samorzutnej agregacji i adhezji podczas ataku migrenowego. Serotonina działa za pośrednictwem swoistych receptorów występujących w OUN. Uważa się, że kluczową rolę w patofizjologii migreny odgrywają receptory 5-HT_{1B}, umiejscowione głównie w naczyniach mózgowych oraz 5-HT_{1D}, w zakończeniach nerwu trójdzielonego [Błoszyk, 1998; Janczak-Bazan, 2001].

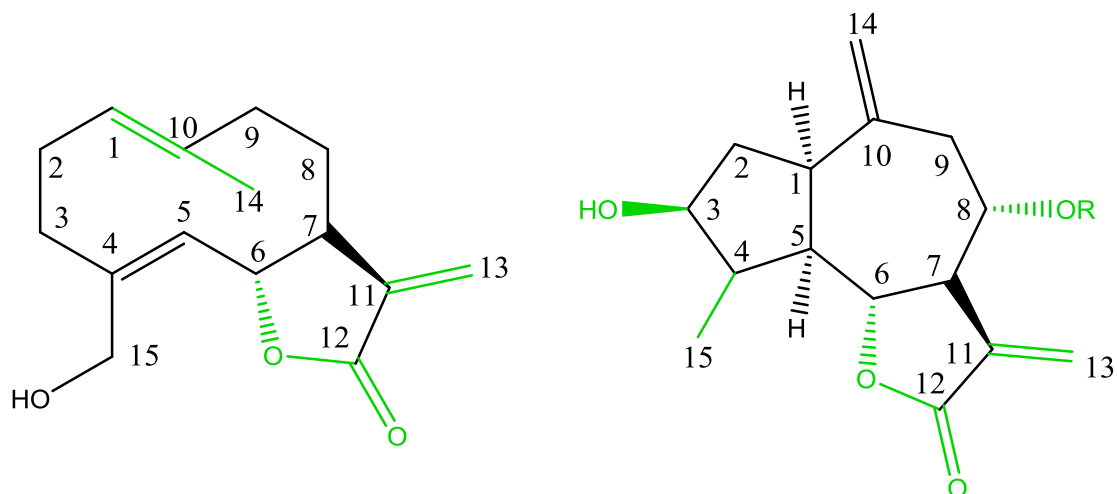
Dodatkowo zauważono, że podczas ataku migrenowego dochodzi do zwiększenia stężenie mediatorów prozapalnych w surowicy krwi. Efekt przeciwmigrenowy partenolidu jest skutkiem moderowania szeregu szlaków biochemicznych. Ustalono, iż hamuje wydzielanie serotoniny z płytek krwi [Kemper, 1999]. Mitra odnotował także iż zmniejsza on uwalnianie neuronalnej serotoniny, bez znaczącego wpływu na receptory 5-HT_{2A} i 5-HT_{2B} [Mitra et al., 2000].

W badaniach *in vitro* ekstrakty z ziela *Chrysanthemum parthenium* hamowały agregację ludzkich płytek krwi, indukowaną przez ADP, trombinę oraz kolagen.

Wykazano, że nie hamowały agregacji płytek ludzkich, indukowanej przez kwas arachidonowy. Nie wpływały też na syntezę tromboksanu (B₂). Stwierdzono natomiast zdolność wyciągu wodnego z ziela złocienia maruny i partenolidu do hamowania komórkowej fosfolipazy, która rozpoczyna kaskadę kwasu arachidonowego [Bailey and Makheja, 1982]. Groenewegen opisał zdolność ekstraktu jak i partenolidu do hamowania biosyntezy prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanu, będących mediatorami stanu zapalnego [Groenewegen and Heptinstall, 1990].

Podobne działanie wykazują inne laktony seskwiterpenowe: 3-β-hydroksypartenolid, seco-tanapartolid A, kanina, artekanina. W 1995 międzynarodowy zespół podjął

próbę zbadania i określenia zdolności poszczególnych laktonów seskwiterpenowych do hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi bydłących. Do grupy testowanych laktonów seskwiterpenowych włączono 18 germakranolidów (m.in. partenolid; 11 β ,13-dihydroksypartenolid; 1,10-epoxy-11 β , 13-dihydroksypartenolid; 1,10-dihydroksypartenolid; stizolina, ursinolid A; ursinolid B; salonitenolid; knicyna; alatolid; glaukolid A; szkuriolid; melampodyna A, cynerenina), 17 eudesmanoliów (m.in. rejnozyna; 11 β ,13-dihydroksyrejnozyna; santamaryna; 11 β ,13-dihydroksysantamaryna; santonina; alantolakton; asperylina; pulchelina C), 8 gwajanolidów (m.in. grossheimina; grandolid; repina; 15-dezoksyrepina; artekanina, kserantolid), 11 pseudogwajanolidów: 5 z grupy helenanolidów (helenalina; linifolina A; tenulina; aromatycyna; gejgerynina); 5 z grupy ambrosanolidów (m.in. burrodyna, partenina, koronopilina) oraz 1 z grupy sekoambrosanolidów (psilostachin A). Dla każdego związku określono IC₅₀ - stężenie związku w μ M niezbędne do zahamowania 50% uwalnianej serotoniny z płytek krwi bydłących. Najsilniej działały: ursinolid A (IC₅₀ – 1,78 μ M), cynerenina (IC₅₀ – 2,04 μ M), partenolid (IC₅₀ – 3,03 μ M), helenalina (IC₅₀ – 4,28 μ M), ursinolid B (IC₅₀ – 5,3 μ M), alatolid (IC₅₀ – 5,77 μ M), stizolicyna (IC₅₀ – 5,82 μ M). Najniższą aktywność wykazywały partanina (IC₅₀ – 129,3 μ M). Porównano także zdolność do hamowania uwalniania serotoniny przez partenolid i leki syntetyczne (werapamil i propranolol), które są stosowane w profilaktyce migreny. Zarówno werapamil (bloker kanału wapniowego) jak i propranolol (β -bloker) hamują agregację płytek krwi i uwalnianie serotoniny, ale znacząco słabiej niż partenolid. IC₅₀ werapamilu wynosi 577,5 μ M; IC₅₀ propranololu wynosi 939,8 μ M, a partenolidu 3,03 μ M [Arnason et al., 1995]. Dodatkowo ustalono wpływ struktury chemicznej na zdolność przeciwserotoninową poszczególnych laktonów seskwiterpenowych. Potwierdzono, że dla zachowania aktywności konieczna jest obecność ugrupowania α -metyleno- γ -laktonowego, a także charakter hydrofobowy w sąsiedztwie wiązania podwójnego między pierwszym a dziesiątym atomem węgla wśród germakranolidów i w pozycji C-14 oraz obecność grupy hydrofilowej przy C-8 α i grup hydroksylowych przy C-3 β i C-15 gwajanolidów (Rycina 10) [Błoszyk,1998].



Ryc.10 Zależność właściwości farmakologicznych od struktur i grup funkcyjnych germakranolidu i gwanolidu

4.3.2. Działanie cytotoksyczne i przeciwnowotworowe

Kancerogeneza jest procesem wieloetapowym, wyróżnia się w nim: inicjację, promocję i progresję. Jest to złożony, biochemiczny ciąg reakcji, w który zaangażowane są tzw. onkogeny oraz geny supresorowe [Shu et al., 2010].

Laktony seskwiterpenowe moderują proces kancerogenezy niemal na każdym jego etapie, wykazując aktywność przeciwnowotworową, cytotoksyczną oraz chemoprewencyjną.

Poszukiwanie nowych związków naturalnych o właściwościach przeciwnowotworowych zainicjowano w latach 60-tych XX wieku w Stanach Zjednoczonych z udziałem National Cancer Institute. Wyodrębniono ok. 35000 próbek roślinnych o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Dzięki tym badaniom wynaleziono Taxol, najlepiej sprzedający się obecnie lek przeciwnowotworowy na świecie. Faktem jest, że 67% leków przeciwnowotworowych to produkty naturalne lub ich pochodne [Ghantous et al., 2010].

Istnieje szereg badań potwierdzających aktywność przeciwnowotworową laktonów seskwiterpenowych. Elementem strukturalnym determinującym tą aktywność

biologiczną jest egzocykliczna grupa metylenowa sprzężona z pierścieniem gamma laktonowym. Podobnie jak w przypadku działania przeciwmigrenowego, egzometylen wykazuje zdolność do reakcji typu Michaela z wieloma nukleofilami, np. L-cysteiną w białkach i glutatione oraz innymi cząsteczkami posiadającymi grupę tiolową. Powstające addukty kowalencyjne, przyczyniają się do zmiany właściwości cząsteczek wiązanych przez laktony seskwiterpenowe. Istotne znaczenie w aktywności przeciwnowotworowej seskwiterpenów ma także obecność grupy epoksydowej. Dokładny mechanizm nie jest poznany, ale zauważono, że laktony seskwiterpenowe pozbawione tej grupy mają niższą aktywność biologiczną [Janecka i wsp., 2012; Koprowska i Czyż, 2010].

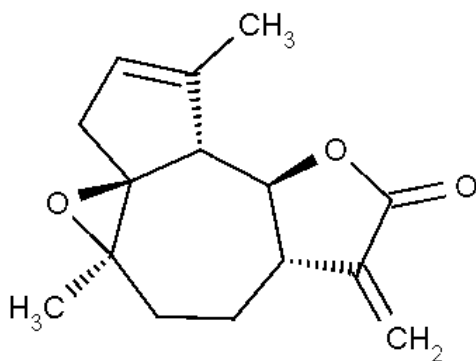
Istnieje szereg publikacji, które opisują działanie przeciwnowotworowe laktonów seskwiterpenowych. Ośrodki naukowe na całym świecie potwierdzają ww aspekt. Hładoń opisywał działanie cytotoksyczne laktonów w stosunku do komórek ludzkich linii KB i HeLa. W badaniach tych eupatopikryna wyizolowana z *Eupatorium cannabinum* i alatolid wyizolowany z *Jurinea alata* wykazywały silną inhibicję namnażania komórek nowotworowych. Dodatkowo eupatopikryna o 60% wydłużała czas przeżycia myszy z przeszczepialnym nowotworem linii SA 180, ETA i L1210 [Hładoń i Chodera, 1975; Hładoń i wsp., 1977].

Baer-Dubowska i wsp. badali eupatopikrynę i hydroksyizonobilinę, Stwierdzili, że obydwa związki hamowały syntezę kwasów nukleofilowych w limfocytach ludzkich, stymulowanych fitohemaglutyniną. Opisano także wpływ eupatopikryny i hydroksyizonobiliny na redukcję transformacji blastycznej limfocytów oraz zmniejszenie zdolności komórek do reprodukcji, co świadczy o ich działaniu przeciwnowotworowym [Baer-Dubowska i wsp., 1980].

Aktywność cytostatyczną dla elefantopiny i jej pochodnych wyizolowanych z *Elephantopus elatus* oraz dla erifertyny i eriofertopiny z *Eriophyllum confertifolium* potwierdzono w testach *in vitro* i *in vivo* [Cassady et al., 1981].

Kolejny lakton seskwiterpenowy– arglabina (Rycinie 11), izolowany z *Artemisia glabella* i *Artemisia myriantha* hamuje farnesylotransferazę - enzym uczestniczący w wiązaniu białek Ras z błoną cytoplazmatyczną. Geny Ras odgrywają istotną rolę w przewodzeniu sygnałów komórkowych, proliferacji i nowotworowej transformacji. Wiadome jest, że mutacje genów N-Ras i K-Ras występują w wielu nowotworach, np.

w białaczce szpikowej [Lone S.H. et al., 2015; Korycka A. i wsp., 2001]. Arglabina wykazywała także znaczącą aktywność cytotoksyczną w stosunku do linii makrofagów J774.1 w dawkach 0,125-1,25 µg/ml. Dodatkowo powodowała ona wydzielanie cytokin IL-1, IL-2 i TNF-α [Bottex-Gauthier et al., 1993].



Ryc. 11 Wzór strukturalny arglabiny

Oprócz arglabiny w rodzaju *Artemisia* istnieje szereg innych laktonów seskwiterpenowych o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym. Są wśród nich: ridentyna (germakranolid, izolowany z *Artemisia* sp.), kanina (izolowana z *Artemisia cana*), Arteglazyna-A (izolowana z *Artemisia douglasiana*), wulgaryna (izolowana z *Artemisia vulgaris*) oraz ludowicyna (izolowana z *Artemisia ludoviciana*) [Grech-Baran i Pietrosiuk, 2010]. Wyizolowany z *Xanthium sibiricum* lakton seskwiterpenowy - 1β-hydroxy-5α-chloro-8-epi-xantatyna wykazywał silne działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych SNU387, jego IC₅₀ wynosiło 5.1 µM [Wang et al., 2013].

W 1995 międzynarodowy zespół naukowy podjął próbę określenia cytotoksyczności poszczególnych laktonów seskwiterpenowych i porównania jej z partenolidem. Badanie prowadzono z udziałem ludzkich linii komórkowych KB-3. Równocześnie w tych samych warunkach przebadano 20 związków (m.in. ursinolid A, cynerenina, partenolid, helenalina, melampodyna A, ursinolid B, alatolid, stizolicyna, enhydrin). Wykazano, że spośród 20 związków, 13 wykazywało większą cytotoksyczność niż partenolid. Laktonami seskwiterpenowymi o najwyższej cytotoksyczności okazały się: alatolid i helenalina [Arnason et al., 1995].

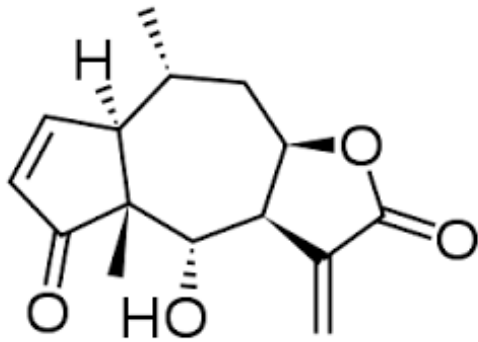
Partenolid (Rycina 9, str 24), w ostatnim dziesięcioleciu cieszy się popularnością w licznych badaniach naukowych. Ze względu na obecność ugrupowania α -metyleno- γ -laktanowego ma zdolność oddziaływania z wieloma białkami, różnych szlaków sygnałowych, czego wynikiem są wielorakie efekty *in vitro* i *in vivo*. W aspekcie efektu przeciwnowotworowego, najlepiej poznanym jego mechanizmem działania jest zdolność hamowania aktywności jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [Koprowska i Czyż, 2010]. NF- κ B moderuje wiele procesów fizjologicznych, w tym odpowiedź immunologiczną, procesy zapalne, angiogenezę, proliferację komórkową. W stanach patofizjologicznych np. w przypadku nowotworów, stwierdzono konstytutywną aktywność NF- κ B, szczególnie heterodimeru p50/p65 [Kim et al., 2006]. Pomędzy grupą egzometylenową partenolidu i cysteinami białek IKK (kinazy białkowe) oraz podjednostkami p65 białka NF- κ B tworzą się addukty odpowiedzialne za hamowanie aktywacji NF- κ B i hamowanie wiązania czynnika NF- κ B z DNA w regionach promotorowych wielu genów. Dodatkowo partenolid blokuje interakcję kompleksu kinaz białkowych: IKK α i IKK β z receptorem TNF- α (TNFR1). W wyniku hamowania drogi sygnałowej IKK/NF- κ B zmniejsza się ekspresja genów prozapalnych, antyapoptotycznych, genów związanych z migracją, inwazyjnością, proliferacją, angiogenezą, a więc genów szczególnie ważnych w rozwoju nowotworów i procesów zapalnych [Koprowska i Czyż, 2010]. Pierwsze badanie potwierdzające aktywność inhibicyjną partenolidu wobec NF- κ B przeprowadzono w 1997 na komórkach nowotworowych HeLa [Bork et al., 1997]. Potwierdzono to także na linii komórkowej raka gruczołu krokowego PC-3, w którym czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest konstytutywnie aktywny [Watson et al., 2009]. Kolejne badania na komórkach czerniaka linii A375 i 1205Lu wykazały zdolność partenolidu do hamowania NF- κ B oraz wykazały, że dodatkowo powodowało to: zmniejszenie ekspresji cykliny D1, białek antyapoptotycznych Bcl-X_L, surwiwiny oraz interleukiny 8 i metaloproteinazy 9. Skutkiem tego była apoptoza, obniżenie zdolności proliferacyjnej komórki, zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁ oraz zmniejszenie migracji i inwazyjności komórek nowotworowych [Koprowska i Czyż, 2010]. Oprócz ww aktywności partenolid obniża poziomu HDAC1 - deacetylaza histonowa. HDAC1 ma zdolność deacetylacji wielu czynników transkrypcyjnych m.in. p53, STAT3 [Minucci and Pelicci, 2006]. HDAC1 poprzez wpływ na aktywności białka p53 moderuje procesy za które ono odpowiada tj. kontrola cyklu komórkowego i apoptozy w warunkach spoczynkowych oraz stresu komórkowego [Vousden and

Prives, 2009]. Dodatkowo partenolid redukuje stężenie zredukowanego glutationu GSH, który jest głównym elementem regulującym równowagę oksydoredukcyjną w komórkach. Wiadomo, że w komórkach nowotworowych jest podwyższona ilość GSH, co powoduje nadmierną ich proliferację. Obniżenie jego poziomu przyczynia się do generowania reaktywnych form tlenu. Tak zaindukowany stres oksydacyjny prowadzi do apoptozy mitochondrialnej [Koprowska i Czyż, 2010].

Partenolid jest bardzo obiecującym związkiem w leczeniu nowotworów. Jego wielokierunkowe działanie powoduje, że może wykazywać cytotoksyczność lub cytostatyczność w zależności od dawki i rodzaju komórek nowotworowych. W ostatnim dziesięcioleciu powstało wiele publikacji, które potwierdzają skuteczność partenolidu w moderowaniu procesu kancerogenezy [Anderson et al., 2008; Czyż i wsp., 2010; Czyż i wsp., 2013; Duechler et al., 2008; Döchler and Stepnik 2008; Liu et al., 2009; Lesiak i wsp., 2010; Wyrębska i wsp., 2013].

4.3.3. Działanie przeciwzapalne

Spośród laktonów seskwiterpenowych wyróżnić można wiele, którym przypisuje się aktywność przeciwzapalną. Pseudogwajanolidy: helenalina i 11,13dihydrohelenalina, występujące w koszyczkach *Arnica montana* mają udowodnioną skuteczność licznymi badaniami naukowymi. Lyss i wsp. określili, że obydwie związki hamują aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, poprzez reakcję z podjednostką p65, tworzącą NF- κ B. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B to białko składające się z 3 podjednostek p50, p65 i inhibitora NF- κ B (I κ B). Istnieje wiele czynników (np. infekcje wirusowe i bakteryjne), które aktywują NF- κ B. Pierwszym etapem jest fosforylacja I κ B, przy udziale kinazy inhibitora I κ B (IKK), następnie ufosforylowany inhibitor dysocjuje z kompleksu I κ B/NF- κ B, a to powoduje uaktywnienie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, jego translokację do jądra komórkowego i aktywację ekspresji wielu genów. NF- κ B reguluje transkrypcję różnych prozapalnych cytokin, takich jak: interleukiny – 1, interleukiny – 2, interleukiny – 6, interleukiny – 8, TNF- α oraz geny kodujące cyklooksygenazę COX-2 [Lyss et al., 1998].



Ryc. 12 Wzór strukturalny helenaliny

Aktywność helenaliny (Rycina 12), uwarunkowana jest obecnością ugrupowania α -metyleno- γ -laktonowego oraz grupy hydroksylowej przy węglu C-6. Jej estryfikacja lub eliminacja znacząco obniżała aktywność przeciwzapalną helenaliny. Dodatkowo obecność pierścienia β -nienasyconego cyklopentenonu i α -epoksy-metyleno-cyklopentenonu także warunkuje działanie przeciwzapalne związku [Hall et al., 1979; Hall et al., 1980].

Partenolid także wykazuje działanie przeciwzapalne, udowodnione w wielu pracach naukowych, według mechanizmu opisanego na stronie 31. Związek ten zmniejsza fosforylację inhibitora I κ B poprzez hamowanie kinazy inhibitora I κ B (IKK), podjednostkę IKK – β [Kwok et al., 2001]. Ponadto w makrofagach stymulowanych lipopolisacharydami (LPS), partenolid hamował ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2), cytokin prozapalnych takich jak: czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) i interleukiny – 1 [Hwang et al., 1996]. Dodatkowo wykazano, że wyciąg z ziela złoczenia maruny, którego głównym składnikiem działającym jest partenolid, nie hamuje agregacji płytek ludzkich, indukowanej przez kwas arachidonowy. Nie wpływa też na syntezę tromboksanu (B₂). Stwierdzono natomiast zdolność wyciągu wodnego z tego surowca do hamowania komórkowej fosfolipazy, która rozpoczyna kaskadę kwasu arachidonowego. Związek ten generuje mediatory prozapalne, m.in. prostaglandyny [Makheja and Bailey, 1982]. Sur i wsp. potwierdzili, że wyciąg z ziela złoczenia maruna bezpośrednio hamuje aktywność prozapalnych enzymów, takich jak: 5- lipooksygenaza, fosfodiesteraza – 3 i fosfodiesteraza – 4. Ponadto hamował uwalnianie prozapalnych mediatorów: NO, PGE(2), TNF- α z makrofagów [Sur et al., 2009].

Obecne w olejku eterycznym z koszyczków rumianku pospolitego (*Matricaria recutita*) oraz z ziela krwawnika (*Achillea millefolium*) pochodne gwajanu – azuleny, także wykazują właściwości przeciwzapalne. Należą one do dicyklicznych związków seskwiterpenowych, a powstają z proazulenów pod wpływem ogrzewania w środowisku kwaśnym [ESCOP Monographs, 2003]. Dominujący wśród nich chamazulen dodatkowo hamuje niektóre enzymy z cytochromu P450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4), odpowiedzialnych za metabolizm większości leków [Ganzera et al., 2006].

Obecny w ekstraktach z koszyczków rumianku gwajanolid - matrycyna, wykazuje aktywność hamującą wobec jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Matrycyna nie posiada ugrupowania, które mogłoby w wyniku reakcji Michaela reagować z grupami tiolowymi biologicznie ważnych białek. Mechanizm ten jest nieznan, ale fakt hamowania NF-κB potwierdza dobrze znane działanie przeciwzapalne wyciągu z kwiatostanów rumianku w badaniach *in vivo* [Flemming et al., 2015].

4.3.4. Działanie przeciw pasożytnicze

Surowce zawierające laktony seskwiterpenowe już w tradycyjnej medycynie ludowej, były wykorzystywane w celu zwalczania pasożytów.

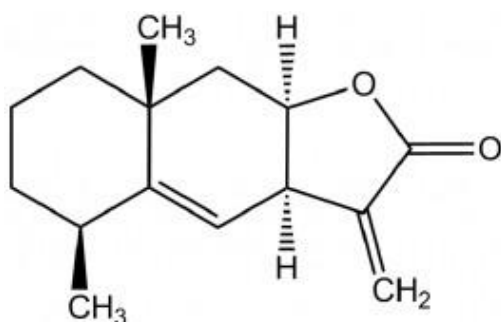
Surowcem od lat stosowanym przy zwalczaniu pasożytów skóry (wszy, świerzb) oraz przewodu pokarmowego (owsiki) jest ziele z bylicy piołun (*Artemisia absinthium*). Oprócz olejku eterycznego (tujon, tujol, bisabolen) głównymi związkami działającymi farmakologicznie są laktony seskwiterpenowe typu gwajanolidów (absyntyntyna, anabsyntyntyna, artabsyntyntyna, anabsyntyntyna) [Lamer-Zarawska i wsp., 2007].

Kolejnym surowcem roślinnym zawierającym aktywny lakton seskwiterpenowy jest ziele *Artemisia annua*. Wyekstrahowana z niego artemizyna wykazuje właściwości przeciwmalaryczne, przy niskiej toksyczności i nielicznych działaniach niepożądanych [Dewick, 1998].

Eremantyna, kostunolid i gojazenolid to następne aktywnie działające seskwiterpenoidy wchodzące w skład olejku eterycznego brazylijskich drzew *Eremanthus elaeagnus*, *Eremanthus goyazensis*, *Vanillosmopsis erythropappa* i

Mosquinea velutiva. Hamują one przezskórną penetrację pasożytniczych larw z rodzaju *Schistosoma*. Mechanizm działania przeciw pasożytniczemu wymienionych związków, prawdopodobnie wynika z ich wpływu na układ cholinergiczny pasożytów. Prawdopodobnie hamują grupy sulfhydrylowe enzymów, w wyniku czego dochodzi do inhibicji aktywności białek, mających ważne funkcje życiowe w organizmie pasożyta [Rodriguez et al., 1976].

Wyizolowane laktony seskwiterpenowe: ambrozyna, damazyna i hymenina z ziela *Ambrosia maritima* oraz ekstrakt z tego surowca również wykazują działanie toksyczne w stosunku do przywr z gatunku *Schistosoma* (*S. haematobium*, *S. mansoni*). W gatunku *Inula helenium* – alantolakton (Rycina 13) i izoalantolakton także wykazywały działanie toksyczne wobec motylicy wątrobowej *Fasciola hepatica*. Sugerowana aktywność wynika nie z obecności ugrupowania α -metyleno- γ -laktonowego, ale od samego podstawnika przy węglu C-13 [Pickman, 1986].



Ryc. 13 Wzór strukturalny alantolaktonu

4.3.5. Działanie przeciwbakteryjne

W ostatnim dwudziestoleciu odnotowano znaczący wzrost patogenów (bakterie, wirusy) opornych na standardowe schematy leczenia. Zmusza to do poszukiwań nowych związków chemicznych działających przeciwbakteryjnie i przeciwwirusowo.

Lee i wsp. podjęli próbę zbadania aktywności przeciwbakteryjnej 36 laktonów seskwiterpenowych wobec sześciu szczepów bakteryjnych. Dodatkowo ustalono wpływ poszczególnych elementów strukturalnych na siłę ich działania. Wyniki wykazały, że niektóre związki wykazują większą aktywność bakteriostatyczną w stosunku do bakterii Gram - dodatnich (np. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*).

Znaczące działanie przeciwbakteryjne pojawiało się niezależnie od obecności urupowania α -metyleno- γ -laktonowego w seskwiterpenie. Równocześnie zauważono, że dla aktywności przeciwdrobnoustrojowej konieczna jest obecność w strukturze związku β -niepodstawionego cyklopentenonu [Lee et al., 1977].

Prawdopodobny mechanizm działania przeciwbakteryjnego laktonów seskwiterpenowych polega na reakcji pomiędzy niepodstawionym cyklopentenonem i egzocyklicznym metylenem w pierścieniu laktonu z grupą tiolową umiejscowioną w określonym enzymie bakteryjnym, odpowiadającym za funkcje życiowe drobnoustroju [Pickman and Towers, 1983].

Wśród najbardziej popularnych i najlepiej przebadanych laktonów seskwiterpenowych o właściwościach przeciwbakteryjnych są:

- helenalina, wyizolowana z *Inula helenium*, wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne wobec *Staphylococcus aureus*, *Sarcinia spp.*, *Gaffkya tetragen*. Słabsze działanie wykazuje wobec *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* [Horoszkiewicz-Hassan, 2004]. Olej uzyskany z korzeni *Inula helenium* wykazywał działanie przeciwbakteryjne wobec wielu szczepów (*Enterococcus faecium*, *Bacillus cereusa*, *Acinetobacter baumannie*). Dodatkowo działał przeciwdrożdżakowo wobec: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* [Deriu et al., 2008].

- knicyna wyizolowana z *Centaurea paniculata*, wykazuje działanie wobec *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus* [Horoszkiewicz-Hassan, 2004]. Knicyna wyizolowana z ziele *Cnicus benedictus* oraz olejek eteryczny uzyskany z tego surowca wykazują efekt przeciwbakteryjny w badaniach *in vitro*, prowadzonych na szczepach: *Bacillus subtilis*, *Brucella species*, *Escherichia coli*, *Proteus species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus ureus* [Kemper, 1999].

- tanargyrolid wyizolowany z ziele *Tanacetum argyrophyllum* var. *argyrophyllum* wykazuje działanie wobec *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* i *Escheria coli* [Gören et al., 1990].

- wermeryna wyizolowana z ziele *Hymenoxys robusta*, wykazuje działanie wobec *Staphylococcus aureus* [Fortuna et al., 2011].

Pickman w 1983 dokonał porównania zdolności i siły działania laktonów seskwiterpenowych wobec sześciu szczepów bakterii. Najbardziej skutecznym związkiem przeciwbakteryjnym okazał się 9 α -hydroksypartenolid (aktywny wobec: *Staphylococcus albus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescences*), a najslabszym glaukolid A (słabo aktywny wobec *Staphylococcus albus* i *Bacillus subtilus*) [Pickman and Towers, 1983].

4.3.6. Działanie przeciwgrzybicze

Istnieje wiele publikacji potwierdzających zdolność przeciwgrzybiczą laktonów seskwiterpenowych. Pickman badała związki - heleninę i izoheleninę, wyizolowane z ziela *Inula helenium*, testowane wobec 16 gatunków grzybów. Stwierdzono, iż najwyższą aktywność wykazywały wobec: *Microsporium cookei*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Trichothecium roseum* [Pickman, 1983]. Kowalewski i wsp. odnotowali dodatkowo zdolności przeciwgrzybicze heleniny wobec drożdżaków (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*), gdzie wartości MIC (minimalne stężenie inhibicyjne, wyrażające stężenie związku w $\mu\text{g/ml}$ hamujące wzrost drobnoustrojów) wynosiło: od 50-500 $\mu\text{g/ml}$ [Kowalewski i wsp., 1976].

Knicyna i salonitenolid wyizolowane z gatunków rodzaju *Centaurea* wykazywały aktywność przeciwgrzybiczą wobec *Cunninghamella echinu* [Barrero et al., 2000].

W 1984 Pickman przebadła 45 laktonów seskwiterpenowych w aspekcie działania przeciwgrzybiczego, wobec *Microsporium cookei*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Fusarium* sp. Stwierdzono, że najbardziej aktywnymi związkami były: partanina, grossheimina, eupatopikryna oraz 9 α -hydroksypartenolid [Pickman, 1984]. W 1999 roku opublikowano wyniki badań Maoz'a i wsp., w których opisano nowy seskwiterpen – tayunin, wyizolowany z *Inula viscosa*. Związek wykazywał silne działanie przeciwgrzybicze wobec *Microsporium canis* (MIC - 10 $\mu\text{g/ml}$) oraz *Trichophyton rubrum* (MIC 50 $\mu\text{g/ml}$) [Maoz et al., 1999].

Analiza fitochemiczna *Vernonia amygdalina* wykazała obecność laktonów seskwiterpenowych: wernolidu i wernodalolu. Badania *in vitro* na 5 gatunkach

grzybów, sprawdzające ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wskazały, że obydwa związki hamują namnażanie grzybów. Wernolid działał wobec: *Penicillium notatum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* i *Mucor hiemalis*. Wernodalol hamował: *Aspergillus flavus*, *Penicillium notatum* i *Aspergillus niger* nieznacznie słabiej niż wernolid. Obydwa związki były nieaktywne wobec *Fusarium oxysporum*, wysoce opornego mikroba, również w stosunku do chemicznych czynników przeciwgrzybiczych [Erasto et al., 2006].

Dodatkowo stwierdzono, że im mniejsza polarność badanego laktonu seskwiterpenowego, tym większa jest jego aktywność przeciwgrzybicza. Wraz z lipofilnością związku rośnie jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa [Barrero et al., 2000].

4.3.7. Działanie cytoprotekcyjne wobec błony śluzowej żołądka

W argentyńskiej medycynie ludowej stosowany był napar z liści *Artemisia douglasiana*, celem leczenia wrzodów żołądka oraz zewnętrznych ran i owrzodzeń skórnych. Giordano i wsp. zbadali surowiec roślinny i wykazali obecność laktonów seskwiterpenowych, głównie dihydroleukodyny. Gwajanolid ten, wykazywał zależne od dawki działanie cytoprotekcyjne wobec błony śluzowej żołądka. Aktywność farmakologiczna dihydroleukodyny wynika najprawdopodobniej z wpływu na uwalniania prostaglandyny PGE-2. Prostaglandyny te odpowiadają za ochronę błony śluzowej żołądka, poprzez regulację wydzielania śluzu oraz soku żołądkowego przez komórki okładzinowe. Badacze stwierdzili że dla cytoprotekcyjnej aktywności dihydroleukodyny niezbędna jest obecność ugrupowania α -metyleno- γ -laktonowego. Przypuszcza się, że ugrupowanie cyklopentenonu nie jest zaangażowane w tą aktywność [Giordano et al., 1990].

Etanolowy ekstrakt z kwiatów *Centaurea solstitialis* subsp. *solstitialis*, zawierający chlorojanerynę i 13-acetylosolstitialinę także wykazywały działanie przeciwrzodowe na szczurzym modelu ulcerogenezy [Yesilada et al., 2004].

4.4. Znaczenie laktonów seskwiterpenowych w chemotaksonomii roślin

Chemotaksonomia zwana też chemosystematyką to dziedzina wiedzy wykorzystująca związki chemiczne (metabolity pierwotne i wtórne, nośniki informacji genetycznej: kwasy nukleinowe, białka) celem klasyfikacji organizmów żywych. Taksonomia na podstawie cech morfologicznych i cytologicznych, charakterystycznych dla danej grupy pomaga wstępnie ustalić powiązanie filogenetyczne. Klasyfikacja roślin na poziomie podrodzin, plemion oraz niższych jednostek taksonomicznych wymaga dokładniejszej znajomości poszczególnych gatunków pod względem biochemicznym [Kisiel, 1990].

Aktualna wiedza fitochemiczna, rozwój technik analitycznych (HPLC, TLC, MS) pomaga rozwiązać szereg problemów botanicznych, ale także wskazuje znaczący wpływ środowiska na ekspresję genów kodujących powstawanie metabolitów pierwotnych. Pierwszym naukowcem, który użył terminu chemotaksonomia był holenderski uczonec Hegnauer w 1954. Duże znaczenie dla rozwoju tej dziedziny mieli jednak naukowcy z Teksasńskiego Uniwersytetu w Austin, R. E. Alston oraz B.L. Turner. W 1963 opublikowali książkę „Biochemical Systematics”, zawierającą szereg analiz fitochemicznych. Opisali m.in. korelację między cechami morfologicznymi w gatunku *Baptisia (Leguminosae)* a występującymi flawonoidami o różnej formie hybrydyzacji [Stuessy, 2009].

Już w latach 60-tych XX wieku Herout zauważył możliwość wykorzystywania laktonów seskwiterpenowych w chemotaksonomii gatunków z rodziny *Asteraceae* [Harborne and Swain, 1969]. Z powodu względnej jednorodności kwiatów oraz dużej zmienności organów wegetatywnych w tej rodzinie, częstym problemem jest wyznaczenie rodzajów, sekcji, gatunków i podgatunków. Laktony seskwiterpenowe stanowią najważniejszą grupę metabolitów wtórnych występujących wśród roślin z podplemienia *Centaureinae (Asteraceae)*. Ze względu na swoją rolę – markerów chemotaksonomicznych pomagają w określeniu przynależności rośliny do odpowiedniej taksonomii [Nowak, 1992]. Problem z przynależnością taksonomiczną jest także z tytułową rośliną. *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. o nazwie synonimowej *Stizolophus balsamitaefolius* Cass opisana została we Florze Irańskiej obok drugiego podgatunku – *C. balsamita* subsp. *kermanensis* (Bornm.) Wagenitz. Dużym problemem jest ustalenie klasyfikacji badanego w tej pracy podgatunku i

jemu pokrewnym. Raz umieszczony został w sekcji *Stizolophus* (Cass.) DC. rodzaju *Centaurea* [Dittrich et al., 1980; Davis et al., 1975] lub w rodzaju *Stizolophus* Cass. [Bobrow i Cwielew, 1964].

Znaczenie laktonów seskwiterpenowych w ustaleniu klasyfikacji botanicznej roślin z rodziny *Asteraceae* potwierdził Herz. Stwierdził on, że w oparciu o rodzaj szkieletów seskwiterpenoidów wyizolowanych z poszczególnych roślin, obecność i stereochemię podstawników, ich pokrewieństwo biogenetyczne połączone i skorelowane z cechami morfologicznymi rośliny daje możliwość stworzenia prawidłowej klasyfikacji [Herz, 1977].

Zatem w badaniach chemotaksonomicznych wysoce istotna jest zanjomość biogenezy danej grupy związków, która obejmuje etapy: prekursor – produkty pośrednie – produkty końcowe. Zauważono, że duża liczba etapów biogenezy wpływa znacząco na rozbieżność strukturalną produktu końcowego w porównaniu z prekursorem [Kisiel, 1990].

5. Migrena

Migrena (łac. *hemicrania*) jest chorobą przewlekłą o charakterze napadowym. Atak polega na przemijającym występowaniu ogniskowych objawów neurologicznych, bólu głowy lub obu tych zjawisk. Ból jest najczęściej jednostronny, pulsujący, tak intensywny że zaburza codzienne funkcjonowanie. W wielu przypadkach ból poprzedza aura wzrokowa w postaci migocącego mroczka. Objawami towarzyszącymi są: brak apetytu, nudności, nadwrażliwość na światło (fotofobia), nadwrażliwość na dźwięk (fonofobia), nadwrażliwość na zapachy (osmofobia), wymioty, biegunka.

Migrena towarzyszy człowiekowi od starożytności. Opis napadowych bólów głowy, z jednostronnym ich umiejscowieniem połączonych z nudnościami i wymiotami podał już Areteusz z Kapadocji na przełomie I/II w. n . e. Na przestrzeni wieków pojawiały się dalsze charakterystyki i obrazy migreny spisane przez naukowców: Charles Le Pois (Lepois) (1563-1633), Thomas Willis (1621-1675) Johann Jakob Wepfer (1620-1695), Samuel Andre Tissot (1728-1797). W wieku XIX sformułowane zostały pierwsze jej teorie patogenetyczne: naczyniowa Eulenburga, autonomiczna Dubois-Raymonda, padaczkowa (Jackson i Gowers), ośrodkowa (Kraft-Ebing, Möbius), oponowa (Wernicke), trójdzielno-naczyniowa (Galezowski). W kartę historii migreny wyraźnie wpisał się także polski lekarz Edward Flatau, który wydał w 1912 monografię , gdzie przytoczył 470 pozycji aktualnego piśmiennictwa i opisał obserwację kilkuset własnych przypadków [Prusiński, 1999]. Pomimo upływu lat migrena jest problemem nadal aktualnym. Według Międzynarodowej Organizacji Zdrowia (WHO) od 50% do 75% dorosłych na całym świecie, w wieku od 18 do 65 lat miało przynajmniej jeden incydent z bólem głowy w ciągu ostatniego roku, a u przynajmniej 10% zdiagnozowano migrenę. Jest to przypadłość globalna, dotycząca ludzi w każdym wieku i każdej rasy [WHO, 2016]. Badania prowadzone na szerokiej grupie odbiorców wskazują, że migrena jest przyczyną znacznego obniżenia jakości życia, powoduje częstą nieobecność w pracy, generując tym samym koszty. Wśród amerykańskich pracodawców jest to ok 8 bilionów dolarów rocznie [Hu et al., 1999; Lipton and Bigal,2005].

Wieloobjawowość oraz problem ze znalezieniem etiologii problemu powoduje, że farmakoterapia migreny jest bardzo skomplikowana. Często sprowadza się do podawania leków przerywających ostry ból oraz leków uśmierzających objawy towarzyszące (NLPZ, leki przeciwwymiotne, tryptany – wykazujące powinowactwo do receptorów serotoninowych 5-HT, alkaloidy sporyszu).

Nieustannie prowadzone są badania mające na celu szukanie nowych skuteczniejszych leków. Część związków rokuje rychłe wprowadzenie do leczenia. Wśród nich jest ciwamid hamujący uwalnianie CGRP (peptyd zależny od genu kalcytoniny) oraz związki hamujące syntezę tlenu azotu.

5.1. Międzynarodowa Klasyfikacja Bólów Głowy

Międzynarodowe Towarzystwo Bólu Głowy, (ang. The International Headache Society – IHS) powstało w 1981 w Wielkiej Brytanii celem badania, diagnostyki i leczenia bólów głowy. W 2004 roku pod patronatem IHS opublikowano i przetłumaczono na 20 języków Drugie wydanie Międzynarodowej Klasyfikacji Bólów Głowy (ang. The International Classification of Headache Disorders – ICHD) , która rozróżnia trzy podstawowe rodzaje bólów głowy:

1. Pierwotne bóle głowy:

- migrena
- ból głowy typu napięciowego
- klasterowy ból głowy i inne trójdzielno-autonomiczne bóle głowy

2. Wtórne bóle głowy przypisane:

- urazowi głowy i/lub szyi
- chorobie naczyń głowy lub szyi, zaburzeniom wewnątrzczaszkowym innym niż naczyniowe
- działaniu substancji chemicznych lub reakcjom po ich odstawieniu
- zakażeniu
- zaburzeniom homeostazy

- zmianom chorobowym w obrębie czaszki, szyi, oczu, uszu, nosa, zębów, jamy ustnej lub innych struktur twarzy lub czaszki
- zaburzeniom psychicznym.

3. Neuralgia nerwów czaszkowych, ośrodkowe i pierwotne bóle twarzy oraz inne bóle głowy.

Ból jest odczuciem subiektywnym. Celem określenia jego rodzaju należy ustalić informacje na temat:

- pierwszego pojawienia się bólu głowy
- okresu utrzymywania się bólu głowy
- umiejscowienia i promieniowania
- charakteru bólu lub jego zmiany
- objawów towarzyszących (nadwrażliwość na dźwięk, nadwrażliwość na światło, nudności, wymioty, gorączka, sztywność karku, zawroty głowy, ataksje)
- predyspozycje genetyczne [Goebel, 2001; Dietlmeier, 2013].

Wiele trudności przysparza określenie intensywności bólu, dlatego stworzono skale ułatwiające ten proces:

1. Czterostopniowa skala natężenia bólu IHS

- 0 – brak bólu
 - 1 – ból łagodny (nieznaczny)
 - 2 – ból umiarkowany (średniego stopnia)
 - 3 – ból poważny (silny, trudny do wytrzymania)
- [Stępień, 2010].

2. Skala słowna (ang. verbal rating scale – VRS)

- brak bólu
- niewielki ból
- umiarkowany ból
- silny ból
- bardzo silny ból

3. Skala wzrokowo-analogowa (ang. visual analogue score – VAS. Wg Bayer Vital)

Pacjent za pomocą 10 centymetrowego suwaka poprzez jego otwarcie z aznacza intensywność bólu. Na stronie odwrotnej odczytuje się

wartość liczbowa, gdzie 0 cm to brak bólu a 10 cm to najsilniejszy do wyobrażenia ból.

4. Skala numeryczna (ang. numerical rating scale – NRS. Wg Bayer Vital)

Pacjent określa liczby od 0 do 10, gdzie 0 oznacza brak bólu, a 10 oznacza najsilniejszy do wyobrażenia ból [Dietlmeier, 2013].

5.1.1. Podział migreny według klasyfikacji IHS

Podział migreny według klasyfikacji ICHD (ang. - International Classification of Headache Disorders - Międzynarodowa Klasyfikacja Bólów Głowy) z 2004 roku z przypisanymi kodami dla poszczególnych jej postaci jest następujący [The International Classification of Headache Disorders, 2004]:

- 1.1. Migrena bez aury
- 1.2. Migrena z aurą
 - 1.2.1. Typowa aura z migrenowym bólem głowy
 - 1.2.2. Typowa aura z bólem głowy innym niż migrena
 - 1.2.3. Typowa aura bez bólu głowy
 - 1.2.4. Rodzinna połowiczoporaźna migrena
 - 1.2.5. Sporadyczna połowiczoporaźna migrena
 - 1.2.6. Migrena typu podstawnego
- 1.3. Dziecięce zespoły okresowe
 - 1.3.1. Cykliczne wymioty
 - 1.3.2. Migrena brzuszna
 - 1.3.3. Łagodne napadowe zawroty głowy u dzieci
- 1.4. Migrena siatkówkowa
- 1.5. Migrena powikłana
 - 1.5.1. Migrena przewlekła
 - 1.5.2. Stan migrenowy
 - 1.5.3. Przetrwającą aurą bez zawału
 - 1.5.4. Migrenowy zawał mózgowy
 - 1.5.5. Drgawki wywołane migreną
- 1.6. Migrena prawdopodobna
 - 1.6.1. Prawdopodobna migrena bez aury

1.6.2. Prawdopodobna migrena z aurą

1.6.3. Prawdopodobna przewlekła migrena [Stępień, 2009].

Najczęściej rozpoznawane są dwa rodzaje napadów migreny: bez aury (częstsza 85% chorych) i z aurą (migrena klasyczna, 15% chorych). IHS opracowało i zaproponowało szereg kryteriów, które pomagają rozróżnić rodzaj migreny. Poniżej przedstawiono je w Tabeli 1 i Tabeli 2.

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne migreny bez aury proponowane przez IHS

- | |
|---|
| <p>A. Przynajmniej 5 ataków bólu głowy spełniających kryteria B-D</p> <p>B. Ból głowy trwający 4-72 godziny (nieleczony lub leczony nieskutecznie)</p> <p>C. Ból głowy charakteryzuje się przynajmniej 2 spośród poniższych cech:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Jednostronna lokalizacja2. Ból pulsujący3. Natężenie umiarkowane lub silne4. Ból nasila się przy chodzeniu po schodach lub podobnej zwykłej aktywności fizycznej <p>D. Podczas bólu obecny jest przynajmniej jeden z poniższych objawów:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nudności lub wymioty2. Fotofobia lub fonofobia |
|---|

Tabela 2. Kryteria diagnostyczne migreny z aurą proponowane przez IHS

- | |
|---|
| <p>A. Przynajmniej 2 ataki bólu spełniające kryteria z punktu B</p> <p>B. W czasie napadu występują przynajmniej 3 spośród poniższych 4 cech:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Co najmniej 1 w pełni wycofujący się objaw aury, odpowiadający ogniskowemu zaburzeniu funkcji kory mózgowej lub pnia mózgu2. Przynajmniej 1 objaw aury rozwijający się stopniowo przez ponad 4 minuty lub co najmniej 2 objawy występujące po sobie3. Żaden z objawów aury nie utrzymuje się dłużej niż 60 minut, lecz jeśli obecne są 2 albo więcej objawów aury, to czas ich trwania może być odpowiednio dłuższy4. Okres niewystępowania żadnych objawów między aurą a początkiem bólu głowy jest krótszy niż 60 minut. Ból może się także pojawiać przed aurą lub występować jednocześnie z nią |
|---|

[Spierings, 2006].

5.2. Etiopatogeneza i patofizjologia bólu migrenowego

Ból (łac. dolor) jest kompleksowym wrażeniem zmysłowym. Stanowi sygnał ostrzegawczy dla organizmu. Strukturami anatomicznymi głowy wrażliwymi na ból są opony mózgowe i naczynia mózgowe, unerwiane przez włókna czuciowe nerwu trójdzielnego (n. trigeminus). Bodźce czuciowe i bólowe z głowy przekazywane są za pośrednictwem nerwu trójdzielnego do pnia mózgu i przekazywane do kory mózgowej [Stępień, 2004].

Etiopatologia bólu migrenowego pozostaje nadal nie wyjaśniona.

Istnieje wiele teori opisujących potencjalne mechanizmy wyzwalające migrenę, wśród nich są:

1. Teoria naczyniowa

Twórcą teorii naczyniowej jest Harold Wolff. Powstała w latach 1940-1950 i z pewnymi modyfikacjami przetrwała do dziś. Zakłada, że przyczyną napadu migrenowego są zaburzenie naczyniowo-ruchowe w obrębie głowy (szczególnie naczynia zewnątrzmożgowe i opony twardej), które przebiegają w trzech fazach. W fazie pierwszej następuje skurcz naczyń, powodując objawy aury. W fazie drugiej dochodzi do znacznego rozkurczu naczyń; fala tętna powoduje rozciąganie wiotkiej ściany naczyń, a to wywołuje pulsujący ból. W trzeciej fazie następuje uwalnianie substancji bólotwórczych i obrzęk okołonaczyniowy, co przyczynia się do utrwalenia bólu [Prusiński, 1999].

Tętnicą, która prawdopodobnie odgrywa najważniejszą rolę w mechanizmie migrenowego poszerzenia naczyń jest czołowa gałąź powierzchniowej tętnicy skroniowej [Spierings, 2006].

Przypuszcza się także że ból w migrenie może powstawać w wyniku niedokrwienia pajęczynówki indukowanego obniżoną aktywnością korową [Stępień, 2004].

Najnowsze badania przepływu mózgowego prowadzone przy użyciu emisyjnej tomografii pojedynczego fotonu (ang. single photon emission computerized tomography – SPECT) potwierdzają obniżenie przepływu krwi w czasie aury, głównie w okolicy potylicznej, jednostronnie, z następowym wzrostem przepływu utrzymującym się do kilku godzin po ustąpieniu bólu głowy [Stępień, 2004].

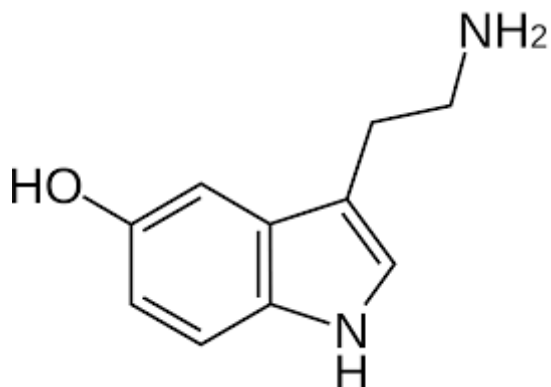
2 . Teoria biochemiczna

Twórcą teorii „serotoninowej” jest Sicuteri, który opisał zjawisko zwiększonego wydalania z moczem metabolitów serotoniny (5-hydroksytryptamina, 5-HT), tj. kwasu 5-hydroksyindolowego podczas napadu bólowego. W początkowej fazie serotonina zostaje uwolniona z płytek krwi, co powoduje skurcz naczyń. Następnie na skutek zachodzących przemian biochemicznych stężenie serotoniny w surowicy krwi spada, dochodzi do nadmiernej wiotkości naczyń, ich rozszerzenia oraz wzrostu przepuszczalności dla substancji obniżających próg wrażliwości nocycceptorów zlokalizowanych w przestrzeni okołonaczyniowej [Prusiński, 1999].

Sicuteri odkrył i opisał również działanie metysergidu, silnego antagonisty serotoniny, który skutecznie zapobiegał napadom migrenowym. Kimball, Friedman i Vallejo w 1960 roku zauważyli że napad migrenowy lub migrenopodobny wywołać można przez podanie serpasilu lub rezerpiny (czynniki uwalniające serotoninę z płytek krwi), a następnie przerwać go podając dożylnie serotoninę [Sacks, 2012].

Podczas ataku bólowego stwierdzono intensywne uwalnianie serotoniny z płytek krwi. Nie można jednak jednoznacznie powiązać zmian stężenia serotoniny w surowicy krwi z nasileniem bólu głowy. Czas, w którym stwierdza się spadek stężenia serotoniny w surowicy, nie odpowiada czasowi trwania bólu głowy. Niskie stężenie serotoniny utrzymuje się niekiedy jeszcze przez kilka dni po ustąpieniu napadu.

Pewne jest, że wysokie stężenie 5-HT może powodować skurcz naczyń a to przyczynia się do powstawania aury. Natomiast jej niskie stężenie, może stymulować okołonaczyniowe włókna bólowe i powodować rozszerzenie naczyń krwionośnych poprzez utworzenie NO, prostaglandyn i innych neuropeptydów odpowiedzialnych za wazodilatację [Borgdorff and Tangelder, 2012].



Ryc. 14 Wzór strukturalny serotoniny

Serotonina (Rycina 14) jest aminą biogenną magazynowaną także w jądrach szwu pnia mózgu, których neurony mają projekcję do innych części mózgowia: kory, podwzgórza, układu limbicznego, prążkowiec, gałki bladej i wzgórza. Tworzą układ serotonergiczny, oddziałujący na poszczególne struktury i układy czynnościowe w mózgu. Obecnie uważa się, że istotniejsza w patomechanizmie migreny jest jej funkcja neurotransmitera w ośrodkowym układzie nerwowym [Stępień, 2004].

5-HT reguluje najistotniejsze funkcje organizmu: sen i czuwanie, aktywność ruchową, modulację stanów emocjonalnych, nocycepcję, termoregulację, procesy uczenia się i pamięci oraz inne funkcje podwzgórza [Stępień, 2004]. Powstaje w wyniku biochemicznej przemiany tryptofanu, egzogenego aminokwasu, który dostarczany jest z pożywieniem. W ścianie jelit (komórkach chromochłonne) i w neuronach serotoninowych występuje biosynteza serotoniny [Rang et al., 2001].

Pierwszym etapem jest hydroksylacja tryptofanu przez 5-hydroksylazę tryptofanową w obecności tlenu i tetrahydrobiopteryny. Powstały 5-hydroksytryptofan ulega dekarboksylacji pod działaniem dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych do 5-hydroksytryptaminy, tj. serotoniny.

Przemiana metaboliczna 5-HT przebiega przy udziale MAO, która przekształca aminę w kwas 5-hydroksyindoloocetowy, wydalany z organizmu wraz z moczem.

Głównym magazynem serotoniny są komórki chromochłonne w ścianie jelit (90% całości), płytki krwi oraz neurony serotonergiczne w OUN [Rang et al., 2001].

Serotonina w OUN pełni rolę neurotransmitera, na obwodzie jest autakoidem – hormonem lokalnym o silnych właściwościach naczyniozwężających. Działanie serotoniny następuje za pośrednictwem swoistych receptorów. Wśród nich wyróżniamy 7 typów: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇, a dodatkowo w klasie 5-HT₁ i 5-HT₂ podtypy A, B, C, D. Receptory typu 5-HT₁ występują głównie w mózgu i w niektórych naczyniach krwionośnych (podtyp 5-HT_{1D}). Ich pobudzenie hamuje przewodzenie nerwowe i powoduje skurcz naczyń. Receptory 5-HT_{2A} zlokalizowane są w OUN, mięśniówce gładkiej, trombocytach. Receptory 5-HT_{2B} występują na ścianie żołądka. Efektem ich aktywizacji jest pobudzenie przewodzenia nerwowego i pobudzenie mięśniówki gładkiej. Receptory 5-HT₃ znajdują się w obwodowym układzie nerwowym, szczególnie w aferentnych neuronach nocyceptywnych i neuronach enterycznych. Pobudzenie receptorów 5-HT₃ powoduje wymioty. Receptory 5-HT₄ umiejscowione są głównie w neuronach jelitowych, mają

działanie pobudzające, powodują zwiększenie perystaltyki jelit. Bardzo niewiele wiadomo o funkcjach i farmakologii receptorów 5-HT₅₋₇ [Rang et al., 2001].

Układ serotonergiczny może uczestniczyć w patogenezie migreny poprzez oddziaływanie na korę mózgową, gdzie zlokalizowane są receptory 5-HT₁ oraz 5-HT₂ oraz na układ naczyniowy w obrębie którego znajdują się receptory 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B/C}. Uważa się, iż w patogenezie migreny szczególną rolę odgrywa aktywacja neuronalnych i naczyniowych receptorów 5-HT_{1D} i 5-HT_{1B}, zlokalizowanych w oponie twardej oraz w dużych naczyniach mózgowych. Receptory 5-HT_{1D} znajdują się przede wszystkim w zakończeniach nerwu trójdzielnego, silnie hamują neuronalną transmisję. Receptory 5-HT_{1B} znajdują się głównie w naczyniach mózgowych i pośredniczą w działaniu zwężającym naczynia przez serotoninę [Stępień, 2004].

Zauważono, że istotne znaczenie w patomechanizmie migreny mają procesy biochemiczne, występujące w śródbłonku naczyń mózgowych oraz zakończeniach nerwowych do nich dochodzących. Naczynia mózgowe, unerwiane są przez włókna przekazujące impulsy nocycyptywne do zwoju nerwu trójdzielnego. Podrażnienie włókien przyczynia się do uwolnienia neurotransmiterów naczynioaktywnych (substancja P, CGRP, neurokinina A). Naczynia mózgowe ulegają rozszerzeniu, powstaje neurogenne zapalenie w przestrzeni okołonaczyniowej co powoduje zwiększoną aktywność nerwu trójdzielnego i generuje ból głowy [Stępień, 2004].

Włókna czuciowe pochodzące z nerwu trójdzielnego zawierają CGRP, Substancję P (SP), NOS (ang. nitric oxide synthase – synteza tlenku azotu) i neurokininę A (NKA). Stymulacja elektryczna zwoju nerwu trójdzielnego powoduje uwolnienie do łożyska naczyniowego neuropeptydów naczynioaktywnych, szczególnie CGRP i SP. Konsekwencją tego jest rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększenie przepływu mózgowego, wynaczynienie białek i aktywacja płytek krwi.

W badaniach klinicznych wykazano wzrost stężenia CGRP w żyłę szyjnej podczas napadu migreny, który korelował z nasileniem bólowym [Stępień, 2009].

Według najnowszych doniesień stwierdza się, że u osób z migreną występować mogą zaburzenia przemiany energii w mitochondriach. Przyczyną może być podwyższony poziom zużycia energii w tkance mózgowej. Dowiedziono, że u pacjentów, u których stwierdzono migrenę, występują niedobory ryboflawiny, niacynamidu i koenzymu Q10, tj. elementów biorących udział w produkcji energii w organizmie ludzkim [Sieniawska, 2011].

3. Teoria neuronalna

Teoria zakłada dysfunkcję ośrodków autonomicznych regulujących tzw. grę naczyniową (podwzgórze, układ limbiczny, miejsce sinawe). Wadliwie działający układ antynocycyptywny, tj. kontrolujący doznanie bólowe w pniu mózgu błędnie odbiera bodźce płynące z tkanek głowy jako ból, dalszym skutkiem są zaburzenia naczyniowo-ruchowe [Prusiński, 1999].

Sacks określa tą teorię jako elektryczną. Twierdzi, iż migrena jest pierwotnym zaburzeniem czynności mózgu, niezależnie od tego, jakie mechanizmy wtórne – ogniskowe czy hormonalne – mogą występować w jej obrazie klinicznym [Sack, 2012]. Na początku lat 40 XX wieku Lashley opisał zjawisko towarzyszące aurze migrenowej, tj. falę pobudzenia poruszającą się przez korę wzrokową w tempie 3mm na minutę i pojawiającą się po tym falę całkowitego zahamowania [Eikermann-Haerter, 2009; Sacks, 2012].

W latach 70 XX wieku Olsen i jego kopenhaska szkoła opisuje oligemię korową (spadek mózgowego przepływu krwi) połączoną ze zjawiskiem szerzącej się depresji korowej, tzw. CSD (ang. cortical spreadig depression - CSD), w 1944 po raz pierwszy zbadaną w warunkach doświadczalnych i opisaną przez Leao [Prusiński, 1999].

CSD polega na hamowaniu spontanicznej czynności bioelektrycznej mózgu w odpowiedzi na różny rodzaj stymulacji. Fala zmniejszonej aktywności bioelektrycznej szerzy się po powierzchni kory mózgowej z prędkością 2-5 mm/min, od części potylicznej ku czołowej. Korowa depresja czynności bioelektrycznej mózgu pobudza jądro ogonowe nerwu trójdzielnego, który stanowi istotny element w patogenezie bólu migrenowego [Eikermann-Haerter et al., 2009; Lauritzen, 2001 ; Stępień, 2004].

Funkcjonalne badania obrazkowe wykonywane współcześnie u chorych w czasie aury migrenowej dowodzą występowania postępującej fali oligemii rozprzestrzeniającej się od okolicy potylicznej do czołowej [Stępień, 2009].

4. Genetyczne podłoże bólu migrenowego

Z obserwacji klinicznych wynika, że wśród osób chorujących na migrenę często występuje prawidłowość posiadania przynajmniej jednego rodzica także cierpiącego z powodu bólu migrenowego.

Dokładna liczba i lokalizacja *loci* podatności i genów wciąż nie jest dokładnie poznana. Wyjątkiem jest migrena rodzinna połowiczoporażna. U 50% przebadanych rodzin zidentyfikowano mutację na krótkim ramieniu chromosomu 19p13. Jest to gen *CACNA1A* kodujący podjednostkę alfa 1A kanału wapniowego typu P/Q zależnego od potencjału błonowego. U 15% przebadanych rodzin zlokalizowano zmutowany gen *ATP1A2* na ramieniu długim chromosomu 1q31. Gen ten koduje białka tworzące pompę Na^+ / K^+ - ATP-azową znajdującą się w błonach neuronu.

Dysfunkcje tego kanału zauważono u chorych na migrenę z aurą. Zaburzona wymiana jonów Na^+ i K^+ między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym prowadzi do zmiany potencjału komórkowego w komórkach neuronalnych. Przypuszcza się, że jest to powodem powstawania i rozprzestrzeniania się depolaryzacji korowej (CSD), której objawem klinicznym jest aura migrenowa [Pietrobon, 2010; Stępień, 2004; Stępień, 2009].

Obecnie stwierdza się wieloczynnikowość w etiologii migreny, z komponentą poligenową. Wrodzona predyspozycja sprawia, że układ nerwowy reaguje ze szczególną wrażliwością na określone bodźce. Zaburzona współpraca pomiędzy naczyniami mózgowymi a nerwem trójdzielnym prowadzi do uwolnienia wazoaktywnych amin endogennych. Skutkiem tego jest skurcz naczyniowy (aura), następnie rozkurcz (pulsujący ból głowy) i wywołanie neurogenego okołonaczyniowego stanu zapalnego [Dietlmeier, 2013].

5. Inne czynniki wywołujące napady bólu migrenowego

Zauważono, iż istnieje szereg czynników, które prowokują napad migreny. Wśród nich znajdują się:

- stres i odprężenie po stresie
- zmiany hormonalne (np. w cyklu miesiączkowania)
- pokarm (czekolada, cacao, czerwone wino, orzechy)
- post
- sen (zbyt długi lub za krótki)
- zmęczenie i nadmierny wysiłek fizyczny
- gwałtowne zmiany pogody
- jasne światło, hałas
- dłuższa jazda samochodem lub pociągiem
- leki (nitraty, estrogeny)

Podsumowując, nadal nie znamy dokładnej etiologii migreny. Stępień na podstawie aktualnej wiedzy podaje, że w rozwój napadu migrenowego zaangażowane są trzy współdziałające ze sobą układy: pierwszy to układ naczyniowy, drugi to nerw trójdzielny i jego jądra w pniu mózgu, trzeci to ośrodki zlokalizowane w korze mózgu. Dodatkowo pod rozważenie brane są także czynniki genetyczne oraz środowiskowe, które modyfikują reaktywność ww układów, choć dokładne mechanizmy nie są wyjaśnione [Stępień, 2009].

Istotnym odkryciem pomagającym wyjaśnić mechanizm bólu migrenowego były badania uwidaczniające ogniskowy wzrost przepływu mózgowego w pniu mózgu w trakcie napadu. Obszar ten obejmował twór siatkowaty, substancję szarą okołowodociągową, jądra szwu oraz miejsca sinawe, jak również korowe ośrodki kojarzeniowe słuchowe i wzrokowe. Powtarzające się przekrwienie i zaburzenia metabolizmu tej okolicy powodować mogą degradacje neuronów co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń w procesie nocycypcji. W tej części mózgu znajdują się liczne układy neurotransmisyjne: serotonergiczny (jądro grzbietowe szwu), noradrenergiczny (miejsca sinawe), dopaminergiczny (substancja czarna) i opioidowy (jądro wielkie szwu) [Stępień, 2004].

5.3. Farmakoterapia migreny

Farmakoterapia migreny polega na zmniejszeniu natężenia bólu aż do jego ustąpienia oraz łagodzeniu i usuwaniu objawów towarzyszących (nudności, wymioty). Stosowane są także schematy leczenia zapobiegające migrenie.

5.3.1. Leczenie zapobiegawcze migreny

Schemat ten stosuje się u chorych, u których występują przynajmniej dwa napady w miesiącu, w przypadku bardzo silnych i trwających 48-72 godzin napadów lub w sytuacji, gdy doraźne podanie np. tryptanów nie daje efektu. Europejska Federacja Towarzystw Neurologicznych rekomenduje β -adrenolityki (propranolol, metoprolol), blokery kanału wapniowego (flunaryzyna), leki przeciwdepresyjne (kwas

walproinowy, topiramata) jako leki pierwszego rzutu w leczeniu profilaktycznym migreny. Amitryptylina, naproksen i wyciąg z korzenia i liścia lepiężnika zalicza się do leków drugiego rzutu.

1. Alkaloidy sporyszu

Ergotamina i jej pochodna dihydroergotamina są nieswoistymi ligandami receptorów serotoninerigicznych, α -adrenergicznych i dopaminergicznych [Mutschler et al., 2016]. Silnie kurczą wszystkie naczynia krwionośne, hamują uwalnianie neuropeptydów SP i CGRP. 100 letnie doświadczenie pokazało, że choć skutecznie przerywają ból migrenowy, to dłuższe ich stosowanie może powodować poważne działania niepożądane, takie jak: niedokrwienie obwodowe w kończynach, zwężenie tętnic wieńcowych, zawał serca i niedokrwienie mózgu [Stępień, 2009].

2. Leki przeciwserotoninowe

Na przełomie lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych XX wieku do leczenia migreny wprowadzono: metysergid, pizotifen, cyproheptadynę oraz lizurid. Są to antagoniści receptorów serotoninowych 5-HT₂. Metysergid jest jednym z najskuteczniejszych leków przeciwmigrenowych, ale wywołuje poważne zaburzenia psychiczne i zwłóknienie pozaotrzewnowe. Z tego powodu nie jest lekiem rekomendowanym przez IHS. Pizotifen także skutecznie przerywa ból, jego ujemną stroną jest zwiększanie apetytu u chorych i powodowanie wzrostu masy ciała. Cyproheptadyna jest rzadziej używana, wywołuje podobny efekt uboczny co Pizotifen [Prusiński, 1999].

3. Leki przeciwpadaczkowe

Pod koniec lat 90 XX wieku Mathew i wsp. opublikowali badania informujące o dużej skuteczności Topiramatu w leczeniu migreny. Przyjmuje się, że za efekt przeciwmigrenowy odpowiada zdolność Topiramatu do blokowania kanału sodowego i wapniowego. Dodatkowo hamuje neurotransmisję glutaminergiczną przez działanie antagonistyczne w stosunku do receptora AMPA-kainowego oraz wzmacniania działania hamującego GABA (kwas γ - aminomasłowy), oddziałując na receptor GABA_A. Wykazano, że wskutek tłumienia aktywności nocycyptywnej nerwu trójdzielnego hamuje rozwój depolaryzacji korowej, wiodącego czynnika w patomechanizmie migreny [Stępień, 2009].

Zbadano, iż podawanie 50 mg topiramatu dziennie redukuje częstotliwość napadów w miesiącu z $6,07 \pm 1,89$ do $1,83 \pm 1,39$, zmniejsza intensywność bólu głowy oraz

redukuje czas trwania ataku z $16,37 \pm 7,26$ godzin do $6,23 \pm 5,22$ godzin [Silberstein et al., 2012].

Wśród działań niepożądanych wymienia się zaburzenia myślenia, senność, zmniejszenie masy ciała i nasilenie tworzenia kamieni nerkowych [Mutschler et al., 2016].

Drugim lekiem przeciwpadaczkowym o dowiedzionej skuteczności w leczeniu profilaktycznym migreny jest kwas walproinowy. Klapper i wsp. potwierdzili jego działanie w dawce dziennej 500-1000 mg. Wykazali, że częstotliwość występowania napadów migreny zmniejszyła się o 50% [Stępień, 2009].

Związek ten wykazuje zdolność blokowania kanałów sodowych. Hamując transaminazę GABA zwiększa stężenie GABA w szczelinach synaptycznych [Mutschler et al., 2016]. Dokładny jego mechanizm w patogenezie migreny nie jest dokładnie odkryty. Przypuszcza się, że jest związany z oddziaływaniem na receptory GABA w mózgu, zwłaszcza w obrębie jąder szwu i hamowania nadmiernego pobudzenia receptorów serotoninergetycznych w obrębie jąder nerwu trójdzielnego zwiększających aktywność aminokwasów pobudzających [Stępień, 2009].

Do działań niepożądanych zaliczamy: nadmierną senność, zwiększenie masy ciała, utrata włosów, zaburzenia krzepliwości krwi (trombocytopenia) i przede wszystkim zaburzenia funkcji wątroby [Mutschler et al., 2016].

4. Leki blokujące receptory β -adrenergiczne

Na podstawie przypadkowego spostrzeżenia w końcu lat 60 XX wieku do leczenia migreny wprowadzono propranolol w dawce 80-160 mg na dobę. Istnieją także badania, potwierdzające skuteczność działania metoprololu, w dawce 100-200 mg na dobę [Prusiński, 1999].

Najnowsze badania wskazują, że propranolol zmniejsza częstotliwość napadów w miesiącu z $5,83 \pm 1,98$ do $2,2 \pm 1,67$, zmniejsza intensywność bólu głowy oraz redukuje czas trwania ataku z $15,1 \pm 6,84$ godzin do $7,27 \pm 6,46$ godzin [Silberstein et al., 2012].

5. Leki blokujące kanały wapniowe

Flunaryzyna w dawce 5 mg powoduje zniesienie skurczu naczyń. Jest inhibitorem kanałów wapniowych. Przy dłuższym stosowaniu może powodować objawy pozapiramidowe i depresję, szczególnie u osób starszych [Mutschler et al., 2016].

6. Leki przeciwdepresyjne

6.1. Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

Amitryptylina jest lekiem drugiego rzutu, w aspekcie działania przeciwmigrenowego. Dokładny mechanizm działania w leczeniu migreny nie jest jednoznaczny. Rozważa się hamujący wpływ amitryptyliny na układ adrenergiczny, blokowanie kanałów sodowych, blokowanie presynaptycznego wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny oraz potęgowanie działania tych neurotransmiterów, działanie antagonistyczne w stosunku do receptora NMDA (receptor *N*-metylo-D-asparaginowy), działanie antymuskarynowe i antyhistaminowe. Amitryptylina przyjmowana długotrwale redukuje syntezę serotoniny w jądrach szwu, za pośrednictwem tonicznego pobudzenia autoreceptorów 5-HT_{1A}, biorących udział w syntezie serotoniny w ośrodkowym układzie nerwowym. Lek ten jest silnym antagonistą receptora 5-HT₂. Dodatkowo blokuje receptory muskarynowe, histaminowe H₁ oraz α₁-adrenergiczne [Stępień, 2009]. Podczas stosowania trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych, z powodu działania antycholinergicznego, występować mogą liczne działania niepożądane: suchość w ustach, zatkany nos, zaparcia, problemy z oddawaniem moczu. Dodatkowo pojawić się mogą zaburzenia sercowo-naczyniowe (hipotonia, tachykardia). Poza tym powodować mogą zaburzenia funkcji wątroby, zaburzenia funkcji płciowych, zwiększenie apetytu i wzrost masy ciała [Mutschler at al., 2016]. Skutecznym lekiem z tej grupy, stosowanym jako produkt profilaktyczny w leczeniu migreny jest opipramol podawany w dawce 50-150 mg na dobę. Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne zmniejszają natężenie bólu, skracają czas jego trwania oraz zmniejszają częstotliwość napadów. Skutkiem tego jest ograniczenie przyjmowania leków przeciwbólowych i znaczna poprawa jakości życia [Stępień, 2009].

6.2. Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny

Dokładny mechanizm działania selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny nie jest znany. Przypuszcza się, że blokują transporter serotoniny w błonie presynaptycznej neuronu, zwiększając liczbę neurotransmitera w szczelinie synaptycznej [Mutschler at al., 2016]. Korzystne rezultaty w leczeniu profilaktycznym bólów głowy uzyskano po zastosowaniu fluoksetyny (najbardziej popularny lek przeciwdepresyjny na świecie), paroksetyny i citalopramu [Stępień, 2009].

5.3.2. Leczenie napadu migreny

Najpopularniejszymi lekami używanymi do przerywania bólu są: paracetamol, kwas acetylosalicylowy, kofeina. Szerokie zastosowanie znalazły także naproksen, indometacyna, diklofenak i pyralgina. Do przerywania silnego bólu stosuje się także ergotaminę, która niestety wykazuje poważne działania niepożądane. Odkrycie i wprowadzenie do lecznictwa tryptanów polepszyło skuteczność terapii przeciwbólowej. Sumatryptan jest uznawany za „złoty standard” w leczeniu napadu migreny.

A Leki przeciwbólowe:

1.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ):

- salicylany (kwas acetylosalicylowy, produkty: Aspiryna, Polopiryna)
- koksyby (rofekoksyb)
- pochodne kwasu octowego - (indometacyna, produkt: Metindol)
 - (diklofenak, produkt: Voltaren)
- pochodne kwasu propionowego - (Ibuprofen, produkt: Ibuprom)
 - (deksibuprofen, produkt: Seractil)
 - (ketoprofen, produkt: Ketonal)
 - (naproksen, produkt: Apo-napro)

NLPZ hamują biosyntezę prostaglandyn poprzez blokowanie cyklooksygenaz (COX-1, COX-2). Enzymy te przekształcają kwas arachidonowy w cykliczne nadtlenki, będące prekursorami prostaglandyn, tromboksanu A₂ i prostacyklin. Prostaglandyny uczestniczą w powstawaniu bólu, gorączki i stanu zapalnego. Blokując ich syntezę wymienione leki w różnym stopniu działają przeciwbólowo, przeciwgorączkowo i przeciwzapalnie. Wszystkie wyżej wymienione leki z wyjątkiem koksybów hamują obydwie izoformy enzymów: COX-1 (enzym konstytutywny) i COX-2 (enzym szybko indukowany, np. przez cytokiny). Koksyby blokując tylko COX-2, wykazują zdecydowanie mniej działań niepożądanych. Najczęściej występującymi wśród innych NLPZ są: dolegliwości żołądkowe z rzadko występującymi krwawieniami i owrzodzeniami, obniżenie stężenia protrombiny we krwi.

1.2. Pochodne aniliny – (paracetamol, produkt: Panadol)

Paracetamol szybko przenika barierę krew-mózg, aby na poziomie rdzenia kręgowego i nadrzędnych ośrodków nerwowych hamować wyzwalaną bodźcami

nocyceptywnymi syntezę prostaglandyn. Na obwodzie i w miejscu zapalenia nie powoduje zahamowania syntezy prostaglandyn. Efektem jest działanie przeciwbólowe i przeciwgorączkowe, bez działania przeciwzapalnego. Duże dawki paracetamolu (powyżej 10 g) mogą powodować hepatotoksyczność, skutkiem której może być marskość wątroby.

1.3. Pochodne pirazolu - (propyfenazon, produkt: Saridon)

- (matamizol, produkt: Pyralgina)

Najczęściej używany jest metamizol, który podawany dożylnie szybko i skutecznie likwiduje ból. Pochodne pirazolu nadużywane mogą powodować agranulocytozę [Mutschler et al., 2016].

B. Leki zwężające mięśnie gładkie naczyń krwionośnych głowy

2.1. Nieselektywne - ergotamina, dihydroergotamina

Ergotamina i inne alkaloidy sporyszu (*secale cornutum*) występują w grzybie (*Claviceps purpurea*) pasożytującym na zbożach.

Ergotamina i dihydroergotamina są częściowymi agonistami i antagonistami receptorów α -adrenergicznych. Działają też w sposób niespecyficzny na receptory serotoninowe [Rang et al., 2001].

Wyżej wymienione substancje przez wiele lat uważane były za najlepsze leki w doraźnym przerywaniu napadu bólowego. Z powodu licznych i poważnych działań niepożądanych (zwężenie naczyń obwodowych i wieńcowych, przewlekłe bóle głowy „z odbicia”) obecnie straciły one na popularności [Stępień, 2004].

2.2. Selektywne, swoiste – agoniści receptorów serotoninowych 5-HT_{1B/D} (tryptany)

Tryptany jako agoniści receptorów 5-HT_{1B/D} powodują skurcz mózgowych naczyń krwionośnych, zahamowanie neuropeptydów z aktywowanych zakończeń nerwu trójdzielnego oraz zablokowanie transmisji nocycceptywnej (bólowej) w obrębie nerwu trójdzielnego w kierunku do jądra ogoniastego [Mutschler et al., 2016].

Pierwszym lekiem z tej grupy jest sumatriptan, wprowadzony do leczenia w 1988 roku. Podany doustnie w dawce 50-100 mg przerywa w ciągu 2-4h napad migreny u ok. 70-85%. Dodatkowo znacząco zmniejsza nudności, wymioty i światłowstręt [Prusiński, 1999].

Sumatriptan wykazuje niewielką biodostępność po podaniu doustnym, krótki okres półtrwania, małą lipofilność i słabą przenikalność do ośrodkowego układu nerwowego. Spowodowało to poszukiwanie i powstanie nowych pochodnych: zolmitriptan, naratriptan, rizatriptan, eletriptan, almotriptan i frowatriptan [Mutschler et al., 2016]. Porównując skuteczność działania wszystkich tryptanów szereg badań pokazuje, że ból głowy ustępuje po 2 godzinach: u 37% chorych (sumatriptan, dawka 50 mg) i u 40% chorych (sumatriptan, dawka 100 mg). W przypadku zastosowania 10 mg rizatriptanu ustąpienie bólu zgłaszało 38% badanych, a przy podaniu 2,5 mg zolmitriptanu ustąpienie objawów bólowych zgłaszało 36% respondentów. Najsłabsze działanie wykazywał naratriptan; podanie dawki 2,5 mg powodowało ustąpienie ataku u 28% badanych.

Wyniki wielu badań wykazały, że tryptany są bezpieczne i dobrze tolerowane. Uznaje się je za najskuteczniejsze leki w leczeniu ostrego bólu migrenowego o natężeniu przynajmniej średnim, szczególnie u osób, u których zawodzi leczenie lekami niespecyficznymi (NLPZ) lub są przeciwwskazania do ich stosowania. W badaniach klinicznych wiele tryptanów wywołuje porównywalny odsetek objawów niepożądanych jak placebo. Wśród nich są: nudności, zawroty głowy, uczucie ściskania w klatce piersiowej. Tryptany w niewielkim stopniu mogą wpływać na naczynia wieńcowe, dlatego nie zaleca się ich stosowania u osób z chorobą niedokrwienną serca [Stępień, 2009].

C. Leki przeciwwymiotne

Metoclopramid jest antagonistą receptorów dopaminowych D₂. Działa pobudzająco na motorykę żołądka i jelit. Łagodzi nudności i wymioty. Podawany w ataku migreny łącznie z lekami przeciwbólowymi powoduje lepszą ich przyswajalność [Rang et al., 2001].

5.3.3. Nowe leki przeciwmigrenowe

Odkrycie i potwierdzenie układu trójdzielno-naczyniowego w genezie bólu migrenowego z uwalnianiem do łożyska naczyniowego neuropeptydów, wśród nich CGRP dało podstawy do poszukiwania nowych leków przeciwmigrenowych. CGRP (czynnik o silnych właściwościach naczynioaktywnych) uwalniany jest podczas napadu, jego stężenie koreluje z natężeniem bólu głowy. W fazie badań znajdują się leki: olcegepantem i telcagepantem wykazujące antagonistyczne działanie do receptora CGRP. Wykazują podobną siłę działania co tryptany, ale nie wpływają na naczyniach wieńcowe. Daje to nadzieję na odkrycie leku przeciwmigrenowego, który stosowany będzie u chorych obciążonych przeciwwskazaniami kardiologicznymi [Kuzawińska et al., 2015]

5.4. Fitoterapia migreny

5.4.1. *Chrysanthemum parthenium* – złocień maruna



Ryc. 15 Złocień maruna - *Chrysanthemum parthenium*

Złocień maruna - (*Chrysanthemum parthenium*, *Matricaria parthenium*, *Tanacetum parthenium*) (Rycina 15). Potocznie nazywany feverfew, należy do rodziny *Asteraceae* (*Compositae*). Rdzennie pochodzi z Półwyspu Bałkańskiego. Obecnie spotkać go można w Australii, Europie, Chinach, Japonii, Afryce Północnej, Stanach Zjednoczonych. Rośnie wzdłuż dróg, pól, na granicy lasów. Jest to bylina dorastająca do 1 metra wysokości, wydziela silny zapach, jest gorzka w smaku. Posiada żółtozielone liście, prawie bezwłose. Kwitnie od kwietnia do października (kwiaty żółte o średnicy 2 cm) [ESCOP Monographs, 2003; Pareek et al., 2011]. Roślina ta zawiera szereg związków aktywnych: laktony seskwiterpenowe (pochodne germakranu, gwajanu i eudesmanolidy), olejek eteryczny (pinen, p-cymen, α -pinen, β -pinen, borneol, farnesol), flawonoidy (kwercetyna, apigenina, luteolina). Najbardziej aktywnym, uważanym za składnik decydujący i determinujący właściwości wyciągu z *Chrysanthemum parthenium* jest partenolid; lakton seskwiterpenowy (germakranolid) [Williams et al., 1995]. Szereg badań wskazywało, iż partenolid wykazuje silne działanie przeciwzapalne, przeciwmigrenowe oraz przeciwnowotworowe. Związek ten zawiera pierścień α -metyleno- δ -laktonowy, który wykazuje powinowactwo do miejsc nukleofilowych wielu biologicznie ważnych cząstek.

Wykazano, że wyciąg z ziela *Tanacetum parthenium* trwale hamuje agregację płytek, indukowaną przez różne czynniki pro agregacyjne (ADP, adrenalina, kolagen). Powoduje to hamowanie uwalniania serotoniny z trombocytów [Heptinstall et al.,

1985]. Dodatkowo wykazano, że wyciąg z tego surowca nie hamuje agregacji płytek ludzkich, indukowanej przez kwas arachidonowy. Nie wpływa też na syntezę tromboksanu (B2). Stwierdzono natomiast zdolność wyciągu wodnego z ziela do hamowania komórkowej fosfolipazy, która rozpoczyna kaskadę kwasu arachidonowego [Makheja and Bailey, 1982]. Hamowanie fosfolipazy oraz syntetazy prostaglandyn powoduje zmniejszenie ilości prostaglandyn, odpowiadających za stan zapalny w organizmie [Pareek et al., 2011]. Chloroformowy wyciąg ze świeżych liści złoczenia maruna zmniejszał skurcz mięśni gładkich, prawdopodobnie poprzez blokowanie otwartych kanałów potasowych. [Barsby et al., 1993]. Naukowcy udowodnili, że partenolid, główny składnik wyciągu, hamuje skurcz naczyń; nie poprzez bezpośrednie oddziaływanie na receptory serotoninowe 5-HT₂, lecz pośrednio wpływając na uwalnianie serotoniny gromadzonej w pęcherzykach neuronalnych, rozmieszczonych w tkankach [Béjar, 1996]. Działanie przeciwmigrenowe ziela *Tanacetum parthenium* wynikać może ze zdolności hamowania agregacji płytek krwi, hamowania uwalniania serotoniny oraz działania spazmolitycznego na naczynia krwionośne. Istotny może być także mechanizm przeciwzapalny.

Pierwsze opublikowane badanie potwierdzające skuteczność działania przeciwmigrenowego złoczenia maruny pochodzi z 1983 roku. Przeprowadzone zostało w City of London Migraine Clinic i wykazało, iż spośród 270 badanych, którzy spożywali każdego dnia, świeże liście złoczenia maruny przez dłuższy okres czasu, u ponad 70% z nich zauważono zmniejszenie częstotliwości ataków migrenowych oraz zmniejszenie intensywności bólu głowy [Johnson, 1983]. W 1985 Johnson i współpracownicy przeprowadzili kolejne badania z podójnie ślełą próbą. Spośród 17 pacjentów, którzy wcześniej deklarowali spożywanie liści złoczenia maruny celem łagodzenia bólów migrenowych podzielono na dwie grupy. Jednej podawano placebo, a drugiej kapsułki z wysuszonym i sproszkowanym zielem *Tanacetum parthenium*. Badani zażywający placebo zauważyli zwiększoną częstotliwość i nasilenie bólów głowy, zwiększone uczucie nudności i nasilenie wymiotów. Pacjenci z grupy spożywającej lek nie zauważyli istotnych zmian w częstotliwości i sile bólów głowy. Potwierdziło to przypuszczenie, iż przyjmowanie doustne sproszkowanego ziela tylko zapobiega atakom migrenowym i może być stosowany jako element prewencyjny [Johnson, 1985].

Pomimo znanej i udowodnionej aktywności ziela złocienia maruny, zastosowanie w leczeniu jest nadal niewystarczające. Powodem jest niestabilność partenolidu w surowcu. Powoduje to wiele problemów technologicznych. Badane próbki produktu handlowego po 2 latach przechowywania w warunkach optymalnych, zawierały tylko 10% zawartości początkowej partenolidu. Freudenstein sugeruje, że stabilność ekstraktu otrzymywanego w warunkach nadkrytycznych (CO₂) powinna być zdecydowanie lepsza [Freudenstein, 1998].

Pierwszym preparatem z *Tanacetum parthenium* herba, zarejestrowanym jako lek przeciwmigrenowy bez recepty, był Tanacet 125®. Miało to miejsce w Kanadzie. Produkt zawierał 0,2 % partenolidu w 125 mg standaryzowanego, sproszkowanego surowca, tj. liści złocienia maruna [Arnason et al., 1995].

Obecnie w leczeniu nie stosuje się partenolidu w czystej postaci. Jego zawartość w produktach leczniczych: Herbat Headache Relief, Partenelle™, Tanacet, Presselin Stoffwechseltee™ przygotowywanych z *Tanacetum parthenium* jest bardzo różna. W Wielkiej Brytanii i Kanadzie, preparaty muszą zawierać przynajmniej 0,2% partenolidu, a we Francji 0,1%. [Koprowska i Czyż, 2010].

Poniżej przedstawiono produkty, zarejestrowane na różnych rynkach europejskich zawierające w swym składzie złocień maruna:

- MigraHerb tabletki (Wielka Brytania)
- Arkocaps Partenelle tabletki (Szwajcaria)
- Cefagran tabletki (Niemcy)
- Nemagran krople (Niemcy) [Dietlmeier, 2013].

5.4.2. *Petasites hybridus* – lepiężnik różowy



Ryc. 16 Lepiężnik różowy - *Petasites hybridus*

Petasites hybridus (*Petasites officinalis*) – lepiężnik różowy (lepiężnik lekarski), (Rycina 16). Lepiężnik (ang. butterbur) jest wieloletnią byliną rosnącą w Azji, Ameryce Północnej, Afryce. W Europie występuje 8 gatunków należących do rodzaju *Petasites*. Spotkać je można w podmokłych siedliskach: nad brzegami rzek, strumyków, w zaroślach wilgotnych lasów. *Petasites hybridus* posiada grubą, mięsistą łodygę kwiatostanową, na której wiosną wyrastają bezogonkowe, lancetowate łuski. Kwitnie przed rozwojem liści. Kwiaty zebrane są w koszyczki, a te tworzą grona na szczycie łodygi. Liście o kształcie sercowato-nerkowatym wyrastają bezpośrednio z kłącza osiągając średnicę do kilkudziesięciu centymetrów [Strzelecka i Kowalewski, 2000].

Spośród różnych gatunków lepiężnika w Europie *Petasites hybridus* jest najczęściej stosowany jako lek. Na Dalekim Wschodzie (Chiny, Japonia, Korea) dużo uwagi poświęca się gatunkom: *Petasites japonicus* i *Petasites formosanus* [Ożarowski i wsp., 2014]. W fitoterapii migreny wykorzystuje się liść oraz kłącze lepiężnika. Surowce te zawierają olejek eteryczny z alkoholami seskwiterpenowymi pochodnymi eremofilanu (petazyna, izopetazyna, petazol), garbniki, flawonoidy i alkaloidy pirolizydynowe [Lamer-Zalewska i wsp., 2007]. Istnieje szereg badań wskazujących na liczne właściwości biologiczne zarówno ekstraktu z lepiężnika różowego jak i poszczególnych związków, szczególnie petazyny. Potwierdzono u nich: zdolność

hamowania aktywności cyklooksygenazy COX-1 oraz COX-2, zdolność zmniejszania uwalniania prostaglandyn i leukotrienów (poprzez hamowanie lipooksygenaz) oraz antagonizm wobec kanałów wapniowych bramkowanych napięciem typu L. Blokowanie kanałów wapniowych powodowało wazorelaksację naczyń krwionośnych, skutkiem czego jest obniżenie ciśnienia krwi, czy rozkurcz naczyń mózgowych [Kálin, 2003; Ożarowski i wsp., 2014]. Ekstrakt z lepiężnika wpływa na aktywność cytochromu P450, moderuje aktywność 5-lipooksygenazy, 11 β -hydroxylazy, urokinazy. S-petazyna i izo-S-petazyna blokują kanały wapniowe. Podanie iniekcji donaczyniowej zawierającej petazynę, powodują spowolnienie pracy serca u szczurów. Petazyna wykazuje także efekt steroidowy. Powoduje spadek stężenia kortykosteronu oraz hamowanie uwalniania pregnenolonu we krwi szczurzej [National Toxicology Program, 2009].

Ekstrakt z liści i kłącza *Petasites hybridus* wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwmigrenowe, przeciwalergiczne i spazmolityczne. Skuteczność tych efektów została potwierdzona w kilku badaniach klinicznych. Pokazują one, iż podawanie wyciągu z lepiężnika może być skutecznym środkiem prewencyjnym w leczeniu migreny, alergicznego nieżytu nosa oraz astmy [Ożarowski i wsp., 2014]. Niemieccy naukowcy prowadzili badania z użyciem standaryzowanego ekstraktu z korzenia lepiężnika różowego (Petadolex), celem sprawdzenia skuteczności jego działania jako środka prewencyjnego w leczeniu migreny oraz bezpieczeństwa stosowania. Eksperyment prowadzono z podwójnie ślełą próbą przez okres 12 tygodni. 33 pacjentom chorującym na migrenę podawano 25 mg ekstraktu 2 razy dziennie, a 27 pacjentom podawano placebo. Zanotowano, iż podawanie ekstraktu znacząco zmniejsza częstotliwość ataku migreny (46% po 4 tygodniach stosowania, 60% po 8 tygodniach stosowania, 50% po 12 tygodniach stosowania). Nie odnotowano istotnych działań niepożądanych, dlatego stwierdzono, że wyciąg z lepiężnika może być używany jako skuteczny i bezpieczny środek profilaktyczny w leczeniu *hemicrania* [Diener et al., 2004].

Wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa stosowania surowców z lepiężnika różowego może budzić obecność w nich alkaloidów pirolizydynowych o działaniu kancerogennym i hepatotoksycznym.

5.5. Niefarmakologiczne metody leczenia zapobiegawczego migreny

Patogeneza migreny jest nadal do końca niewyjaśniona. Konwencjonalne leczenie farmakologiczne nie zawsze przynosi pożądane rezultaty. Często obarczone jest szeregiem działań niepożądanych. Powoduje to poszukiwanie kolejnych dróg, które pomogą zwalczać uporczywy ból głowy.

5.5.1. Akupunktura

Akupunktura jest gałęzią naturalnej medycyny chińskiej polegającą na nakłuwaniu ciała srebrnymi lub złotymi igłami stosownych punktów, odpowiadających za poszczególne narządy. Jest to metoda, którą stosuje się w walce z bólem głowy. Badania prowadzone w Chinach na dużej grupie chorych pokazują, że stosowanie akupunktury jako dodatkowej terapii powoduje zmniejszenie częstotliwości napadów i intensywności bólowej, poprawia jakość życia oraz zmniejsza koszty związanych z leczeniem i absencją w pracy z powodu migreny [Deng et al., 2012].

Dodatkowo istnieje wiele badań prowadzonych w ośrodkach naukowych w Europie i USA, które potwierdzają skuteczność akupunktury w leczeniu migreny. Linde i współpracownicy dokonali szczegółowego przeglądu publikacji i 24 eksperymentów. Na ich podstawie stwierdzili korzyści u pacjentów stosujących akupunkturę, tj. mniej ataków bólowych, mniej działań niepożądanych. Nadal jest jednak dużo kontrowersji ze standaryzacją tej metody (dokładne miejsce wkłucia igły, głębokość iniekcji) [Linde et al., 2009].

5.5.2. Składniki mineralne, witaminowe i dietetyczne

1. Magnez

Jest makroelementem, jednym z najważniejszych jonów wewnątrzkomórkowych. Jako kofaktor ponad 300 enzymów w organizmie ludzkim, reguluje szereg reakcji biochemicznych. Uczestniczy w przewodnictwie nerwowym, termoregulacji,

kurczliwości mięśni, optymalizuje ciśnienie krwi. Magnez to pierwiastek wpływający na homeostazę organizmu [Somer, 2000; Vormann, 2003].

Mauskop i współpracownicy zauważyli, że wśród pacjentów z migreną klasyczną (z aurą) i migreną bez aury zauważono bardzo niski poziom magnezu. Ponad 50% pacjentów podczas ataku migrenowego ma obniżony jego poziom we krwi [Mauskop and Altura, 1998].

Peikert i współpracownicy przeprowadzili badanie z udziałem 81 pacjentów z migreną, w którym sprawdzono i potwierdzono profilaktyczny wpływ magnezu w leczeniu migreny. Jednej grupie podawano 600 mg dicytrynianu trimagnezu dziennie, przez okres 12 tygodni, drugiej placebo. Zauważono, że podawanie takiej dawki znacząco zmniejszyło częstotliwość ataków (41,6%) w porównaniu z placebo. Dodatkowo w grupie spożywającej magnez znacząco zmniejszyła się konsumpcja leków przeciwbólowych [Peikert et al., 1996]. Istnieją przypuszczenia, że niski poziom magnezu może aktywizować zjawisko szerzącej się depresji korowej, tzw. CSD (ang. cortical spreadig depression - CSD). Dodatkowo przyczynia się do nadmiernej agregację płytek krwi, dysfunkcji receptorów serotoninowych, zaburzenia uwalniania wielu neurotransmiterów [Mauskop and Varughese, 2012].

2. Koenzym Q10

Koenzym Q10 to kolejny składnik, który stanowi element leczenia prewencyjnego migreny. Koenzym Q10 (syn. ubichinon, ubidekarenon) występuje w mitochondrium komórkowym, gdzie odpowiada za transport elektronów w łańcuchu oddechowym. Jest endogennym, lipofilowym antyoksydantem, który zapobiega generacji reaktywnych form tlenu, oksydacyjnym modyfikacjom białek, lipidów i DNA. Właściwości antyoksydacyjne ma zredukowana postać koenzymu Q10 – ubichinol (CoQ10H₂) oraz rodnik ubisemichinonowy (CoQ10H[•]) [Siemieniuk i Skrzydlewska, 2005]. Rosen i współpracownicy podawali 31 pacjentom z bólami głowy o podłożu migrenowym 150 mg koenzymu Q10 dziennie, przez 3 miesiące. Ustalono, że 61,3% uczestników badania stwierdziło zmniejszenie liczby dni z migrenowym bólem głowy o ponad 50%. Dodatkowo nie odnotowano żadnych działań niepożądanych, wynikających z przyjmowania koenzymu Q10 [Rozen et al., 2002].

3. Składniki diety

Analiza czynników dietetycznych wskazała szereg substancji, które potencjalnie zwiększają występowanie ataku migrenowego. Według Przeglądu Kanadyjskiego Towarzystwa Medycznego spożycie żywności zawierającej aspartam, glutaminian sodu, azotany kojarzone jest z pojawieniem się bólów głowy. Dodatkowo produkty zawierające tyraminę (wołowina, kurza wątróbka), fenyloalaninę (czekolada), synefrynę (owoce cytrusowe) mogą nasilać częstotliwość występowania hemicrania [Sharp, 2005]. Już 50 lat temu Selby i Lance zauważyli i odnotowali, że istnieją produkty, które powodują wystąpienie ataku migrenowego. W różnych badaniach potwierdzono, iż blisko 60% chorych łączy wystąpienie bólu głowy ze spożyciem pewnej grupy produktów. Przypuszcza się, że chorzy wykazują szczególną nadwrażliwość na nie [Finocchi and Sivori, 2012]. Wśród nich najczęściej wymienianymi są: czekolada, ser pleśniowy, czerwone wino, kawa. Obecne w tych produktach tyramina, nitraty, siarczany powodują nadmierne uwalnianie serotoniny i norepinefryny. Powoduje to skurcz naczyń krwionośnych, nadmierne pobudzenie nerwu trójdzielnego, a to przyczynia się do powstania bólu głowy. Naukowcy twierdzą, że eliminowanie ww składników z diety, można uważać za element prewencyjny w leczeniu hemicrania [Millichap and Yee, 2003].

III. CEL PRACY

Migrena jest problemem globalnym. Według Światowej Organizacji Zdrowia – ang. World Health Organization - WHO 11% dorosłej populacji dotknięte jest tą chorobą. Badania prowadzone w Polsce („Migrena w Polsce” MEC GLOBAL) sugerują, że co najmniej 4 mln ludzi cierpi z powodu bólów migrenowych. Jakość ich życia znacznie spada. Choroba uniemożliwia uczenie się, często jest przyczyną absencji w pracy i życiu społecznym. Ziele *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. może być pomocne w leczeniu migreny. Doniesienia literaturowe o obecności charakterystycznych laktonów seskwiterpenowych pochodnych gremakranu w rodzaju *Stizolophus* sugerowały ich obecność także w tytułowej roślinie. Należałoby sprawdzić hipotezę, że obecność epoksydu w strukturze gremakranolidu, występującego we wszystkich dotąd izolowanych gremakranolidach z gatunków rodzaju *Stizolophus* może być odpowiedzialna za zmniejszenie agregacji płytek krwi i zmniejszenie uwalniania serotoniny z trombocytów. Mechanizmy ten prawdopodobnie przyczyniają się do ograniczenia częstotliwości występowania napadów bólowych głowy oraz zmniejszenia ich intensywności.

Głównym celem pracy było:

- wyizolowanie i identyfikacja związków potencjalnie czynnych z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* Cass.,
- określenie zawartości procentowej dominujących gremakranolidów w wyciągu metanolowym (standaryzacja wyciągu),
- dokonanie oceny zdolności hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi dominujących laktonów seskwiterpenowych i ekstraktu z ziela *S. balsamitaefolius* i porównania ich aktywności z działaniem partenolidu, związku o udowodnionym działaniu przeciwmigrenowym.

Ponadto:

- dokonano analizy piśmiennictwa z zakresu etiopatologii, fitoterapii i farmakoterapii migreny celem opracowania aktualnego kompendium wiedzy z tej dziedziny,
- poddano analizie wyniki izolacji i identyfikacji związków badanej rośliny pod kątem ich wartości chemotaksonomicznej,

- poddano analizie zależność niektórych elementów struktury wyizolowanych gerkranolidów do ich barwy na chromatogramach.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał badawczy – surowiec roślinny

Surowiec roślinny będący materiałem badawczym, uzyskano z uprawy prowadzonej w ogrodzie Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Nasiona *Stizolophus balsamitaefolius* pochodziły z Ogrodu Botanicznego w Teheranie (Iran). Nadziemne części ziela badanej rośliny zebrane zostały w sierpniu 2012 roku. Surowiec poddano suszeniu w suszarni z nawiewem, w temperaturze około 35°C przez 72 godziny. Wysuszone i rozdrobnione ziele stanowiło materiał do dalszej analizy.

2. Analiza fitochemiczna

2.1. Przygotowanie ekstraktów z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

Wysuszone i rozdrobnione ziele *Stizolophus balsamitaefolius* o masie 500 g poddano trzykrotnej maceracji metanolem w ilości 750 ml. Poszczególne wyciągi metanolowe połączono i zagęszczono w warunkach obniżonego ciśnienia. Część ekstraktu metanolowego w ilości 0,74 g poddano analizie HPLC (ang. High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Pozostały wyciąg metanolowy w ilości 62,56 g zalano wodą destylowaną. Po 24 godzinnej maceracji, wodny wyciąg przesączono przez watę celem usunięcia chlorofilu, następnie 3-krotnie wytrząsano go z chlorkiem metylenu. Uzyskany ekstrakt chlorku metylenu został osuszony przy pomocy bezwodnego siarczanu sodu. Po usunięciu substancji osuszającej ekstrakt zagęszczono do objętości chromatograficznej. Otrzymany w ten sposób zagęszczony wyciąg chlorku metylenu z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* w ilości 5,42 g przeznaczony został do analizy izolacyjnej metodą chromatografii kolumnowej (ang. Column Chromatography - CC), po uprzedniej ocenie jego składu chemicznego metodą chromatografii cienkowarstwowej (ang. Thin Layer Chromatography - TLC).

Natomiast wodny roztwór dalej trzykrotnie wytrząsano octanem etylu. Wyciąg octanu etylu przesączono przez sączonek dwufazowy oddzielając resztki fazy nieorganicznej, następnie zagęszczono go w warunkach obniżonego ciśnienia do objętości chromatograficznej. Uzyskany wyciąg octanu etylu, w ilości 2,11 g, poddano analizie chromatograficznej metodą CC, po uprzednim rozpoznaniu chromatograficznym metodą TLC.

2.2. Izolacja związków z zieleń *Stizolophus balsamitaefolius* metodą chromatografii kolumnowej (ang. Column Chromatography - CC)

Celem uzyskania rozdziału związków zawartych w wyciągach chlorku metylenu i octanu etylu użyto chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Jeżeli było to konieczne, wybrane frakcje poddano rechromatografii w wyniku których otrzymano podfrakcje zawierające czyste chromatograficznie związki.

2.2.1. Zasada metody

Chromatografia kolumnowa służy do rozdzielania mieszaniny związków poprzez wprowadzanie jej na adsorbent (stała faza stacjonarna) umieszczony w szklanej kolumnie. Ruchoma faza ciekła (eluent) wprowadzana na kolumnę, grawitacyjnie przepływa przez adsorbent i nałożoną substancję roślinną (ekstrakt lub frakcja). W zależności od polarności związków każdy w różny sposób oddziałuje z adsorbentem. Dobierając odpowiednio polarność fazy ciekłej i szybkość jej przepływu przez kolumnę początkowo zbiera się związki lipofilne. Zwiększając polarność układu wymywającego, „wypłukiwane” są z kolumny związki bardziej polarne. Skład eluentu kontrolowany jest metodą TLC. Łączone są frakcje ze związkami o jednakowej barwie i wartościach R_f .

2.2.2. Aparatura i sprzęt

Proces prowadzono na kolumnach szklanych o odpowiedniej długości, tak aby zachować proporcje pomiędzy substancją rozdzielaną i adsorbentem: 1:30-40.

Eluent wprowadzono w kolbach miarowych ze specjalnym podajnikiem.

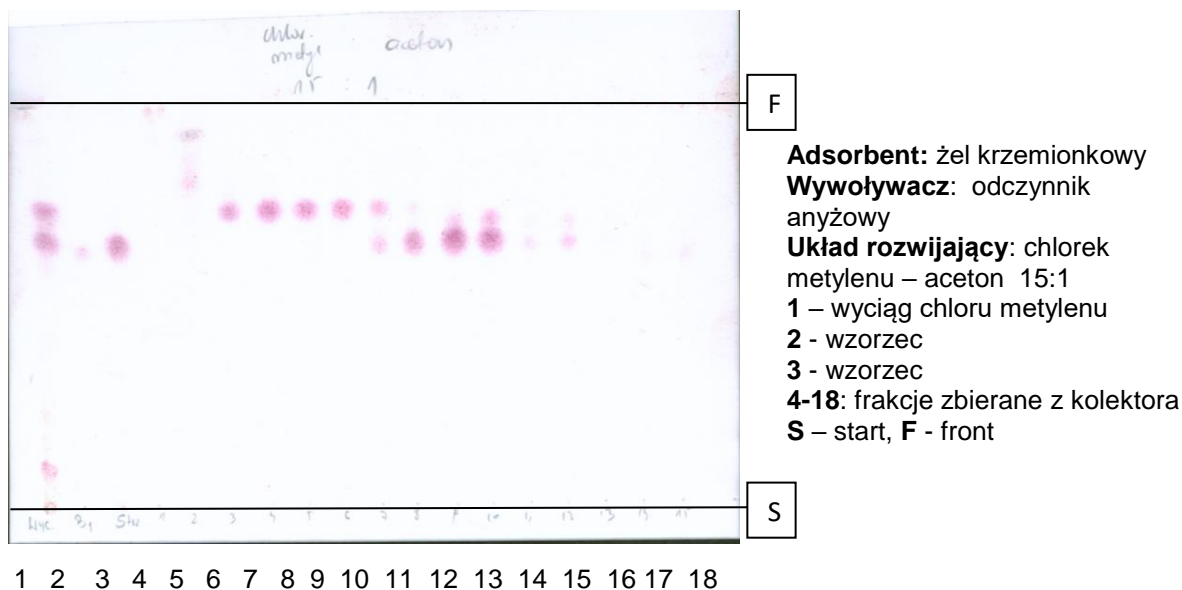
Proces prowadzono w sposób ciągły, przy użyciu kolektora frakcji, pracującego 24 godziny na dobę.

2.2.3. Odczynniki

- chlorek metylenu, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA
- aceton, firma Chempur
- heksan, firma Chempur
- metanol, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA
- 95% etanol, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA
- octan etylu, firma Chempur
- żel krzemionkowy Kieselgel 60, grubość ziaren 0,063-0,200 mm, firma Merc – chromatografia wstępna
- żel krzemionkowy Kieselgel 60, grubość ziaren <0,063 mm, firma Merc - rechromatografia

2.2.4. Tok analizy

Odpowiednio zagęszczone substancje roślinne nanoszono na powierzchnię żelu krzemionkowego w momencie, gdy warstwa rozpuszczalnika zrównała się z warstwą adsorbentu. Dla wyciągów był to żel krzemionkowy Kieselgel 60 o grubości ziaren 0,063-0,200 mm (chromatografia wstępna). Dla rechromatografowanych frakcji użyto żelu Kieselgel 60 o grubość ziaren poniżej 0,063 mm. Kolumnę przemywano odpowiednią mieszaniną rozpuszczalników, a następnie stopniowo zwiększano polarność układu. Regulowano wyciek z kolumny: średnio jedna kropla co 20 sekund. Frakcje, zawierające wymywane związki, zbierano w probówkach. Zawartość poszczególnych frakcji kontrolowano metodą TLC. Eluaty o tej samej barwie i wartości R_f łączono we frakcje (Rycina 17).



Ryc. 17 Przykładowy chromatogram z kontroli wycieków z kolumny podczas rozdzielania ekstraktu chlorku metylenu z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

2.3. Metody identyfikacji i ilościowego oznaczenia związków czynnych z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

2.3.1. Identyfikacja wyizolowanych związków metodą chromatografii cienkowarstwowej (ang. Thin Layer Chromatography - TLC)

Chromatografia cienkowarstwowa użyta została celem przeprowadzenia wstępnej analizy chromatograficznej ekstraktu chlorku metylenu i octanu etylu z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*. Analizując chromatogramy ustalono odpowiednią mieszaninę rozpuszczalników, która stanowiła ruchomą fazę ciekłą (eluat) w chromatografii kolumnowej. TLC stosowano do kontroli otrzymanych frakcji z rozdzielania kolumnowego. Analizując barwne plamy na chromatogramach oceniano czystość otrzymanych związków. Porównywanie koloru plam i R_f z wzorcami służyło wstępnej identyfikacji związków. Sama barwa na chromatografach już sugerowała obecność niektórych podstawników w szkieletie identyfikowanego laktonu seskwiterpenowego [Nowak, 1993; Urbańska et al., 2014].

2.3.1.1. Zasada metody

TLC służy do identyfikacji związków oraz oczyszczania mieszaniny związków chemicznych. Faza stała ma właściwości sorpcyjne, jest umieszczona jako cienka warstwa (do 2 mm) na płytce aluminiowej, szklanej lub wykonanej z tworzywa sztucznego. Poszczególne frakcje nanosi się punktowo przy dolnej krawędzi płytki, którą umieszcza się w szklanej komorze chromatograficznej. Komorę wypełnia się niewielką ilością eluentu (faza rozwijająca), który przemieszcza się w górę po adsorbencie (zjawisko kapilarne). Podczas analizy związki badane, faza stała i eluent są poddawane oddziaływaniom międzycząsteczkowym. Analiza kończy się kiedy front fazy rozwijającej dotrze do górnej krawędzi płytki. W zależności od polarności związku badanego i polarności eluentu dociera on na różną wysokość płytki. Iloraz odległości przebytej przez związek badany przez odległość przebytą przez czoło układu rozwijającego nazywamy współczynnikiem retencji lub współczynnikiem opóźnienia - R_f . Dla danego związku, w danym układzie rozwijającym, na danej fazie stałej ma wartość stałą i może służyć jako wskaźnik charakteryzujący dany związek.

Podobnie barwna plama związku badanego, w danym układzie rozwijającym, na danej fazie stałej jest niezmienna, dlatego również może służyć jako wskaźnik identyfikujący. Jeżeli związki nie są barwne, ich obecność na chromatogramie można wywołać odczynnikami (np. odczynnik anyżowy) lub analizować przy użyciu światła UV, przed lub po spryskaniu.

2.3.1.2. Aparatura i sprzęt

- komora szklana do rozwijania chromatogramu
- płytki aluminiowe TLC Kieselgel 60 pokryte żelem krzemionkowym (grubość warstwy - 0,25 mm), wymiar: 20 x 20 cm - firma Merck
- kapilary szklane do nakładania frakcji badanych

2.3.1.3. Odczynniki

- odczynnik anyżowy:

0,5 cm³ aldehydu anyżowego, firma Alfa Aesar

10 cm³ lodowatego kwasu octowego, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA

85 cm³ metanolu, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA

4,5 cm³ stęż. kwasu siarkowego, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA

- metanol, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA

- chlorek metylenu, firma POCH Avantor Performance Materials Poland SA

- aceton, firma Chempur

- heksan, firma Chempur

- octan etylu, firma Chempur

2.3.1.4. Tok analizy

W analizie TLC stosowano płytki aluminiowe TLC Kieselgel 60 pokryte żelem krzemionkowym (grubość warstwy - 0,25 mm), wymiar: 20 x 20 cm firmy Merck. Kapilarą szklaną nakładano na płytkę ok. 5 µl frakcji badanych i wzorców. Płytki chromatograficzne rozwijano w komorze szklanej z użyciem odpowiedniego układu rozpuszczalników (układ rozwijający). Proces prowadzony był w temperaturze pokojowej, techniką wstępującą, jednokierunkową. Po rozdziale chromatograficznym płytki suszono, spryskiwano odczynnikiem anyżowym i ogrzewano w temperaturze 105°C przez około 3 min., aby uwidocznić plamy badanych substancji.

Celem wstępnej identyfikacji związków wyizolowanych z ekstraktów z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* porównywano barwę plam i R_f frakcji badanych i wzorców. Analizę przeprowadzono w świetle widzialnym oraz UV o długości fali λ=254nm.

2.3.2. Oznaczenie temperatury topnienia związków krystalicznych wyizolowanych z zieleń *Stizolophus balsamitaefolius*

Temperaturę topnienia związków krystalicznych mierzono przy użyciu aparatu Büchi Melting Point B-540. Pomiaru dokonywano trzykrotnie uzyskując średnią temperaturę topnienia analizowanego związku, którą porównywano z danymi z piśmiennictwa, w przypadku związku znanego.

2.3.3. Identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie wybranych związków metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

HPLC użyto celem identyfikacji oraz ilościowego określenia zawartości dominujących związków (stizolina, stizolicyna, izospiciformina) występujących w ekstrakcie metanolem z zieleń *Stizolophus balsamitaefolius*. Analizę przeprowadzono w Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

2.3.3.1. Zasada metody

Analizę wykonano wykorzystując metodę wzorca zewnętrznego, używając chromatografu cieczowego z detektorem diodowym (HPLC – DAD).

2.3.3.2. Aparatura i sprzęt

Analizę przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego Agilent 1200 SL z detektorem diodowym z prekolumną i kolumną do HPLC Lichrospher 60 RP-Select B (5 µm, 125-4) firmy Merck.

Dane i chromatogramy zostały zebrane i opracowane przy użyciu oprogramowania Chem Station for LC 3 D system Rev. B.04.01 SP1 z firmy Agilent Technologies. Dalszej analizy danych dokonywano przy użyciu oprogramowania Chem Station for LC 3D system Rev. B.04.01 SP1, Microsoft Excel 2000 i Sigmaplot 11-11.0.0.77.

2.3.3.3. Odczynniki

Metanol – firma Merck KGaA, Niemcy

Woda oczyszczona – firma Merk Direct –Q 3 UV

Etanol - firma Merck KGaA, Niemcy

Wzorce: stizolina, stizolicyna, izospiciformina – wyizolowano i zidentyfikowano metodami spektralnymi w ramach niniejszej pracy.

2.3.3.4. Tok analizy

Warunki chromatografii:

Do rozdziału badanych związków zastosowano prekolumnę i kolumnę (12,5 cm) do chromatografii cieczowej Lichrospher 60 RP-Select B (5 μ m, 125-4) firmy Merck wraz z prekolumną zawartą w zintegrowanym kardridżu. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w warunkach izokratycznych. W czasie pracy chromatografu przepływ fazy był stały i wynosił 1 ml/min. Objętość dozowanej próbki wynosiła 15 μ l. Pomiaru absorbancji dokonano przy długość fali $\lambda=242$ nm.

Faza ruchoma:

Faza ruchoma zawierała wodę i metanol. Rozdział chromatograficzny był prowadzony z zastosowaniem elucji gradientowej. Schemat gradientu wymywania użyty do analizy związków czynnych z ekstraktu roślinnego (*Stizolophus balsamitaefolius*) był następujący: min. 0 – 5% metanolu, min. 12 – 30% metanolu, min. 25 – 30% metanolu, min. 30 – 5% metanolu. Czas retencji wynosił 5 min.

Standardy kalibracyjne:

Analizę wykonano wykorzystując metodę wzorca zewnętrznego. Roztwory wzorcowe związków (stizolina, stizolicyna, izospiciformina) uzyskano poprzez ich rozpuszczenie w 95% etanolu, uzyskując stężenie 1 mg/ml. Stanowiły one materiał wyjściowy do przygotowania krzywych kalibracyjnych. Wykonano serię 6 rozcieńczeń dla każdego z wzorców przy detekcji DAD (1000,800,700,600,500,300 μ g/ml). Powierzchnia piku określona była dla każdej próby kalibracyjnej. Równanie liniowe opisywało zależność pomiędzy stężeniem a polem powierzchni piku chromatograficznego.

Przygotowanie próbek

Związki analizowane (stizolina, stizolicyna, izospiciformina) oraz metanolowy wyciąg roślinny (*Stizolophus balsamitaefolius*) rozpuszczono w 95% etanolu celem uzyskania stężenia 20 mg/ml. Następnie przenoszono je celem analizy HPLC. Objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła 15 μ l, każdą powtarzano trzykrotnie.

2.3.4. Identyfikacja wyizolowanych związków metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

Celem określenia struktury wyizolowanych związków wykorzystano spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego - NMR (widma ^1H NMR, ^{13}C NMR, dwuwymiarowe $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR COSY, $^1\text{H}/^1\text{H}$ NMR COSY).

Widma wykonano we współpracy z Pracownią NMR Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Interpretacji widm przeprowadzono samodzielnie.

2.3.4.1. Zasada metody

Analiza NMR polega na wzbudzaniu spinów jądrowych znajdujących się w zewnętrznym polu magnetycznym poprzez szybkie zmiany pola magnetycznego. Powracające do stanu równowagi termodynamicznej układy spinów jądrowych emitują promieniowanie elektromagnetyczne, które ulega rejestracji. Parametrem opisującym widmo jest przesunięcie chemiczne – δ wyrażane w jednostkach ppm. Jądra znajdujące się w określonych grupach chemicznych emitują charakterystyczne promieniowanie elektromagnetyczne o określonej wartości przesunięcia chemicznego – δ .

Porównując zarejestrowane δ (ppm) z wartościami tablicowymi umożliwia precyzyjną identyfikację struktury chemicznej wyizolowanego związku.

Kolejnym parametrem używanym do opisu widm jest stała sprzężenia – J wyrażana w Hz. Stała sprzężenia – J opisuje oddziaływanie między sąsiadującymi jądrami, tzw. sprzężenia spinowo-spinowe. Pomocny w interpretacji był także parametr – stała integracji. Wskazywał on na ilość protonów przy poszczególnych węglach.

Jednorodnie chromatograficznie związki poddane analizie ^1H NMR wykazały sprzężenia między sąsiednimi protonami. Miejsca protonów wskazywały na widmach wartości przesunięć chemicznych - δ (ppm) a konformację przestrzenną protonów wyjaśniała stała sprzężenia (J) mierzona w Hz. Stała integracji wskazywała na ilość protonów przy poszczególnych węglach. Sprzężenia między kolejnymi protonami wskazywały widma dwuwymiarowe $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY. W wyjątkowych sytuacjach, sięgano po widma NOESY (sprzężenia o tej samej konfiguracji przestrzennej), HSQC (wiązania H/C) i HMBC (wiązanie H/C dalekiego zasięgu – do 4 węgla).

2.3.4.2. Aparatura i sprzęt

Analizy wykonano na spektrofotometrze Varian 600 przy częstotliwości 600,67MHz (widma protonowe) i częstotliwości 150MHz (widma węglowe)

2.3.4.3. Odczynniki

deuterowany chloroform

deuterowany metanol

deuterowany woda

2.3.4.4. Tok analizy

Jednorodnie chromatograficznie związki, poddane analizie ^1H NMR, wykazały sprzężenia między sąsiednimi protonami. Miejsca protonów wskazywały na widmach wartości przesunięć chemicznych (ppm). W przypadku analizowanych gromakranolidów sygnały o najwyższych wartościach ppm dawały protony z podwójnym wiązaniem, nieco mniejsze protony spod tlenu, następnie protony od grup CH_2 w szkielecie i dalej CH_2 w szkielecie. Charakterystyczne singlety lub

dublety z integracją 3H dawały grupy metylowe w przedziale 0,8 – 2.0 ppm. Konformację przestrzenną protonów sugerowały wartości stałej sprzężenia (J) mierzonej w Hz. Do ustalania struktur otrzymanych związków wykorzystywano widma ^{13}C NMR. Tutaj sygnały w najniższych polach przesunięcia chemicznego (150-200ppm), wskazywały na obecność węgla czwartorzędowych połączonych z tlenem. Sygnały przy wartościach 110-120ppm wskazywały na połączenia $-\text{CH}=\text{CH}-$, następnie do 50ppm na węgle trzeciorzędowe, do 40ppm węgle drugorzędowe. Na najwyższych polach (20-30ppm) pojawiały się sygnały węgla tworzących grupy metylowe. Interpretowano też widma (bardzo pomocne zwłaszcza w identyfikacji związku nieseskwiterpenowego): HMBC, HSQC i NOESY. Analizy wykonano we współpracy z Pracownią NMR Wydziału Chemii UAM w Poznaniu.

Do rozpuszczania analizowanych związków stosowano deuterowane rozpuszczalniki: chloroform, metanol i w jednym przypadku wodę – celem wyeliminowania z wykresu sygnały pochodzące od grup hydroksylowych w analizowanym związku.

2.3.5. Spektrometria mas (ang. Mass Spectrometry - MS)

Celem określenia struktury wyizolowanego związku H, wykorzystano spektroskopię masową MS (wysokorozdzielcze widmo masowe - HR-TOF-ESI-MS; niskorozdzielcze widmo masowe - LR-ESI-MS). Widma wykonano we współpracy z Pracownią MS Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

2.3.5.1. Zasada metody

Spektrometria masowa jest nowoczesną techniką analityczną pozwalającą na dokładny pomiar masy cząsteczkowej analizowanego związku. Badana substancja zostaje zjonizowana w próżni przez rozpylanie w polu elektrycznym. W przypadku ESI (ang. Electrospray Ionization), jonizacja polega na rozpylaniu pod ciśnieniem atmosferycznym cieczy zawierającej badaną substancję z igły, do której przyłożono wysokie napięcie, zwykle 1–5 kV. Powstaje heterogeniczny strumień jonów (dodatnich lub ujemnych), który analizator mas rozdziela ze względu na stosunek ich masy do ładunku. Detektor zamienia w sposób ilościowy sygnał w postaci prądu jonowego na sygnał elektryczny, który jest rejestrowany przez komputer w postaci widma stosunku masy do ładunku elektrycznego (m/z).

W spektrometrach mas stosowane są różne typy analizatorów. W TOF (ang. Time Of Flight) analizatorze wprowadzane jony są przyspieszane przy pomocy pola elektrycznego, następnie dryfują przez komorę wolną od pola elektrycznego, aby dotrzeć do detektora jonów, który jest połączony z urządzeniem rejestrującym czas od impulsu przyspieszającego do momentu uderzenia określonego jonu w detektor. Pomiar m/z jest oparty na fakcie, że czas przelotu zależy od prędkości jonu, a prędkość uzyskana przez jon w polu elektrycznym zależy od jego masy.

3. BADANIA BIOLOGICZNE

Zgodę na realizację badań i przeprowadzenie ich przy użyciu zwierząt doświadczalnych uzyskano od Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Uchwała 20/2012 z dn. 11.05.2012).

Do badań użyto białe szczury, szczepu Wistar o masie ciała ok. 200 g, pochodzące z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.1. Zasada metody

Izospiciformina, stizolina, stizolicyna - wyizolowane z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* oraz **ekstrakt metanolowy z badanego surowca** poddano badaniu biologicznemu.

Eksperyment miał na celu sprawdzenie zdolności poszczególnych związków i ekstraktu do hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi. Dodatkowo porównano aktywność biologiczną poszczególnych związków i ekstraktu z siłą działania partenolidu – germakanolidu o udowodnionym działaniu przeciwserotoninowym.

Z krwi szczurzej pozyskiwano frakcję wysokopłytkową (ang. Platelet Reach Plasma - PRP), do której dodawano roztwory poszczególnych związków (izospiciformina, stizolina, stizolicyna), wyciąg metanolowy z ziela *S. balsamitaefolius*, roztwór partenolidu oraz roztwór ADP. Partenolid służył jako wzorzec, ADP stanowił czynnik agregacyjny trombocytów, w wyniku którego uwolniona została serotonina z płytek krwi. Celem ilościowego określenia stężenie serotoniny w poszczególnych próbach użyto ultraczułego testu immunoenzymatycznego Serotonin Research ELISA™ BA E-5937 firmy Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG. Test przeznaczony jest dla różnych rodzajów próbek biologicznych i różnych objętości.

Pierwszym etapem było ilościowe acylowanie serotoniny przy użyciu płytki acylującej ACYLATION PLATE BA E-5934 zawierającej 1 x 96 studzienek gotowych do użycia, wstępnie pokrytych odczynnikami acylującym. Następnie użyty został konkretny zestaw 96 studzienek z płytki do mikromiareczkowania - SEROTONINE/5-HIAA

MICROTITER STRIPS BA E-0931, gdzie antygen jest związany z fazą stałą. Acylowane próby standardowe, kontrole, próbki badane i faza stała analitycznie konkurowały o połączenie z przeciwciałami. W momencie, gdy układ był w równowadze, wolne przeciwciała i wolne kompleksy antygen-przeciwciało zostały usunięte przez wypłukiwanie. Przeciwciała związane z fazą stałą tworzą koniugaty z przeciwciałami anti-rabbit IgG, które są koniugowane z peroksydazą (ENZYME CONJUGATE BA E-0040). Peroksydaza katalizuje reakcję barwną, której substratem jest TMB – tetrametylenobenzodyna (SUBSTRATE BA E-0055). Intensywność barwy w poszczególnych próbach monitorowano spektrofotometrycznie, mierząc absorbancję, przy długości fali $\lambda=450$ nm. Ilość serotoniny w nieznanach próbkach uzyskano przez porównanie absorbancji z krzywej wzorcowej przygotowanej na podstawie próbek standardowych, których stężenia zostały określone przez producenta.

3.2. Aparatura i sprzęt

- Wirówka
- Perkin Elmer Enspire Multimode Reader „Enspire”2300 – czytnik płytki ELISA

3.3. Odczynniki

- PBS (phosphate buffered saline) - firma Sigma
- 95% Etanol (Et-OH) - firma Sigma
- ADP - firma Sigma
- 0,9% NaCl - firma Sigma
- kwas acetylosalicylowy (ASA) - firma Sigma
- cytrynian trisodowy z probówek - firma Sigma
- odczynniki i roztwory z testu immunoenzymatycznego Serotonin Research ELISA BAE-5900 firmy Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG.:
 - ACYLATION PLATE BA E-5934 – płytka acylująca zawierająca 96 studzienek pokrytych odczynnikim acylującym

- próbki standardowe (STANDARDS) służące do wyznaczenia krzywej wzorcowej, zawierające określoną ilość serotoniny, rozcieńczane DILUENTEM
- próbki kontrolne (CONTROLS) służące do wyznaczenia krzywej wzorcowej
- DILUTION CONCENTRATE BA E-5941 – rozpuszczalnik rozcieńczany w wodzie destylowanej, zawierający 1% STABILIZER BA E-5937
- DILUENT – rozcieńczony wodą destylowaną DILUTION CONCENTRATE BA E-5941
- STABILIZER BA E-5937 - stabilizator chroniący serotoninę w próbach badanych, standardowych i kontrolnych przed oksydacyjną degradacją, utrzymuje pH na poziomie 6-7,4
- WASH BUFFER CONCENTRATE BA E-0030 - bufor przemywający rozcieńczany w wodzie destylowanej
- WASH BUFFER - rozcieńczony wodą destylowaną WASH BUFFER CONCENTRATE BA E-0030
- ENZYME CONJUGATE BA E-0040 – przeciwciała królicze anti-rabbit IgG koniugowane z peroksydazą
- SUBSTRATE BA E-0055 - roztwór TMB (tetrametylenobenzodyna)
- STOP SOLUTION BA E-0080 – roztwór 0,25M kwasu siarkowego
- SEROTONIN ANTISERUM BA E-5910
- ACYLATION BUFFER BA E-5911 – bufor acylujący
- SEROTONINE/5-HIAA MICROTITER STRIPS BA E-0931

3.4. Tok analizy

3.4.1. Otrzymywanie frakcji wysokopłytkowej (ang. Platelet Rich Plasma - PRP)

Krew pobierano od szczurów (10 samic szczepu Wistar) w ilości ok. 10 ml/osobnika do probówek z dodatkiem cytrynianu trisodowego w ilości 1 ml/10ml krwi i odwirowano (160 g, 10 min., następnie 500 g 10 min., w temp 37°C). Uzyskano PRP, gdzie średnia ilość płytek wynosiła: $1119 \times 10^3/\mu\text{l}$.

3.4.2. Przygotowanie roztworów związków badanych oraz roztworu z ekstraktem metanolowym z ziela *S. balsamitaefolius*

Poszczególne związki (izospiciformina, stizolina, stizolicyna, partenolid) oraz metanolowy wyciąg badanego surowca rozpuszczono w 95% etanolu (EtOH) celem uzyskania roztworu o stężeniu 20 mg/ml. Następnie 30 µl każdego z nich mieszano w 970 µl PBS (ang. phosphate buffered saline), aby otrzymać roztwory o stężeniu 0,6 mg/ml każdy.

3.4.3. Przygotowanie roztworu czynnika agregacyjnego

ADP rozpuszczono w 0,9% NaCl, uzyskano roztwór o stężeniu 1 mM/l.

3.4.4. Szczegółowy przebieg doświadczenia

460 µL PRP mieszano ze 100 µL roztworu zawierającego metanolowy wyciąg z surowca badanego lub ze 100 µL poszczególnych roztworów związków badanych. Następnie próbki mieszano przez 2 min. w temp. 37°C 1000 obr./min. Próbę kontrolną stanowiło 460 µl PRP mieszane z 100 µl 3% EtOH rozpuszczonego w PBS. Po 2 min. inkubacji dodawano czynnik agregacyjny ADP w ilości 40 µl do każdej z próbek badanych i próby kontrolnej. Wszystkie próby badane i próbę kontrolną mieszano przez kolejne 6 min. w temp. 37°C, 1000 obr./min. Następnie dodawano do każdej próby i kontroli 50 µl (14mM) kwasu acetylosalicylowego i 6 µl stabilizatora STABILIZER BA E-5937 z testu immunoenzymatycznego Serotonin Research ELISA™ BA E-5937 firmy Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG. Następnie analizowane próbki umieszczono w lodówce (temp. 2-8°C). Supernatant poszczególnych próbek badanych i kontroli w ilości 50 µl został poddany analizie. Jej celem było określenie stężenia serotoniny w każdej próbce i kontroli. Pomiaru dokonano przy użyciu testu immunoenzymatycznego Serotonin Research ELISA™ BA E-5937 firmy Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG.

Opis poszczególnych etapów testu Serotonin Research ELISA™ BA E-5937 firmy Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG. :

Do płytki acylującej zawierającej 96 studzienek odmierzone po 100 µl rozcieńczonych prób standardowych (STANDARDS) i po 100 µl rozcieńczonych prób kontrolnych (CONTROS) .

Próby zawierające badane związki i próbę kontrolną rozcieńczono roztworem DILUENTu celem otrzymania 100 μ l objętości. Następnie do każdej próby dodano 25 μ l buforu acylującego (ACYLATION BUFFER BA E-5911) i inkubowano płytę przez 30 min. w temp. 20 °C nieustannie mieszając. Kolejnym etapem było odpipetowanie każdej próby w ilości 100 μ l i umieszczenie w kolejnych studzienkach płytki SEROTONINE/5-HIAA MICROTITER STRIPS BA E-0931. Do każdej studzienki dodano 25 μ l SEROTONIN ANTISERUM BA E-5910 i przykryto specjalną folią ADHESIVE FOIL. Płytę inkubowano 20 godzin w temp. 2-8 °C. Po zdjęciu folii usunięto zawartość wszystkich studzienek przez odpipetowanie zawartości oraz przepłukano trzykrotnie każdą studzienkę używając roztworu WASH BUFFER. Dodatkowo osuszano płytę używając materiału absorbującego ciecz. Następnie do każdej studzienki dodano 100 μ l ENZYME CONJUGATE BA E-0040 i inkubowano przez 30 min. w temp. 20 °C nieustannie mieszając. Kolejnym etapem było odpipetowanie i usunięcie zawartość wszystkich studzienek oraz trzykrotne przepłukanie każdej studzienki używając roztworu WASH BUFFER. Unikając bezpośredniej ekspozycji na światło słoneczne dodano do każdej studzienki po 100 μ l roztworu SUBSTRATE BA E-0055 i inkubowano przez 30 min. w temp. 20 °C. Po tym czasie do każdej studzienki dodano po 100 μ l roztworu STOP SOLUTION BA E-0080, mieszano celem uzyskania homogennego roztworu i niezwłocznie odczytywano absorbancję każdej próby przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

V. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

A. Analiza fitochemiczna

1. Chromatografia kolumnowa ekstraktu chlorku metylenu z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* – izolacja i identyfikacja związków: A (balsaminy), B (8α -(4'-hydroksysenenecioyloksy)- 9α -hydroksypartenolidu)) i C (stizolicyny)

Ekstrakt z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* w ilości 5,42 g, naniesiono na kolumnę szklaną wypełnioną żelem krzemionkowym. Kolumnę przemywano mieszaniną chlorku metylenu i acetonu w stosunku 25:1, a następnie stopniowo zwiększano polarność układu przez wprowadzenie dodatkowych ilości acetonu (Tabela 3).

Tabela 3. Fazy rozwijające stosowane w chromatografii kolumnowej, wstępny rozdział związków występujących w ekstrakcie chlorku metylenu z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

Skład fazy rozwijającej	Proporcje rozpuszczalników (V/V)
Chlorek metylenu : aceton	25:1
Chlorek metylenu : aceton	20:1
Chlorek metylenu : aceton	15:1
Chlorek metylenu : aceton	12:1
Chlorek metylenu : aceton	10:1
Chlorek metylenu : aceton	5:1
Chlorek metylenu : aceton	3:1
Chlorek metylenu : aceton	2:1
Chlorek metylenu : aceton	1:1

W wyniku chromatografii uzyskano 78 frakcji, z których 3 okazały się chromatograficznie jednorodne. Oznaczono je symbolami A (frakcja nr 2), B (frakcja nr 65) i C (frakcja nr 76). Natomiast frakcje nr 15-45 oraz 59-62 przeznaczono do dalszego rozdziału. Kierowano się ilością i możliwością pozyskania dalszych pojedynczych związków.

1.1. Izolacja i identyfikacja związku A – balsamina

Frakcja nr 2 wykazywała tendencję do krystalizacji w mieszaninie eluującej z kolumny (chlorek metylenu – aceton 15:1). Po oddzieleniu rozpuszczalnika, pozostałą substancję przemyto chłodnym chlorkiem metylenu. Po osuszeniu uzyskano 35,6 mg substancji o temp. topnienia 225-228°C i oznaczono ją literą A.

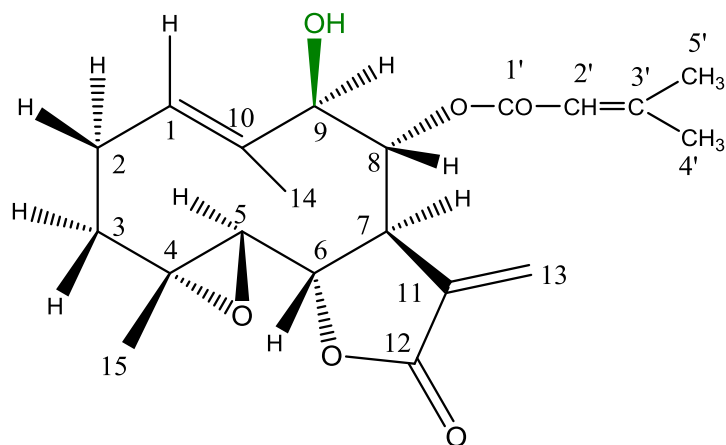
Analiza TLC wykazała, że otrzymany związek barwi się na kolor zielony (Rycina 51, str. 133); ($R_f=0,86$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CO}(\text{CH}_3)_2$ 8:1). Analiza ^1H NMR wykazała sygnały protonów charakterystyczne dla struktury germakranolidów z 4,5 epoksydem: sygnał protonu o wartości 5.66ppm przy C1, świadczy o podwójnym wiązaniu, singlety 1.80 ppm i 1.26 ppm wskazują na grupy metylowe w szkielecie laktonu seskwiterpenowego (odpowiednio przy C4 i C10). Na widmie związku A pojawiły się charakterystyczne sygnały: 4.36 ppm – co wskazuje na obecność grupy OH przy C9. Multipletowy sygnał protonu przy 5.66 ppm w estrze przy C8 (=CH-) i singlety o wartościach 1.56 ppm oraz 1.90 ppm wskazują na dwie grupy metylowe w estrze (Tabela 4).

Tabela 4. ^1H NMR balsaminy (600 MHz w CD_3Cl)

Proton	δ (ppm)	J (Hz)
1	5.66 m	
2a	2.20 bdd	6.0;12.9
2b	2.51 dddd	5.8;12.8
3a	2.20 d	6.5
3b	1.31 d	6.5
5	2.61 bd	9.5
6	4.33 dd	6.6;9
7	3.81 dd	3.3;6
8	4.57 d	3.7
9	4.36 s	
13a	6.28 d	3.5
13b	5.65 d	3.1
14	1.80 s	
15	1.26 s	
2'	5.66 m	
4'	1.56 s	
5'	1.90 s	

δ – przesunięcie chemiczne (ppm); J - stała sprzężenia (Hz); m- multiplet;
bdd – szeroki dublet dubletów; dd – dublet dubletów; s – singlet; m – multiplet

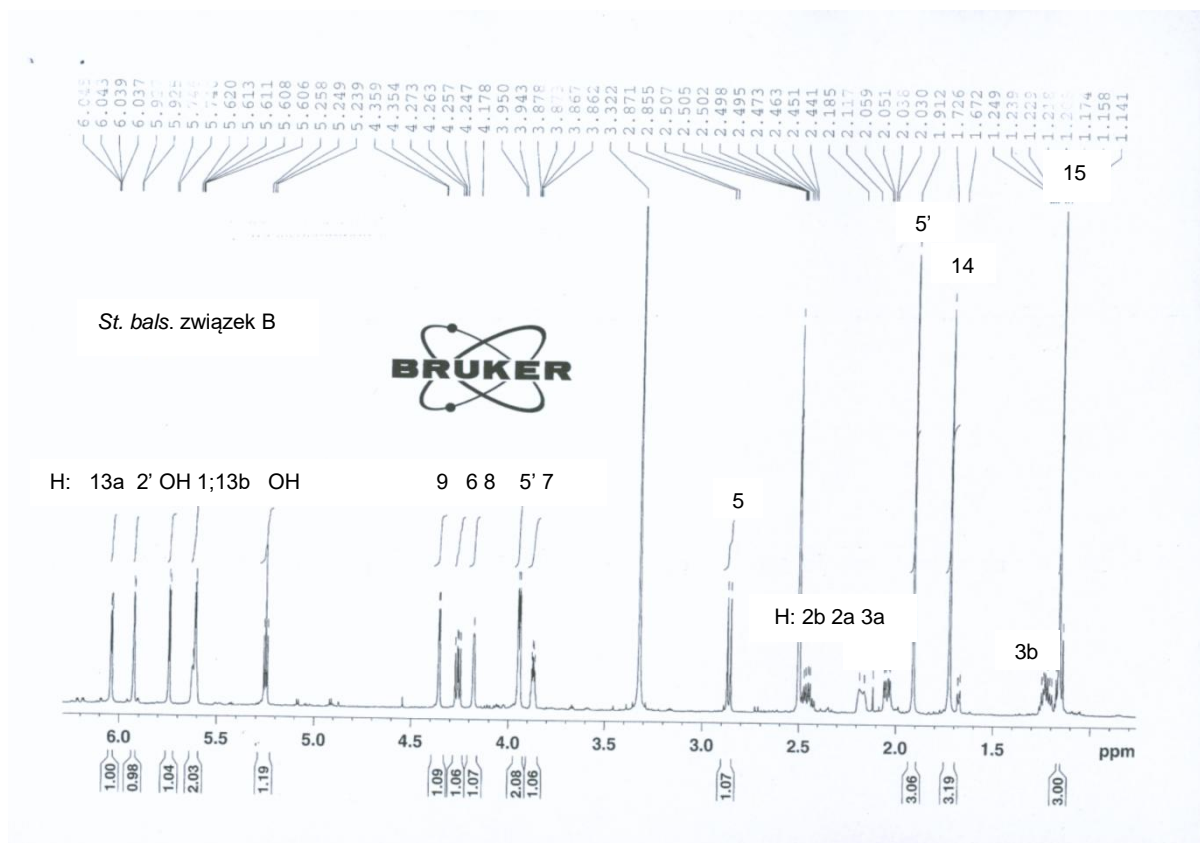
Wyniki TLC, temperatura topnienia i widmo ^1H NMR jednoznacznie wskazują, że związek A jest balsaminą (Rycina 18).



Ryc. 18 Struktura związku A – balsamina

1.2. Izolacja i identyfikacja związku B - (8 α -(4'-hydroksy-senecioloxy)-9 α -hydroksypartenolidu)

Fracja nr 65 wykazywała tendencję do krystalizacji. Po oddzieleniu mieszaniny chlorku metylenu i acetonu i osuszeniu substancji stałej (32,5 mg) zmierzono jej temperaturę topnienia – wynosiła 201-202°C. Kontrola TLC wykazała, że otrzymany związek barwi się na chromatogramach tak jak balsamina - na kolor zielony. Mogło to sugerować, że jest to związek z podstawnikami przy C9 i C8. Jednak problemem do rozwiązania była konfiguracja przestrzenna podstawnika przy C9 i budowa estru przy C8. Widmo ^1H NMR (Rycina 19, Tabela 5) wykazało charakterystyczne sygnały dla związku germakranolidowego. Obecność grup hydroksylowych i ich miejsca wykazano za pomocą widma związku rozpuszczonego w D_2O (Rycina 20). Hydroksyl przy 5.27 ppm w estrze jest tripletem (Rycina 19, Tabela 5), zatem sprzęga się z CH_2 (dublet przy 3.96 ppm z integracją na 2 protony). Po D_2O triplet przy 5,27 ppm znika (Rycina 20) a sygnał 3.96 ppm zmienia się w wąski dublet (Rycina 21), od sprzężenia z H winylowym, protonem przy 5.93 ppm (Rycina 20). Zatem w części alifatycznej występuje ugrupowanie CH_2OH . Grupa metylowa estru jest dubletem przy 1.91 ppm ($J=0.8$ Hz), jest to związane ze sprzężeniem z dwoma protonami w ugrupowaniu CH_2OH . Na podstawie tych danych można wysunąć jednoznaczny wniosek, że w pozycji C8 jest ugrupowanie 4-hydroksy-senecioloxy. Jest to zgodne z widmami HSQC i HMBC (Rycina 22) oraz NOESY (Rycina 23). Widmo to wskazywało też, że proton przy C9 koreluje z protonami β , co sugeruje, że grupy OH przy tym węglu ma konfigurację α (Rycina 24).



Ryc. 19 Widmo ^1H NMR związku B

**Tabela 5. ^1H NMR związku B
(600.20 MHz w DMSO)**

Proton	δ (ppm)	J (Hz)
1	5.61 m	
2a	2.17 m	
2b	2.45 ddd	
3a	2.04 dd	
3b	1.22 m	
5	2.86 d	(9.7)
6	4.26 dd	(6.5;9.7)
7	3.87 m	(6.5;9.7;3.1)
8	4.17 s	
9	4.35 d	(2.9)
13a	6.04 q	(3.5;1.0)
13b	5.61 q	(3.1;1.0)
14	1.75 s	
15	1.16 s	
2'	5.92 m (CH=)	
4'	1.91 d (CH ₃)	
5'	3.96 d (CH ₂ OH)	

**Tabela 6. ^{13}C NMR związku B
(150.20 MHz w DMSO)**

Węgiel ppm (J)	
1	123.67
2	23.11
3	35.44
4	60.48
5	65.37
6	80.95
7	39.57
8	74.07
9	76.24
10	134.44
11	134.38
12	169.29
13	123.71
14	16.80
15	16.93
16	166.26
17	65.06
18	161.11
19	111.55
20	15.32

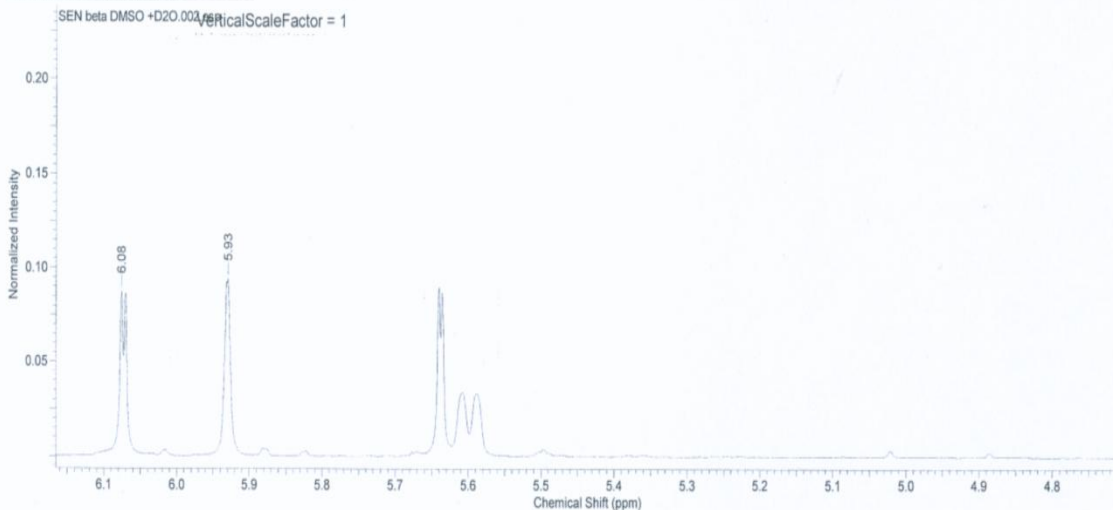
δ – przesunięcie chemiczne (ppm); J - stała sprzężenia (Hz)
 m – multiplet; ddd – dublet dubletów dubletów; dd
 dublet dubletów; d – dublet; q – kwartet; s – singlet

SENβ + D₂O

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

2015-04-16 11:08:44

Acquisition Time (sec)	3.4997	Comment	SEN beta DMSO widmo powtorzone w dniu dodania 2 kr. D2O (rejestracja natychmiast po dodaniu D2O) temp. 298K		
Date	10 Apr 2015 14:33:04	Date Stamp	10 Apr 2015 14:33:04		
File Name	C:\Documents and Settings\oem\Pulpit\SEN beta DMSO +D2O\2\fid	Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H
Number of Transients	64	Origin	spect	Original Points Count	23711
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	71.80
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2903.5911	SW(cyclical) (Hz)	6775.07
Temperature (degree C)	25.000	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	6774.86

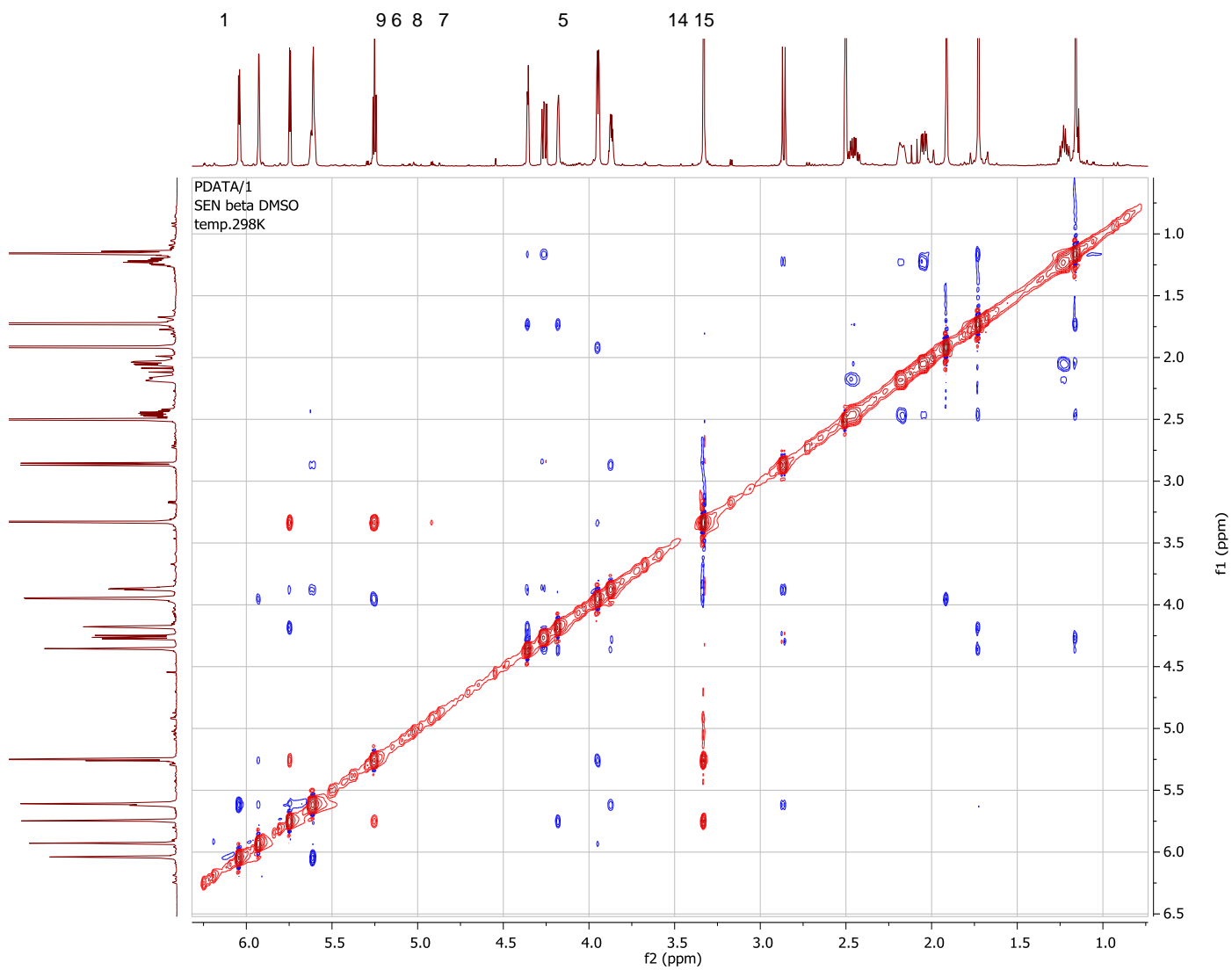


No.	(ppm)	Annotation	Layer No.	Created By	Created At	Modified By	Modified At
1	[2.53 . 2.56]	DMSO	1	oem	Cz 2015-04-16 11:05:10		

No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	5.93	3558.5	0.0943
2	6.08	3646.4	0.0876

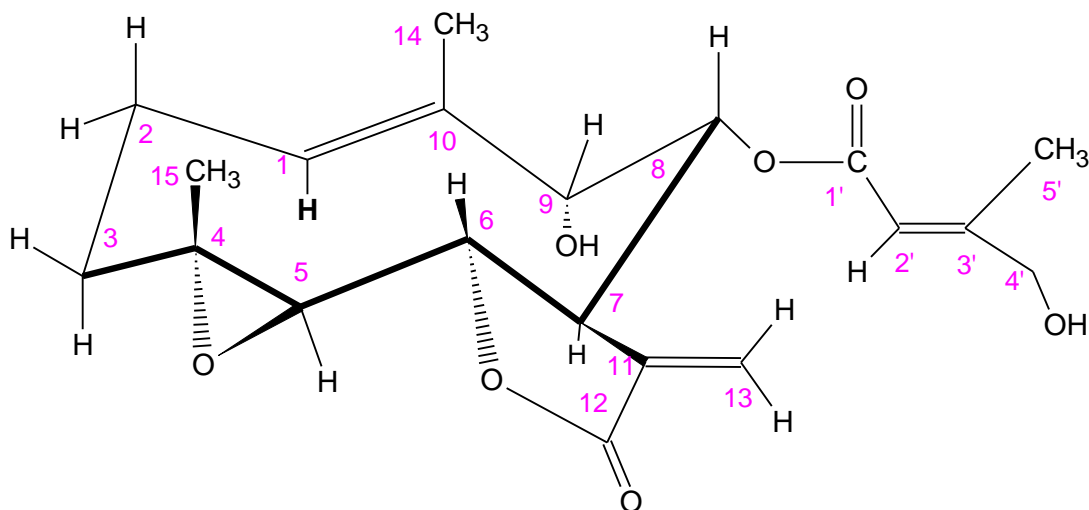
Ryc. 20 Widmo ¹H NMR związku B w D₂O

Ryc. 21 Widmo ^1H NMR związku B w D_2O (dalszy ciąg)



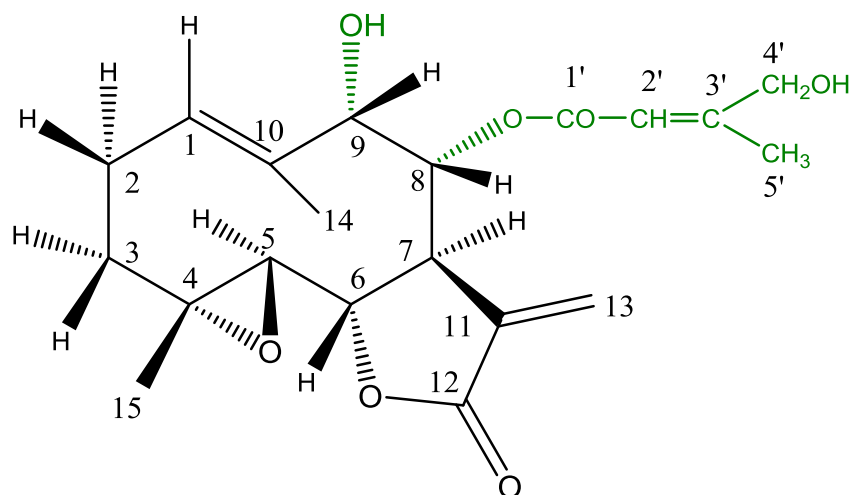
Ryc. 23 Widmo NOESY związku B – sprzężenia alfa/alfa i beta/beta

Korelacje z protonami beta: H-1 \rightarrow H-7; H-5 \rightarrow H-7; H-9 \rightarrow H-8 \rightarrow H-6



Ryc. 24 Wzór konformacyjny związku B

Otrzymany związek jest 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksy-9 α -hydroksypartenolidem (Rycina 25).



Ryc. 25 Struktura związku B - 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksy-9 α -hydroksypartenolid

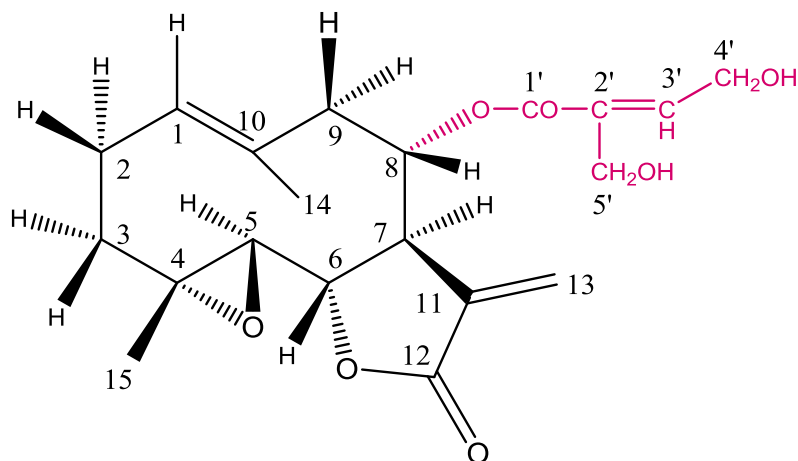
1.3. Izolacja i identyfikacja związku C – stizolicyna

Fracja nr 76 krystalizowała w mieszaninie eluującej. Po usunięciu rozpuszczalnika uzyskano 342,9 mg krystalicznej substancji, która na kontrolnych chromatogramach wybarwiała się na kolor purpurowy (Rycina 51, str. 133); ($R_f=0,07$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CO}(\text{CH}_3)_2$ 8:1). Jej temperatura topnienia wynosiła 143-144°C. Analiza ^1H NMR wykazała brak grupy tlenowej przy C9 – obecność dwóch protonów przy tym węglu. Odnotowano też, że w estrze występuje podwójne wiązanie (6.02 ppm) i dwie grupy CH_2OH (Tabela 7). Wszystkie analizy związku C sugerowały jednoznacznie, że jest to stizolicyna (Rycina 26).

Tabela 7. ^1H NMR stizolicyny (600.20 MHz w CD_3OH)

Proton	δ (ppm)	J (Hz)
1	5.46 bdd	
2a	2.25 bd	
13.6		
2b	2.52 m	
13.5		
3a	1.29 m	
3b	2.13 dd	
12.9		
5	2.85d	
9.3		
6	4.38 ddd	
7	3.30 t	
8	4.57 bdd	
9a	2.70 t	11.8
9b	2.47 bd	12.1
13a	5.80 d	3.0
13b	6.20 d	3.4
14	1.82 bs	
15	1.28 bs	
3'	6.02 s	
4'	4.16 s	
5'	2.02 s	

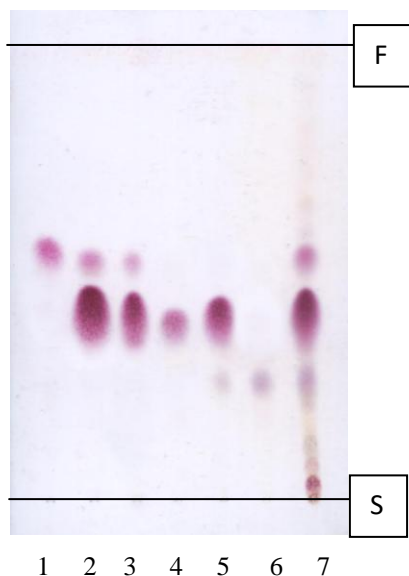
δ – przesunięcie chemiczne (ppm); J - stała sprzężenia (Hz)
bdd – szeroki dublet dubletów; m – multiplet; bs – szeroki singlet;
t– triplet; s - singlet



Ryc. 26 Struktura związku C - stizolicyna

2. Rechromatografia frakcji 15-45 - izolacja i identyfikacja związków D (izospiciformina), E (stizolina) i F (9 α -hydroksypartenolid)

Frakcje 15-45 połączono. Uzyskano próbkę w ilości 47mg, zawierającą trzy dominujące związki. Naniesiono ją na kolumnę z żelem krzemionkowym. Kolumnę wmywano mieszaniną heksan – octan etylu 5:1, stopniowo zwiększając polarność układu przez dodawanie octanu etylu. W wyniku rozdzielania uzyskano 6 podfrakcji z których trzy były chromatograficznie jednorodne. Zawarte w nich związki oznaczono symbolami D (podfrakcja 1), E (podfrakcja 4) i F (podfrakcja 6). Dwuplamowe podfrakcje 2 i 3 okazały się jednakowe, zawierały związki D i E. Połączono je i zabezpieczono do ewentualnego ponownego rozdzielania. Krystaliczna podfrakcja 5 była również dwuplamowa, w której zdecydowanie dominował związek E. Poddano ją rekrystalizacji w mieszaninie aceton – chlorek metylenu w proporcji 1:2. Uzyskano chromatograficznie jednorodną substancję i połączono ją z identyczną chromatograficznie podfrakcją 4 (Rycina 27).



Adsorbent: żel krzemionkowy
Układ rozwijający: heksan – octan etylu 1:1
Wywoływacz: odczynnik anyżowy
1-6. uzyskane w wyniku rechromatografii podfrakcje
7. rozdzielana frakcja (frakcje:15-45)
F – front, S - start

Ryc. 27 Wyniki rechromatografii frakcji nr 15-45

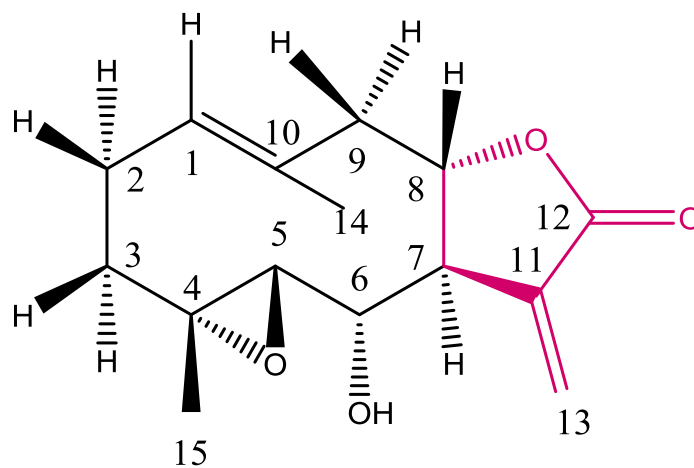
2.1. Izolacja i identyfikacja związku D – izospiciformina

Podfrakcja 1 zawierała związek krystalizujący w mieszaninie aceton – chlorek metylenu w proporcji 1:2, uzyskano 98,9 mg substancji. Jej temperatura topnienia wynosiła 192-195°C. Na kontrolnych chromatogramach związek D barwił się na kolor purpurowy (Rycina 51, str. 133); ($R_f=0,59$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CO}(\text{CH}_3)_2$ 8:1). Analiza ^1H NMR wykazała, że jest to germakranolid z 7,8 pierścieniem laktonowym (Tabela 8) i grupą hydroksylową przy C6. Wszystkie analizy wykazały, że otrzymany związek jest izospiciforminą (Rycina 28).

Tabela 8. ^1H NMR izospiciforminy (600.20 MHz w CD_3OH)

Proton	δ (ppm)	J (Hz)
1	5.36 bs	
2a	1.21 dd	
2b	0.98 dd	
3a	2.13 m	
3b	1.34 m	
5	2.66 d	8.9
6	3.44 t	9.3
7	3.00 bs	
8	4.12 dd	7.1;14.3
9	2.84 m	
9		
13a	6.46 dd	
13b	6.28 dd	
14	1.79 s	
15	1.28 s	

δ – przesunięcie chemiczne (ppm); J - stała sprzężenia (Hz)
 bdd – szeroki dublet dubletów; m – multiplet; bs – szeroki singlet;
 t– triplet; s - singlet



Ryc. 28 Struktura związku D - izospiciformina

2.2. Izolacja i identyfikacja związku E – stizolina

Połączone podfrakcję 4 i 5 (po rekrytalizacji) rozpuszczono w 4 cm³ acetonu i dodano podwójną ilość chlorku metylenu. Po ochłodzeniu w ciągu 12 godzin pojawiły się kryształy w postaci płytek. Po ich oddzieleniu od rozpuszczalników i osuszeniu uzyskano 176,1 mg substancji o temp. topnienia 183-188°C. Na kontrolnych chromatogramach barwiła się ona na kolor purpurowy (Rycina 51, str. 133); ($R_f=0,54$ CH₂Cl₂ – CO(CH₃)₂ 8:1). Na widmach ¹H NMR pojawiły się charakterystyczne sygnały protonów świadczące o braku podstawnika na C9 (sygnały dwóch protonów przy tym węglu) i obecność grupy tlenowej przy C8 (3.88 ppm). Ta wartość przesunięcia chemicznego i brak sygnałów protonów wskazujących na obecność estru przy C8 wskazywała na obecność grupy hydroksylowej przy tym węglu (Tabela 9). Spostrzeżenia z wszystkich wykonanych analiz pozwalały wysunąć wniosek, że otrzymanym związkiem E jest stizolina (Rycina 29).

Tabela 9. ¹H NMR stizoliny (600.20 MHz w CD₃OH)

Proton	δ(ppm)	J(Hz)
1	5.25 bd	12.0
2a	2.43 dd	12.1
2b	2.15 dd	3.3
3a	2.23 bd	
3b	1.24 ddd	
5	2.57 bd	12.5
6	3.98 t	7.4;14.8
7	3.09 mt	
8	3.88 dt	2.2;7.2;12.4;9.9
9	2.73d	8.1
9	2.43 ddd	7.5;5.8
13a	6.50 d	3.1
13b	6.16 d	2.4
14	1.76 s	
15	1.28 s	

δ – przesunięcie chemiczne (ppm); J - stała sprzężenia (Hz)
bdd – szeroki dublet dubletów; m – multiplet; bs – szeroki singlet;
t – triplet; s – singlet

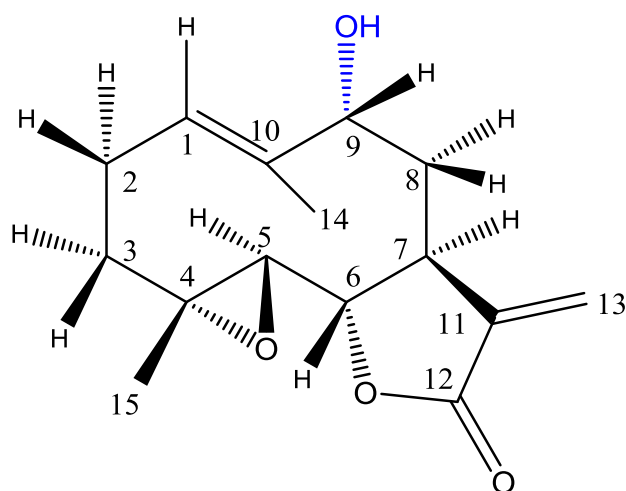
2.3. Izolacja i identyfikacja związku F – 9 α -hydroksypartenolid

Następny krystaliczny związek otrzymano z podfrakcji 6. Krystalizował on z mieszaniny chlorek metylenu – eter etylowy w proporcji 1:2. Otrzymano 7,2 mg substancji o temp. top. 140-142°C. Barwiła się ona na kontrolnych chromatogramach na kolor fioletowy ($R_f=0,45$ CH₂Cl₂ – CO(CH₃)₂ 8:1). Związek oznaczony symbolem F na widmie ¹H NMR wykazywał charakterystyczne sygnały protonów świadczące o tym, że jest on germakranolidem z 4,5 epoksydem i posiada charakterystyczne elementy struktury: alfa hydroksyl na C9 (sygnał protonu przy tym węglu o wartości 4.38 ppm) i brak estru na C8 (sygnały dwóch protonów przy C8) (Tabela 10). Wszystkie analizy świadczą, że otrzymany związek F jest 9 α -hydroksypartenolidem (Rycina 30).

Tabela 10. ¹H NMR 9 α -hydroksypartenolid (600.20 MHz w CD₃Cl)

Proton	δ (ppm)	J (Hz)
1	5.62 d	10.5
2a	2.49 ddd	6.1;2.1
2b	1.90 dd	6.9;6.9
3a	2.21	6.1
3b	1.62 m	
5	2.75 bd	9.1
6	3.85 ddd	8.4
7	3.41 m	
8a	2.28 dd	2.1
8b	1.41 m	2.1
9	4.34 bd	5.6
13a	6.32 d	3.8
13b	5.65 d	3.3
14	1.71 s	
15	1.30 s	

δ – przesunięcie chemiczne (ppm); J - stała sprzężenia (Hz)
bdd – szeroki dublet dubletów; m – multiplet; bs – szeroki singlet;
t – triplet; s - singlet



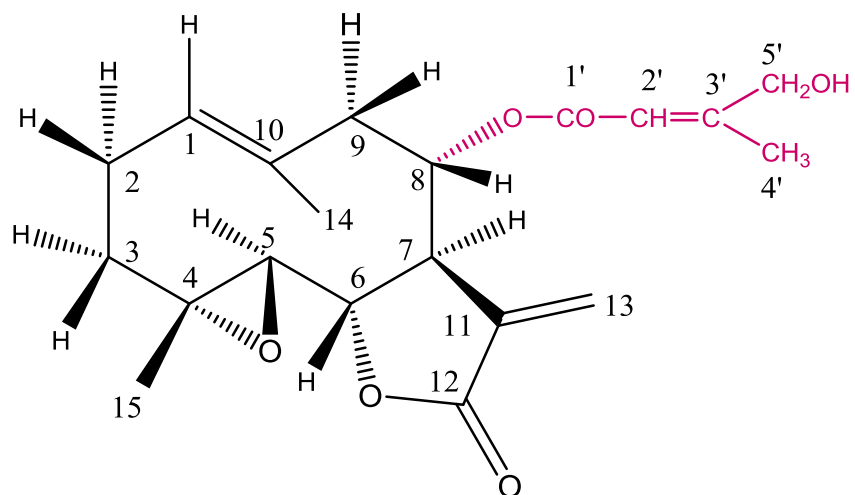
Ryc. 30 Struktura związku F – 9 α -hydroksypartenolid

3. Rechromatografia frakcji nr 59-62 izolacja związku G - 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksypartenolidu

Fracje 59-62, z dominującym związkiem oczyszczano na kolumnie z żelem krzemionkowym wymywając go mieszaniną heksan – octan etylu 4:1, stopniowo (co ok. 250 cm³ układu) zwiększając polarność układu. W wyniku rozdziału uzyskano trzy podfrakcje z których jedna zawierała poszukiwany związek. Oznaczono go symbolem G. Pozostałe dwie podfrakcje uznano za nieistotne dla oceny składu chemicznego badanej rośliny.

3.1. Identyfikacja związku G

Otrzymany związek krystalizował w mieszaninie eluującej. Otrzymano 2,1 mg substancji o temperaturze topnienia 188-190°C. Barwiła się ona na kolor purpurowy (Rycina 51, str. 133); ($R_f=0,18$; CH₂Cl₂ – CO(CH₃)₂ 8:1). Na widmie ¹H NMR wyraźne były sygnały protonów alifatycznych: 6.02 ppm (singlet) wskazuje na ugrupowanie =CH, 4.16 ppm (singlet) na obecność ugrupowania CH₂OH i singlet o wartości 2.02 ppm sugeruje obecność grupy metylowej. Obraz większości sygnałów pozostałych protonów był nieczytelny. Wynikało to ze zbyt małej ilości próbki i prawdopodobnie z zanieczyszczeń. Purpurowa barwa związku może sugerować brak podstawnika na C8. Zatem struktura związku G może być zgodna z Ryciną 31.



Ryc. 31 Sugerowana struktura związku G - 8 α -(4'-hydroksy)seneciolyloksypartenolid

4. Chromatografia ekstraktu octanu etylu z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* – izolacja związku H

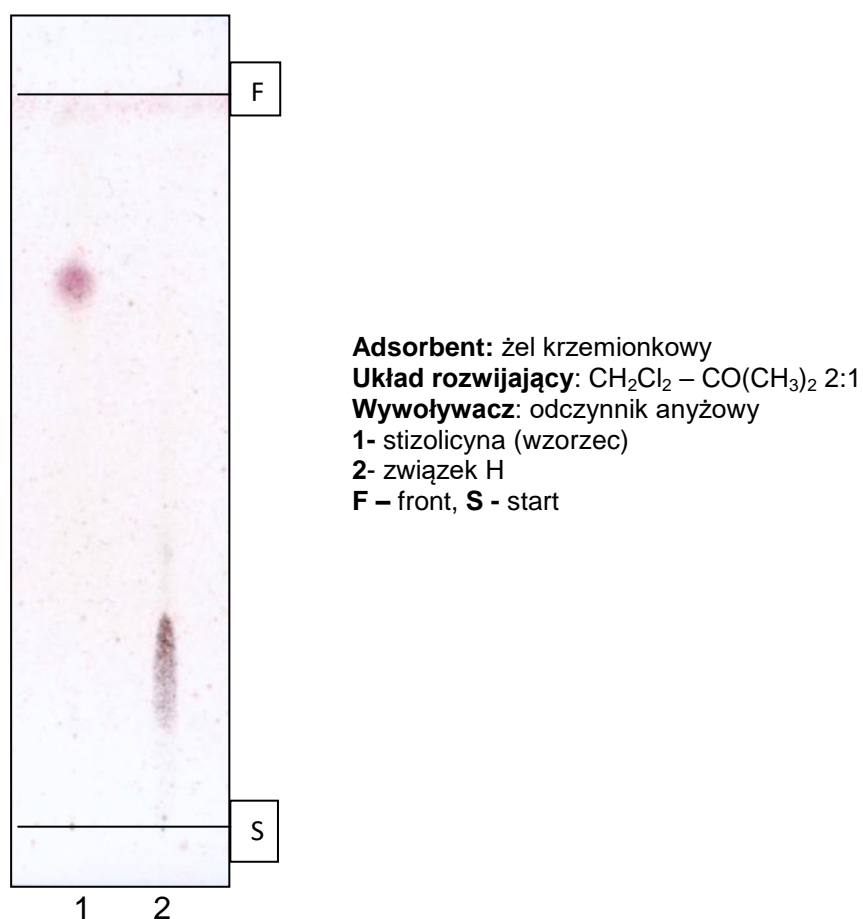
1,07 g ekstraktu octanu etylu nałożono na kolumnę z żelem krzemionkowym. Kolumnę wmywano mieszaniną chlorek metylenu - aceton 4:1 zwiększając polarność układu do proporcji 1:2. W wyniku rozdzielu uzyskano 2 frakcje, które przeznaczono do rechromatografii celem ich oczyszczenia. Pozostałymi frakcjami, które były w mniejszym stężeniu dalej się nie zajmowano.

4.1. Rechromatografia frakcji 2 wyciągu octanu etylu – izolacja związku H

123,7 mg frakcji 2 nałożono na żel krzemionkowy i wmywano ją mieszaniną chlorek metylenu – metanol od 25:1 do 10:1. Otrzymano 73,1 mg chromatograficznie jednorodnej substancji, której nie udało się uzyskać w formie krystalicznej.

4.1.1. Identyfikacja związku H - senecian (3,3-dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4-dihydroksyfenylopropanolu

Bezpostaciowy związek H wybarwił się na kontrolnych chromatogramach na kolor czarny (Rycina 32). Wartości R_f ($R_f=0,3$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CO}(\text{CH}_3)_2$ 2:1) badanego związku w układzie rozwijającym z metanolem sugerowały na połączenie cukrowe. Analizy spektralne potwierdziły te sugestie, ale wykluczyły strukturę laktonu seskwiterpenowego. Podjęto próbę identyfikacji związku oznaczonego symbolem H stosując wszelkie stosowne do tego celu analizy.



Ryc. 32 Chromatogram związku H

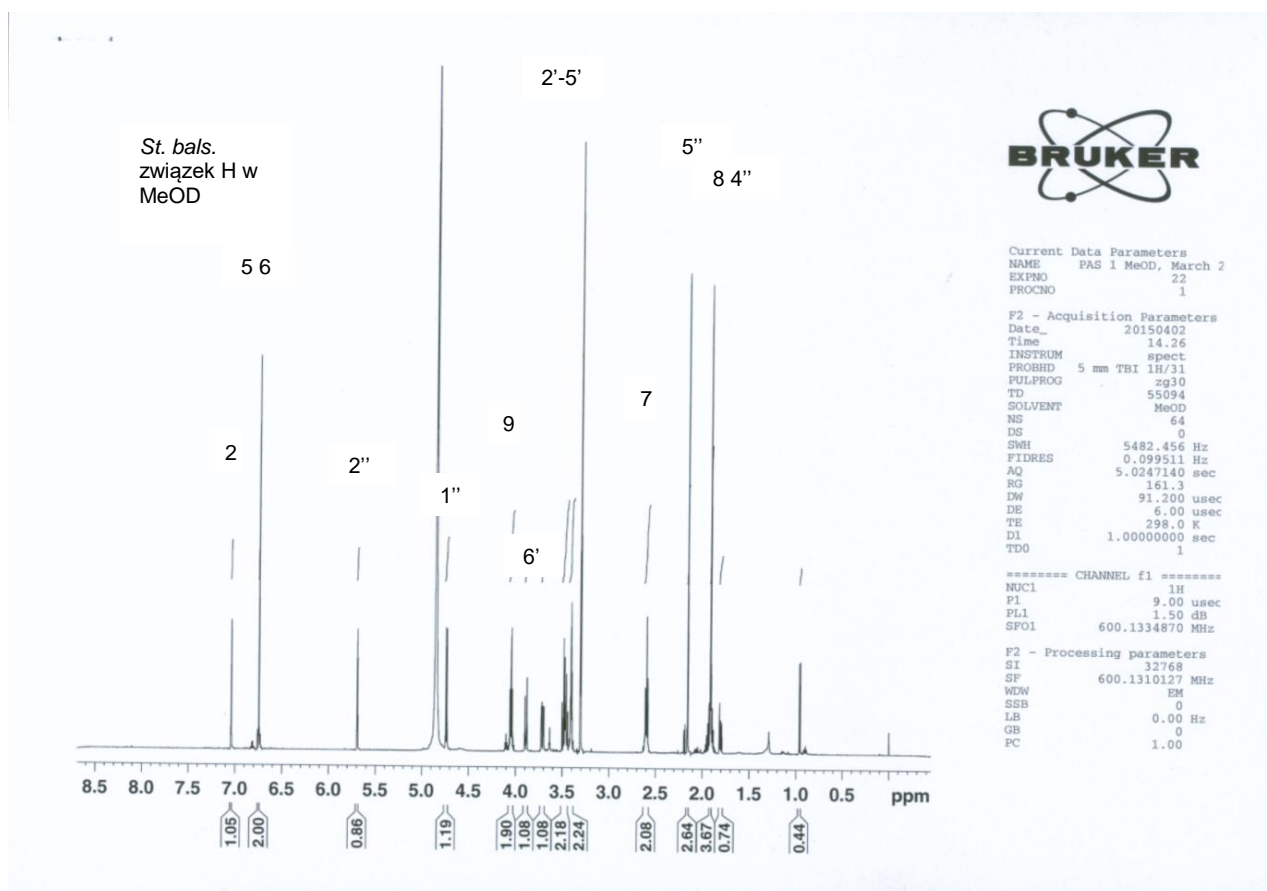
Na jego widmie ^1H NMR (Tabela 11, Rycina 33) widoczne są sygnały 23 atomów wodoru. W niskim polu występują sygnały trzech protonów aromatycznych: przy C2 - 7.04 ppm jako dublet o stałej sprzężenia $J=1.5$ Hz na skutek sprzężenia ze znajdującym się w pozycji *meta* protonem przy C6- 6.738 ppm, który jest dubletem dubletów na skutek dodatkowego sprzężenia, $J=8.1$ Hz, ze znajdującym się w pozycji *orto* protonem przy C5 - 6.753 ppm (dublet, $J=8.1$ Hz). Sygnały te wskazują na 1,3,4-trójpodstawiony pierścień benzenowy, a *meta*-sprzężone protony są w pozycjach C-2 i C-6, natomiast *orto*-sprzężone – w C-6 i C-5.

W wyższym polu widma ^1H NMR widoczny jest sygnał protonu anomerycznego cukru przy C1' (4.74 ppm), jako dublet o stałej sprzężenia $J=7.4$ Hz, od którego w widmie HH-COSY rozpoczyna się sekwencja kolejno sprzężonych sygnałów 4 protonów metynowych (H-2'-H-5') w zakresie 3.49-3.40 ppm o dużych stałych sprzężenia, $J=7.4 - 9.1$ Hz, wskazujących na ich konfigurację *trans*-aksjalną, zakończoną grupą hydroksymetylenową (H-6') - 3.89 ppm (dd) i 3.40 ppm (dd). Dane te wskazują na obecność reszty glukozylovej w formie piranozowej (glukopiranozylowej). W alifatycznym zakresie widma ^1H NMR (Rycina 33, Tabela 11) widoczne są sygnały trzech grup metylenowych (CH_2), których sekwencja według pików korelacyjnych w widmie HH-COSY jest następująca: 4.05 ppm i 4.045 ppm (C9) (dwa triplety na skutek zahamowanej rotacji), 1.92 (multiplet) przy C8 i 2.60 ppm przy C7 (triplet), i które wskazują na obecność w cząsteczce związku układu n-propanu. Ponadto, w widmie ^1H NMR widoczny jest sygnał olefinowego protonu przy C2'' - 5.69 ppm rozszczepionego na multiplet na skutek sprzężenia dalekiego zasięgu (widocznego w widmie HH-COSY) z dwoma grupami metylowymi, których sygnały przy C5'' (2.15 ppm) i przy C4'' (1.91 ppm) są dubletami o stałej sprzężenia $J=1.3$ Hz. Wymienione sygnały wskazują na obecność reszty acylowej – reszty kwasu seneciowego (kwas 3,3-dimetyloakrylowy).

Przypisania sygnałów w widmie ^{13}C NMR (Rycina 35, Tabela 11) dla atomów węgla podstawionych atomami wodoru dokonano za pomocą widma HSQC (Rycina 36), a przypisania sygnałów pozostałych węgli uzyskano na podstawie korelacji w widmie HMBC (Rycina 36, Tabela 11).

Według widma HMBC reszta glukozylovej przyłączona jest przez atom tlenu do atomu węgla δ_{C} 146.6 w pozycji C-3 pierścienia benzenowego, ponieważ sygnał

protonu anomerycznego H-1' glukozy znajduje się w pobliżu protonu aromatycznego δ_H 7.04 z pozycji C2, na co wskazuje korelacja w widmie NOESY (Rycina 37) pomiędzy tymi protonami. Duża stała sprzężenia sygnału H-1', $J=7.4$ Hz, wskazuje na konfigurację β . Stąd, w pozycji C4 układu benzenu (atom węgla δ_C 146.7) musi znajdować się grupa hydroksylowa (OH). Układ propanu przyłączony jest do węgla C1 pierścienia benzenowego na co wskazują korelacje między H-2, a węglem δ_C 32.5 (C-7) oraz korelacje NOESY pomiędzy H-2 (δ_H 7.04), a H-7 (δ_H 2.60). Do drugiego końca łańcucha n-propanu, w pozycji C-9 (δ_C 64.04) przyłączona jest grupa senecioksylova (O-seneciolylova) na co wskazuje w widmie HMBC korelacja pomiędzy sygnałami protonów grupy metylenowej z pozycji C-9 (δ_H 4.04), a sygnałem węgla grupy karbonylowej δ_C 168.42 reszty seneciolylowej (Rycina 36).



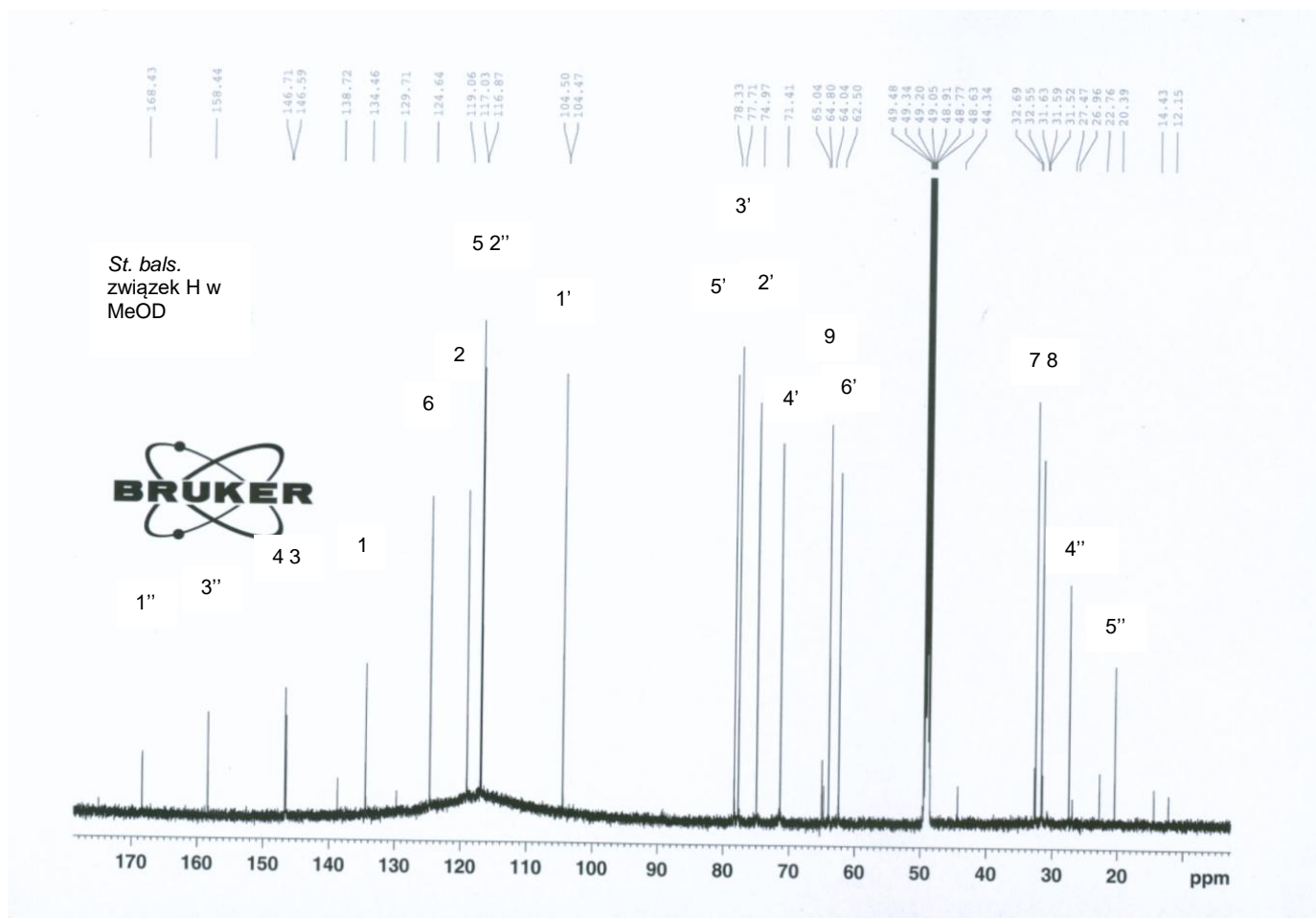
Ryc. 33 Widmo ^1H NMR związku H

Tabela 11. Dane spektralne NMR dla związku H w porównaniu z 3-O-β-D-glukopiranozyd 3,4-dihydroksyfenylopropanolu

Atom	Związek H				3-O-β-D-glukopiranozyd 3,4-dihydroksyfenylopropanolu [1]	
	δ _C węgiel ppm (150 MHz w CD ₃ OH)	δ _H proton ppm (600 MHz CD ₃ OH)	HMBC (H→C)	NOESY (H→H)	δ _C (125 MHz w pirydynie)	δ _H (500 MHz w pirydynie)
Aglikon						
1	134.46	-			134.25	-
2	119.05	7.04, d (1.5)	1,3,4,6,7	7, 8, 1'	120.14	7.55 d (2.0)
3	146.58	-			146.63	-
4	146.70	-			147.55	-
5	117.03	6.753, d (8.1)	1,3,4		117.12	7.21 d (8.5)
6	124.64	6.738, dd (1.5, 8.2)	1,4,7	7	124.53	6.99 dd (8.5, 2.0)
7	32.55	2.60 t (7.5) (2H)	1,2,6,8,9	6	32.05	2.77 t (7.5) (2H)
8	31.63	1.92 m (2H)	1,7,9		35.62	2.00 dddd (6.5, 6.5, 7.5, 7.5) (2H)
9	64.04	4.049 t (6.5) (1H)*	7	8	61.34	3.84 brt (6.5) (2H)
		4.045 t (6.5) (1H)*				
Glukozył						
1'	104.47	4.74 d (7.4)	3	2, 3', 5'	105.09	5.47 (d, 7.5)
2'	75.00	3.49 dd (7.4, 9.1)			75.11	} 4.26-4.34 (m)
3'	77.71	3.46 t (9.1)			78.35	
4'	71.40	3.40 m			71.19	} ? (nie podano)
5'	78.33	3.41 m			79.02	
6'	62.50	3.89 dd (1.7, 12.1)			62.27	4.53 dd (2.0, 12.1)
		3.71 dd (5.2, 12.1)				4.40 dd (5.0, 12.1)
Acyl						
1''	168.42	-				
2''	116.87	5.69 qq (1.3)	1'',4'',5''	4''		
3''	158.43	-				
4''	27.47	1.91 d (1.3) (3H)	2'',3'',5''			
5''	20.39	2.15 d (1.3) (3H)	1'',2'',3'',4''			

* dwa sygnały grupy metylenowej na skutek zahamowanej rotacji; stosunek rotamerów ok. 1:1. Odległość między tripletami – 2 Hz jest za mała na sprzężenie geminalne w przypadku nierównocennych protonów; [1] wg Toru et al., 2001; δ – przesunięcie chemiczne (ppm); J - stała sprzężenia (Hz) m – multiplet; bs – szeroki singlet; t – triplet; s – singlet; d – dublet; qq – kwartet kwartetów.

Ryc. 34 Widmo 2D związku H



Ryc. 35 Widmo ^{13}C NMR związku H

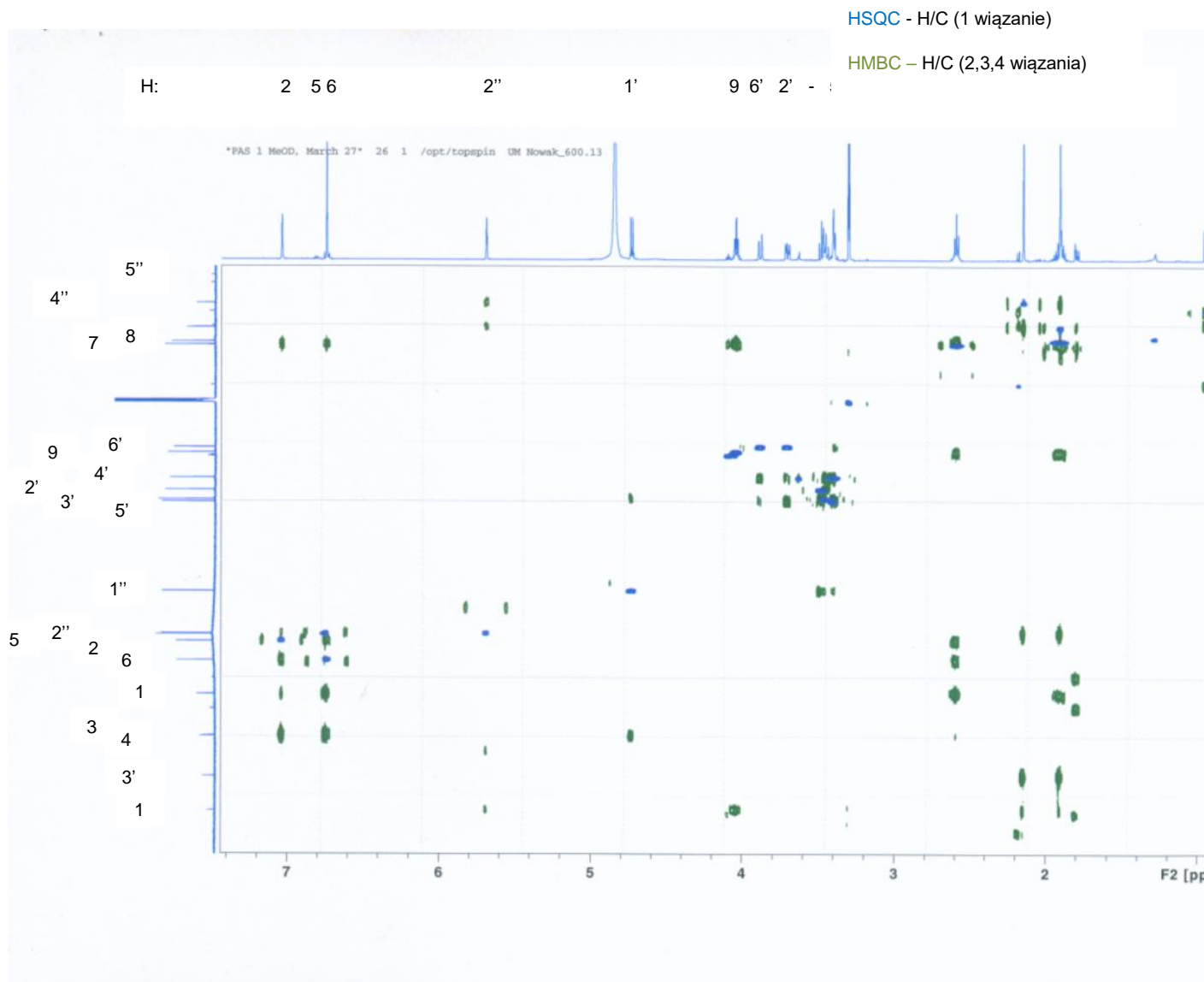
Na wzór sumaryczny związku $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_9$ oraz jego dokładną masę cząsteczkową monoizotopową wskazują w wysokorozdzielczym widmie masowym HR-TOF-ESI-MS w trybie jonów dodatnich (Rycina 38) sodowany jon molekularny $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 435.1631 oraz protonowany jon molekularny $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 413.1812.

W niskorozdzielczym widmie masowym LR-ESI-MS w trybie jonów ujemnych (Rycina 39) występuje deprotonowany jon molekularny $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 411 oraz jon fragmentacyjny powstały w wyniku odszczepienia reszty glukozylovej przy m/z 249 ($[\text{M}-\text{H}-162]^-$).

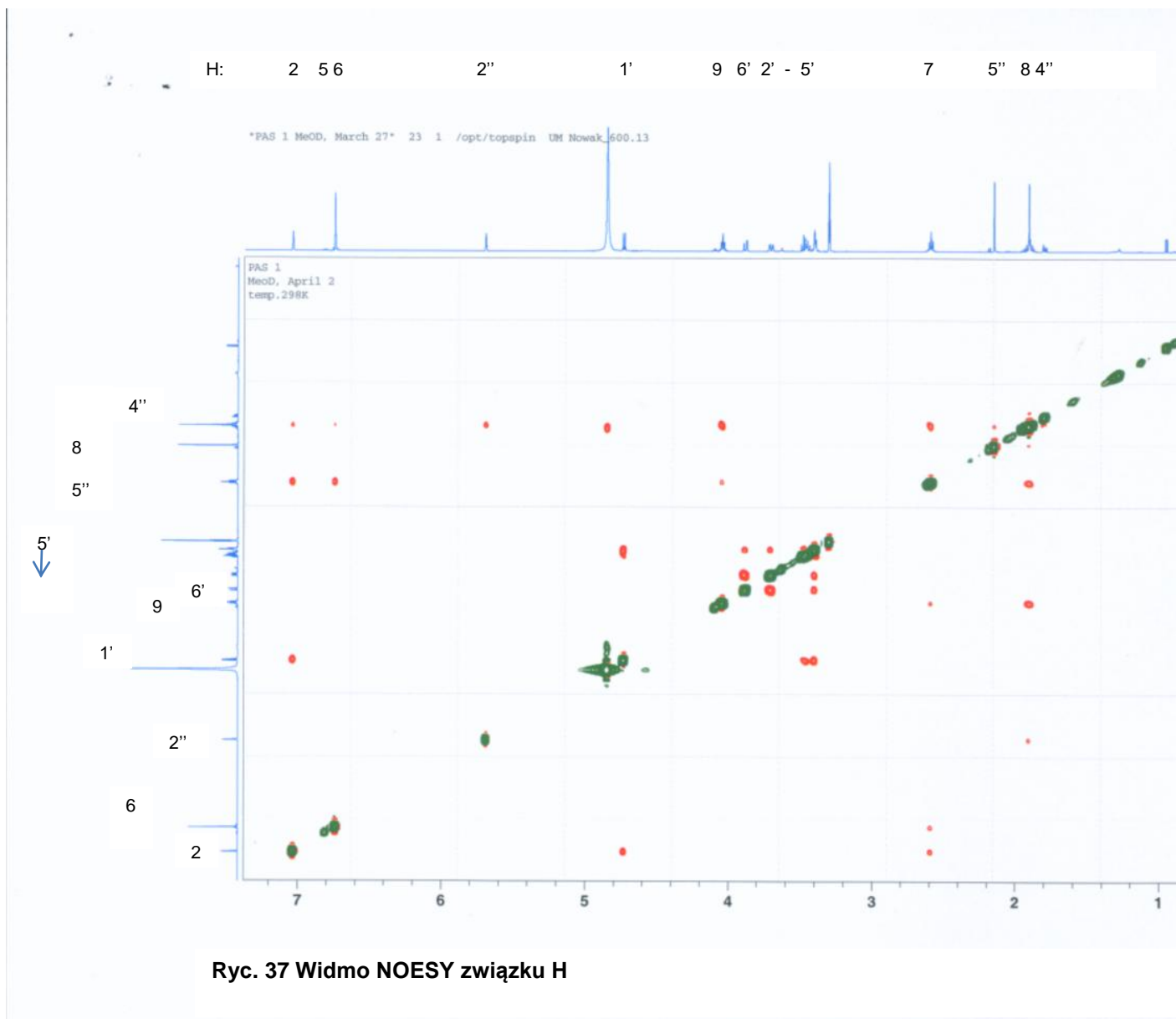
W widmie otrzymanym przez jonizację elektronową (ESI-MS) występują tylko jony fragmentacyjne w wyniku utraty glukozy i kwasu seneciowego -m/z 250 $[\text{M}-\text{glukozy}]^+$

([M-162]⁺), m/z 168 [M+H-senecioly]⁺ ([M+H-83]⁺) oraz m/z 150 [M+H-glukozyli-O-senecioly]⁺ i inne mniejsze fragmenty.

Widma niskorozdzielcze ESI-MS związku H (Rycina 39), zarówno w trybie jonów ujemnych i trybie jonów dodatnich w pełni potwierdzają postulowaną strukturę. W widmie jonów dodatnich są addukty z sodem. Widmo w trybie jonów ujemnych jest bardziej klarowne - jest tu jon molekularny - [M-H] - m/z 411 oraz jon fragmentacyjny [M-glukozyli-H] - m/z 249.



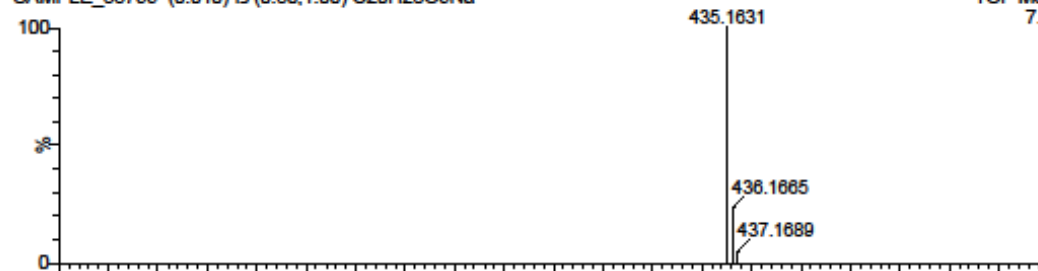
Ryc. 36 Widmo HSQC i HMBC związku H



data: 12-Nov-2015, godz.: 10:13:15, próbka: Pas 1 + sacharoza

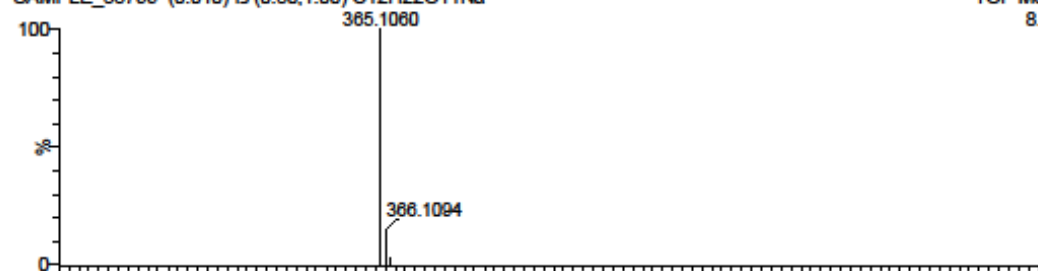
SAMPLE_33799 (0.010) Is (0.30,1.00) C₂₀H₂₈O₉Na

TOF MS ES+
7.81e12



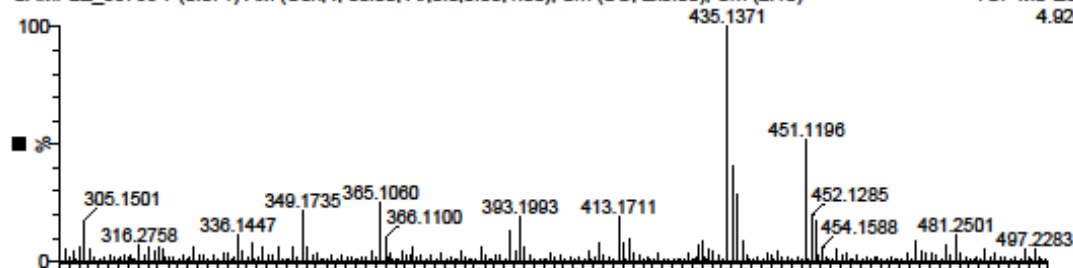
SAMPLE_33799 (0.010) Is (0.30,1.00) C₁₂H₂₂O₁₁Na

TOF MS ES+
8.50e12



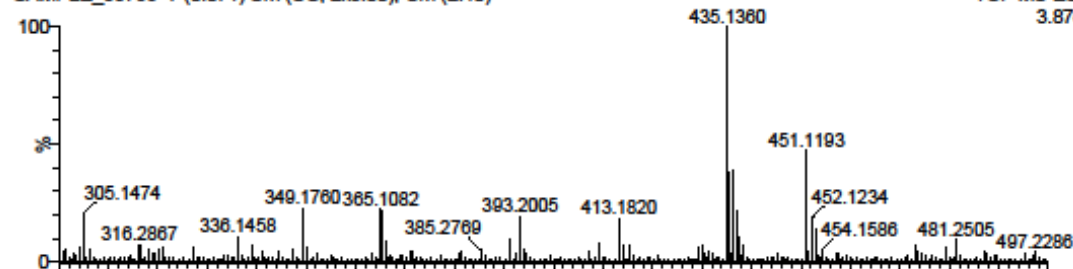
SAMPLE_33799 7 (0.071) AM (Cen,4, 80.00, Ar,0.0,0.00,1.00); Sm (SG, 2x3.00); Cm (2:10)

TOF MS ES+
4.92e4



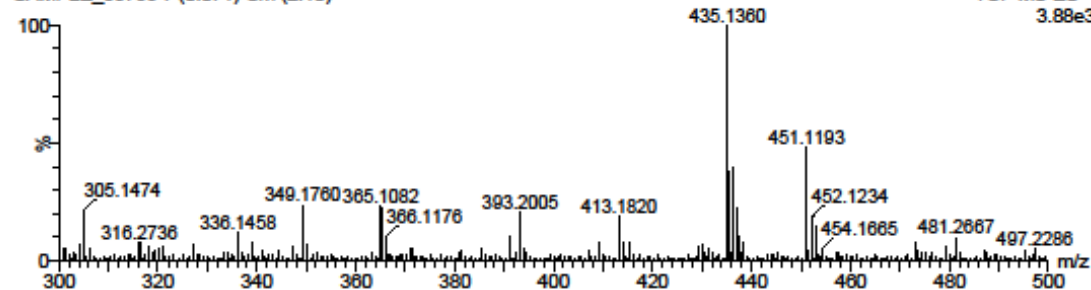
SAMPLE_33799 7 (0.071) Sm (SG, 2x3.00); Cm (2:10)

TOF MS ES+
3.87e3

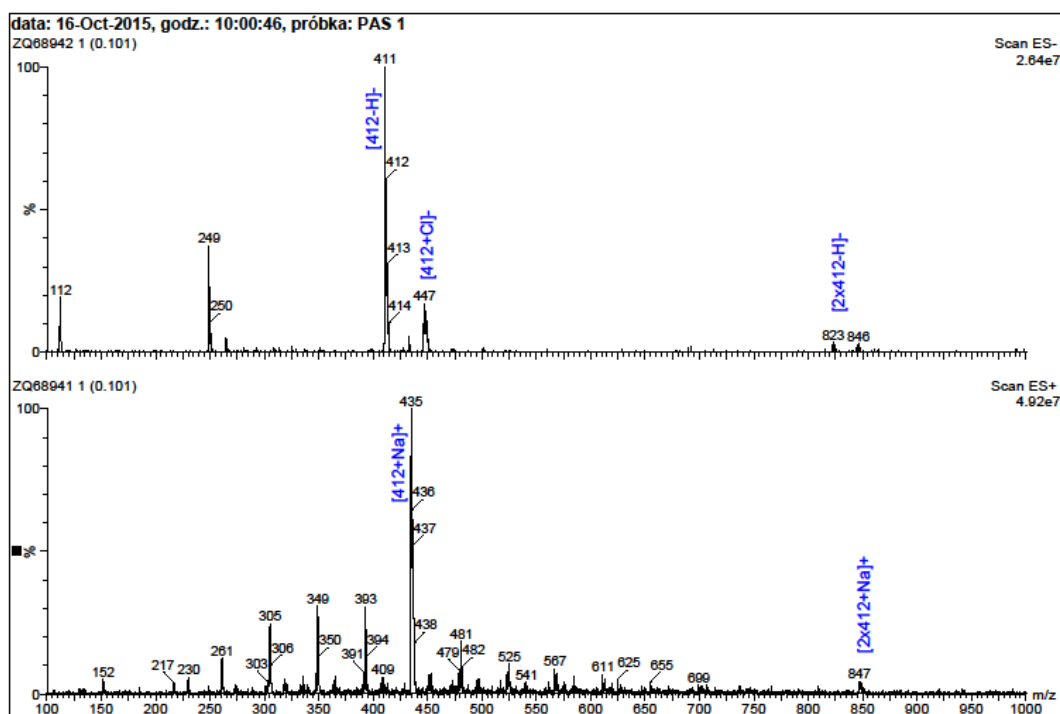


SAMPLE_33799 7 (0.071) Cm (2:10)

TOF MS ES+
3.88e3

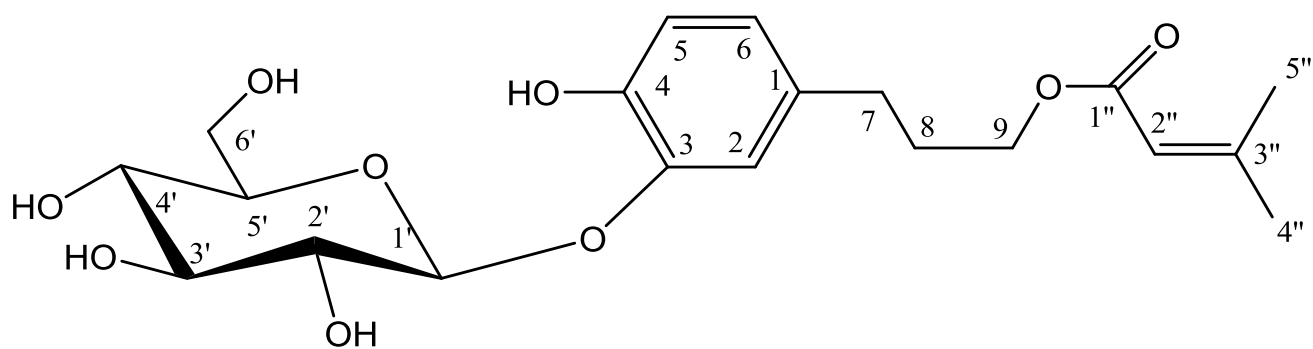


Ryc. 38 Widmo MS HR-TOF-ESI-MS związku H



Ryc. 39 Widmo MS LR-ESI-MS związku H

Związek **H** to senecian (3,3-dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4-dihydroksyfenylopropanolu (inne nazwy: 3-O- β -glukopiranozyd 3,3-dimetyloakrylanu 3,4-dihydroksyfenylopropyłu, 3-O- β -glukopiranozyd senecianu 3,4-dihydroksyfenylopropyłu) (Rycina 40). Jest on nieznaną dotąd estrową pochodną znanego glukozydu [Toru et al., 2001], którego dane spektralne NMR przedstawiono w Tabeli 13. Sygnały H NMR dla części alkoholowej cząsteczki są bardzo podobne jak dla samego glukozydu, z wyjątkiem sygnałów dla grupy metylenowej propanu w pozycji C-9, które są wyraźnie przesunięte w dół pola na skutek estryfikacji.



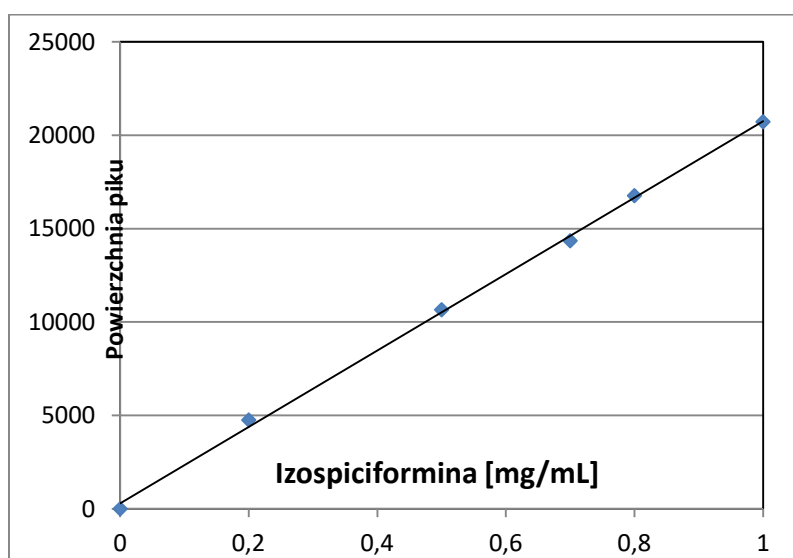
Ryc. 40 Struktura związku H- senecian (3,3-dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4-dihydroksyfenylopropanolu

B. Oznaczenie ilościowe dominujących germakranolidów w metanолоwym ekstrakcie z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* metodą HPLC

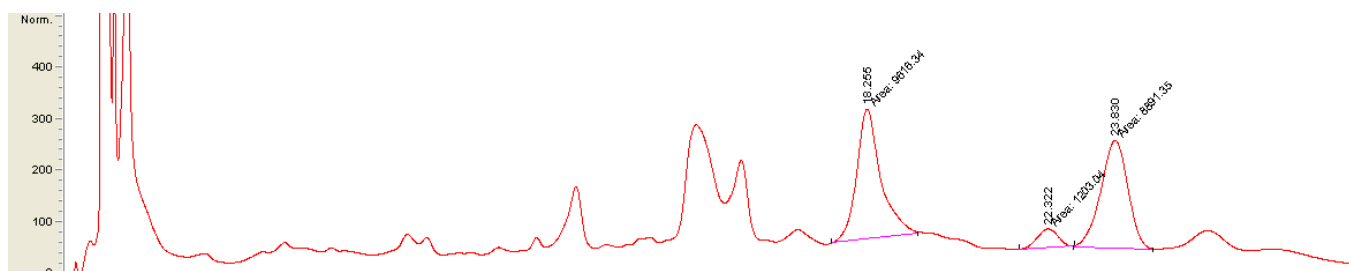
Celem standaryzacji ekstraktu metanолоwego z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* określono zawartość dominujących związków germakranolidowych:

1. Izospiciformina stanowi 0,04 mg/ml = 2,22 mg/g ekstraktu metanолоwego
2. Stizolicyna stanowi 0,33 mg/ml = 16,5 mg/g ekstraktu metanолоwego
3. Stizolina stanowi 0,44 mg/ml = 22,05 mg/g ekstraktu metanолоwego
4. Suma związków analizowanych stanowi 40,77 mg/g ekstraktu metanолоwego, jest to 4,08% wyciągu.

Poniżej przedstawiono przykładową krzywą kalibracyjną przedstawiającą zależność stosunku pola powierzchni pików chromatograficznych izospiciforminy do jej stężenia w odniesieniu do wzorca zewnętrznego (Rycina 41) oraz chromatogram ekstraktu metanолоwego z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* (Rycina 42).



Ryc. 41 Przykładowa krzywa kalibracyjna przedstawiająca zależność stosunku pola powierzchni pików chromatograficznych izospiciforminy do jej stężenia w odniesieniu do wzorca zewnętrznego



Ryc. 42 Chromatogram ekstraktu metanolowego z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

C. Oznaczenie aktywności przeciwserotoninowej wybranych germakranolidów i ekstraktu metanolowego z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

Analizowane dane nie były zgodne z rozkładem normalnym (test Shapiro – Wilka).

Porównanie analizowanych związków wykonano za pomocą nieparametrycznego U Manna-Whitneya. Wyniki przedstawiano jako średnie i odchylenia standardowe.

Dane opracowano przy pomocy pakietu statystycznego Statistica 12 PL (StatSoft).

Wszystkie testy były uznawane za istotne statystycznie, przy $p < 0,05$.

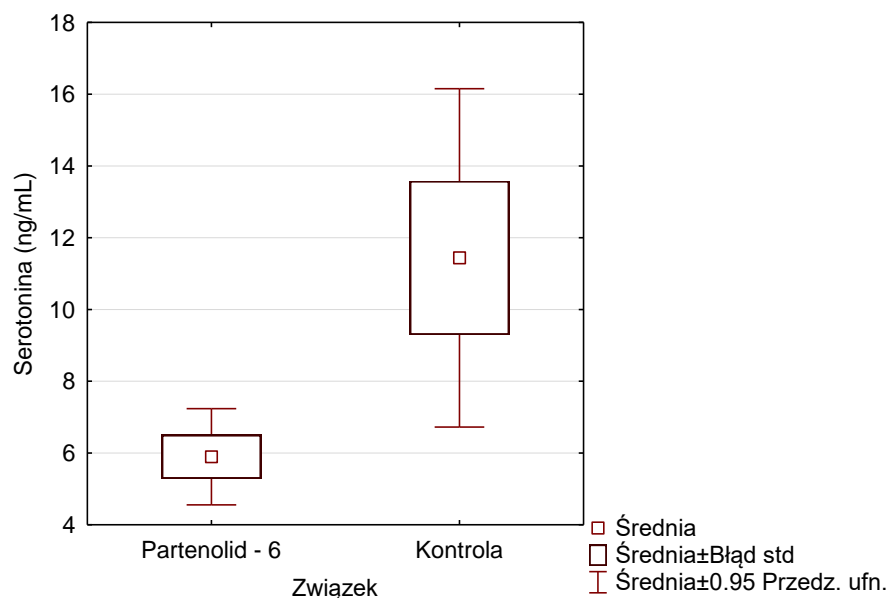
Poniżej przedstawiono oznaczenia aktywności przeciwserotoninowej badanych substancji (Tabela 12, Ryciny 43-47).

1. Określenie stężenia serotoniny [mg/ml] we wszystkich próbach badanych i kontroli

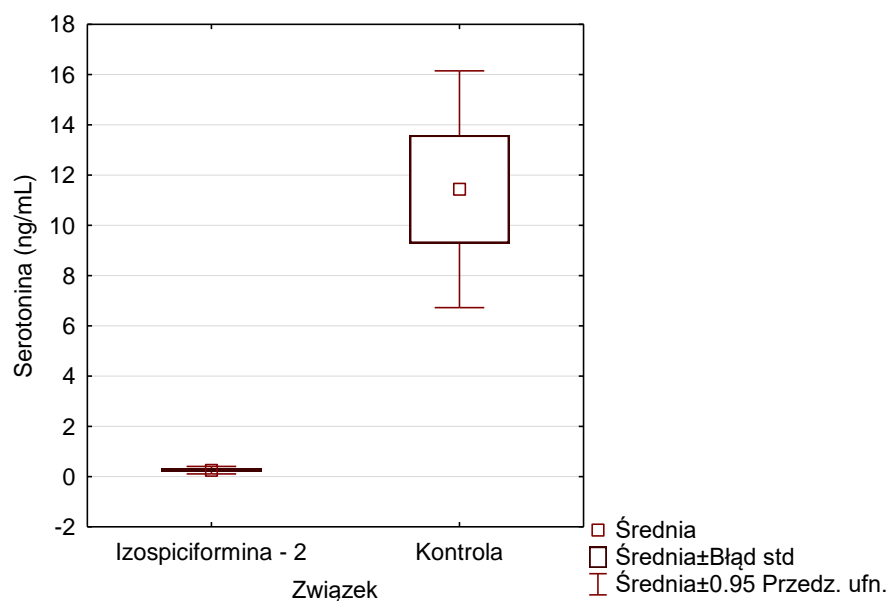
Tabela 12. Stężenie serotoniny w poszczególnych próbkach badanych i kontroli:

	Stężenie serotoniny [mg/ml]	Odchylenie standardowe	N= liczba ważnych wyników
Kontrola	11,44	7,42	12
Partenolid	5,9	2,11	12
Izospiciformina	0,23	0,19	9
Stizolina	4,72	1,36	12
Stizolicyna	6,62	1,08	12
Wyciąg metanolowy	3,48	2,21	12

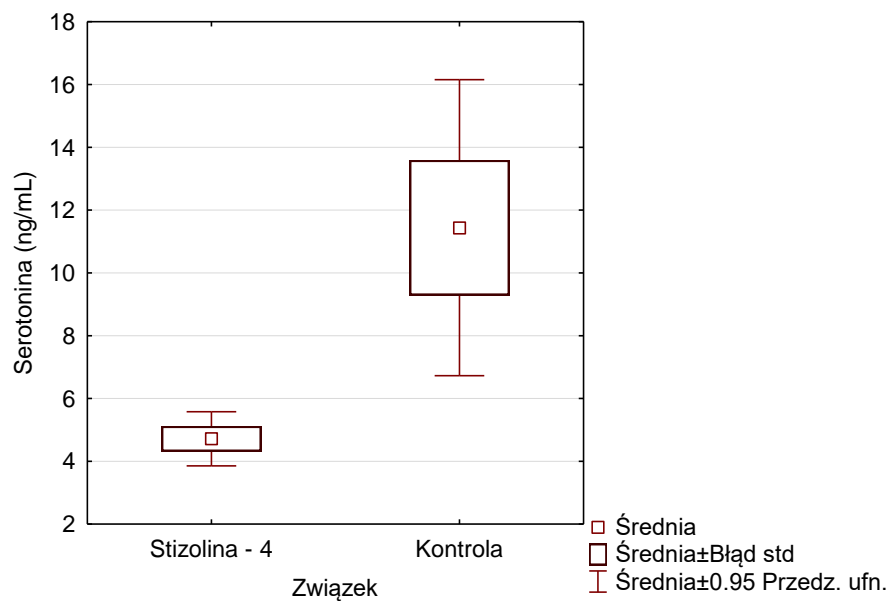
2. Porównanie stężenia serotoniny w poszczególnych próbach badanych do próby kontrolnej, stanowiącej 100% uwalnianej serotoniny



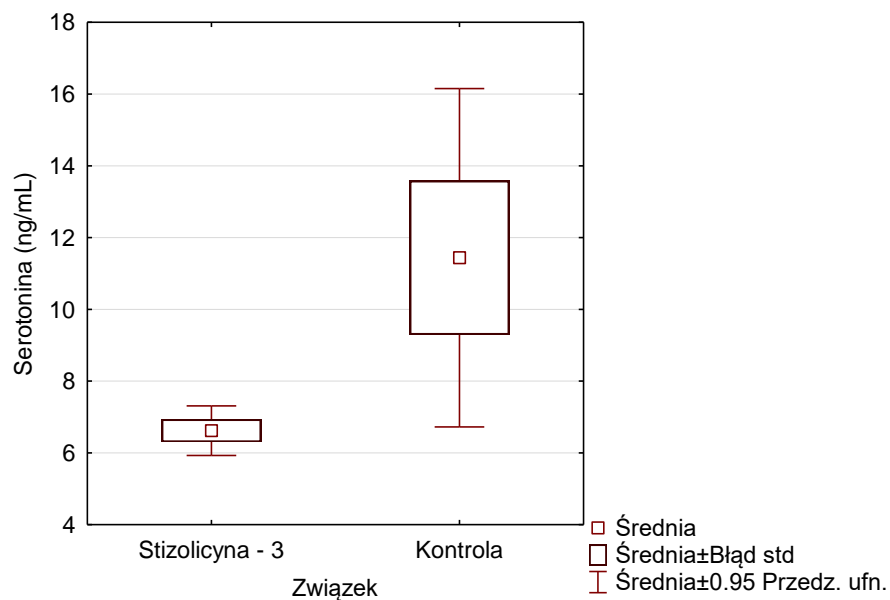
Ryc. 43 Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej partenolid z próbą kontrolną



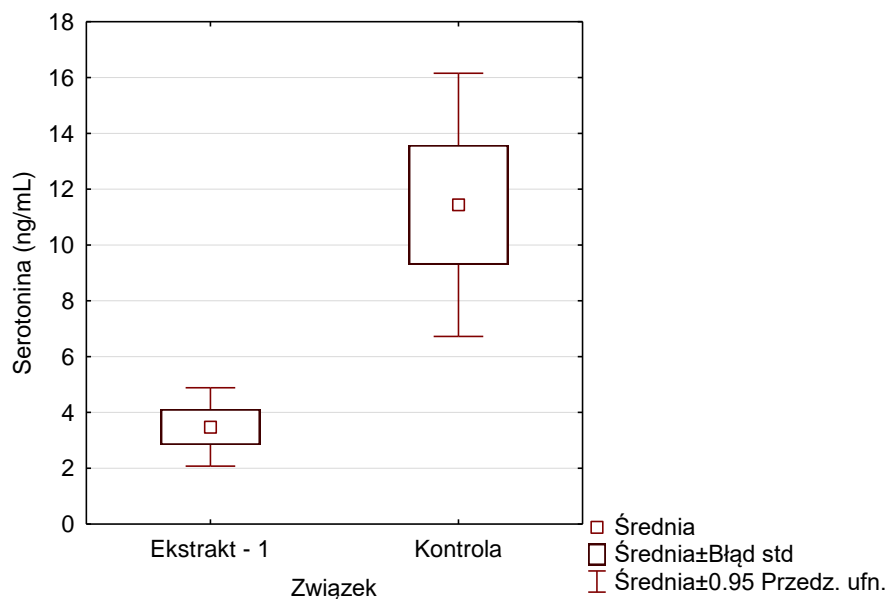
Ryc. 44 Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej izospiciforminę z próbą kontrolną



Ryc. 45 Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej stizolinę z próbą kontrolną



Ryc. 46 Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej stizolicynę z próbą kontrolną



Ryc. 47 Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej wyciąg metanolowy z ziela *S. balsamitaefolius* z próbą kontrolną

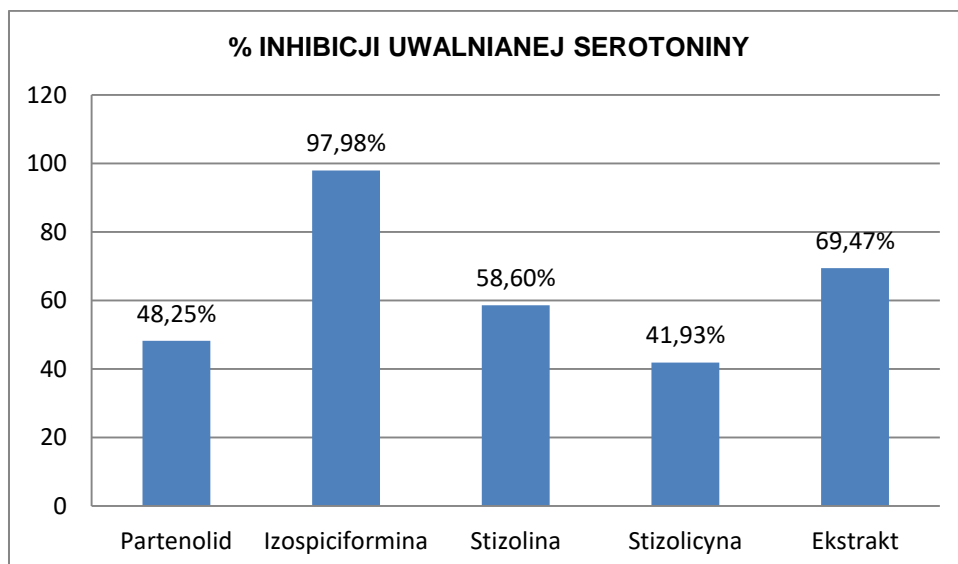
Stężenie serotoniny we wszystkich próbach badanych było niższe niż w próbce kontrolnej. Potwierdza to przypuszczenia przeciwserotoninowej aktywności germakranolidów oraz ekstraktu z surowca badanego.

3. Określenie zdolności hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi dla poszczególnych analiz, zawierających związki badane (izospiciformina, stizolina, stizolicyna, partenolid) oraz wyciąg metanolowy z z ziela *S. balsamitaefolius*

Stężenie serotoniny [mg/ml] w analizie zawierającej:

- **partenolid** było o 48,25% niższe niż w próbce kontrolnej (wynik istotny statystycznie, $p=0.0477$);
- **izospiciforminę** było o 97,98% niższe niż w próbce kontrolnej (wynik istotny statystycznie, $p=0.0001$);
- **stizolinę** było o 58,6% niższe niż w próbce kontrolnej (wynik istotny statystycznie, $p=0.0380$);
- **stizolicynę** było o 41,93% niższe niż w próbce kontrolnej (wynik istotny statystycznie, $p=0.0389$);
- **ekstrakt (wyciąg metanolowy z z ziela *S. S. balsamitaefolius*)** było o 69,47% niższe niż w próbce zawierającej partenolid (wynik istotny statystycznie, $p=0.0097$).

Wszystkie analizowane związki oraz ekstrakt wykazują zdolność inhibicji uwalniania 5HT z płytek krwi, porównując z kontrolą stanowiącą 100% uwalnianej serotoniny (Rycina 48).



Ryc. 48 Określenie zdolności hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi badanych związków i wyciągu metanolowego

4. Porównanie aktywności biologicznej wyizolowanych germakranolidów (izospiciformina, stizolina, stizolicyna) oraz wyciągu metanolowego z z zieleń *S. S. balsamitaefolius* z partenolidem.

Stężenie serotoniny [mg/ml] w analizie zawierającej:

- **izospiciforminę** było o 96,1% niższe niż w próbce zawierającej partenolid (wynik istotny statystycznie $p=0.0001$);
- **stizolinę** było o 20% niższe niż w próbce zawierającej partenolid (wynik nieistotny statystycznie $p=0.241600$);
- **stizolicynę** było o 12,2% wyższe niż w próbce zawierającej partenolid (wynik o niskiej istotności statystycznej $p=0.214495$);
- **ekstrakt (wyciąg metanolowy z z zieleń *S. S. balsamitaefolius*)** było o 41,02% niższe niż w próbce zawierającej partenolid (wynik istotny statystycznie $p=0.0145$).

Izospiciformina, stizolina oraz ekstrakt wykazują wyższą aktywność biologiczną niż partenolid. Stizolicyna nieznacznie słabiej hamuje uwalnianie 5-HT z płytek krwi niż partenolid – związek o udowodnionej aktywności przeciwserotoninowej.

VI. DYSKUSJA

Migrena to choroba przewlekła, towarzyszącą człowiekowi od starożytności. Jest to przypadłość globalna, dotykająca ludzi w każdym wieku i każdej rasy [Lipton, 2001; Lipton and Bigal, 2005; WHO, 2016]. Stanowi problem nie tylko zdrowotny, ale także społeczno-ekonomiczny. Badania prowadzone w krajach Unii Europejskiej wykazały, że całkowity roczny koszt związany z bólem głowy dotykający dorosłych Europejczyków w wieku 18-65 wynosi 173 bilionów euro [Linde et al., 2012; Schrüks et al., 2009]. Ponadto powoduje znaczne obniżenie jakości życia, przyczynia się do absencji w szkole i w pracy, przypuszczalnie powodując obniżenie poziomu wykształcenia, a następnie obniżenie uzyskanych przychodów wśród migreników [Stovner; 2008]. Wieloobjawowość tej jednostki chorobowej oraz problem ze znalezieniem jej etiologii powoduje, że farmakoterapia sprowadza się do podawania leków przerywających ostry ból oraz leków uśmierzających objawy towarzyszące (NLPZ, leki przeciwwymiotne, tryptany, alkaloidy sporyszu).

Fitoterapia migreny z użyciem ekstraktów z liści i kłączy lepiężnika oraz z ziela złocienia maruna, na dzień dzisiejszy także nie jest zadowalająca.

Na rynku niemiecki istnieje produkt Petadolex, zawierający standaryzowany ekstrakt z korzenia lepiężnika różowego (*Petasites hybridus*). Badania przeprowadzone przez Diener i współpracowników w 2004 wykazały, iż podawanie ekstraktu osobą cierpiącym na migrenowe bóle głowy znacząco zmniejsza częstotliwość ataku (46% po 4 tygodniach stosowania, 60% po 8 tygodniach stosowania, 50% po 12 tygodniach stosowania) [Diener et al., 2004]. *Petasites hybridus* to surowiec zawierający olejek eteryczny, którego głównymi składnikami są alkohole seskwiterpenowe pochodne eremofilanu (petazyna, izopetazyna, petazol) warunkujące aktywność przeciwmigrenowe [Lamer-Zalewska i wsp., 2007]. Niestety, ze względu na obecność alkaloidów pirolizydynowych, wykazujących działanie hepatotoksyczne i kancerogenne jego użycie jest marginalne. Dodatkowo problem z uzyskaniem ekstraktu pozbawionego toksycznych związków, a równocześnie skutecznego w leczeniu migreny zmniejsza jego zastosowanie [Aydin et al., 2013; Kälin, 2003].

Kolejnym surowcem roślinnym od lat używanym w profilaktyce migreny jest ziele złocienia maruna - (*Chrysanthemi partheni herba*). Roślina ta zawiera szereg

związków czynnych, ale partenolid - lakton seskwiterpenowy pochodny germakranu uznany jest za najbardziej aktywny farmakologicznie związek [Williams et al., 1995]. Liczne badania i publikacje opisują jego działanie przeciwnowotworowe [Anderson et al., 2008; Czyż i wsp., 2010; Czyż i wsp., 2013; Duechler et al., 2008; Döchler and Stepnik 2008; Liu et al., 2009; Lesiak i wsp., 2010; Wyrębska i wsp., 2013], przeciwzapalne [Hwang et al., 1996, Koprowska i Czyż, 2010; Makheja and Bailey, 1982; Sur et al., 2009] i przeciwmigrenowe [Abad et al., 1995; Arnason et al., 1995; Błoszyk, 1998; ESCOP Monographs, 2003; Heptinstall et al., 1985; Janczak-Bazan, 2001]. Działanie przeciwmigrenowe wyciągu z ziela *Tanacetum parthenium* wynikać może ze zdolności hamowania agregacji płytek krwi, hamowania uwalniania serotoniny [Mittra et al., 2000] oraz działania spazmolitycznego na naczynia krwionośne. Dodatkowo istotne znaczenie może mieć także aktywność przeciwzapalna. Pomimo znanej i udowodnionej zdolności farmakologicznej ziela złocienia maruny, jego zastosowanie w leczeniu jest nadal niewystarczające. Powodem jest niestabilność partenolidu w surowcu. Badane próbki produktu handlowego po 2 latach przechowywania w warunkach optymalnych, zawierały tylko 10% zawartości początkowej partenolidu [Freudenstein, 1998].

Dlatego celem badania było poszukiwanie nowego surowca roślinnego o potencjalnym działaniu przeciwmigrenowym. Ziele *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. może spełniać te warunki. Doniesienia literaturowe o obecności charakterystycznych laktonów seskwiterpenowych (germakranolidy, pochodne partenolidu) w rodzaju *Stizolophus* sugerowały ich obecność także w tytułowej roślinie [Nowak et al., 1989 a); Nowak et al., 1989 b); Suleimenov et al., 2005]. Przypuszczano, iż *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam./syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. zawiera związki aktywne, posiadające w swej strukturze trzy elementy odpowiedzialne za zdolność oddziaływania z innymi strukturami w organizmie, tj.: 4,5 epoksyd, ugrupowanie laktonowe i sprzężony z nim egzometylen (Rycina 10, str. 26). Aktywność biologiczna związków z grupą α -metyleno- γ -laktonową polega na alkilowaniu ugrupowań nukleofilowych np. grupy sulfhydrylowej enzymów, w reakcji addycji typu Michaela [Heptinstall et al., 1987]. Efekt farmakologiczny wynikający z ww oddziaływań jest wielokierunkowy. Cassady i współpracownicy wyizolowali stizolicynę (germakranolid z ugrupowaniem α -metyleno- γ -laktonowym) (Rycina 26, str. 97) z ziela *Stizolophus balsamita*, która

wykazywała działanie cytotoksyczne wobec kultur komórkowych nowotworowych P388 i KB [Cassady et al., 1984]. Pickman badając zdolność przeciwbakteryjną laktonów seskwiterpenowych zaobserwował, że najwyższą aktywność wykazał 9 α -hydroksypartenolid (Rycina 30, str. 103) [Pickman, 1983]. Dodatkowo, 9 α -hydroksypartenolid wśród 45 przebadanych laktonów seskwiterpenowych skutecznie zmniejszał namnażanie grzybów *Microsporium cookei*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Fusarium* sp [Pickman, 1984]. W 1995 międzynarodowy zespół, podjął skuteczną próbę zbadania i określenia zdolności poszczególnych laktonów seskwiterpenowych do hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi bydłęczych. Spośród 54 badanych germakranolidów, gwajanolidów, eudesmanoliów i pseudogwajanolidów, te zawierające ugrupowanie 4,5 epoksydowe, ugrupowanie laktonowe i sprzężony z nim egzometylen wykazywały najwyższą aktywność. IC50, tj. stężenie związku w μ M niezbędne do zahamowania 50% uwalnianej serotoniny z płytek krwi bydłęczych dla partenolidu (Rycina 9, str. 23) wynosiło 3,03 μ M, a dla stizolicyny – 5,82 μ M [Arnason, 1995].

Chcąc potwierdzić przypuszczenia literaturowe dokonano szczegółowej analizy fitochemicznej niebadanego wcześniej gatunku: *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam./syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. Nasiona otrzymano z Irańskiego Ogrodu Botanicznego w Teheranie. Uprawę prowadzono w ogrodzie Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Materiałem badawczym było wysuszone i rozdrobnione ziele, które poddano ekstrakcji rozpuszczalnikami, wg procedury wypracowanej przez zespół Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych z UMP.

Wyciąg metanolowy poddano analizie HPLC, celem identyfikacji i ilościowego określenia dominujących związków występujących w ekstrakcie. Najwyższe stężenie wykazywała stizolina (22,05 mg/g ekstraktu) i stizolicyna (16,5 mg/g ekstraktu) a najniższe izospiciformina (2,22 mg/g ekstraktu). Analizę wykonano wykorzystując metodę wzorca zewnętrznego, używając chromatografu cieczowego z detektorem diodowym. Potwierdziło to przypuszczenia, że podstawione pochodne partenolidowe są stabilniejsze od niepodstawionego partenolidu, który ulegał rozpadowi podczas badania z użyciem HPLC.

Wyciągi chlorku metylenu i octanu etylu z ziela badanej rośliny poddano analizie izolacyjnej metodą chromatografii kolumnowej (CC) na żelu krzemionkowym. Wynikiem CC był rozdział związków; wybrane frakcje poddano rechromatografiom celem uzyskania jednorodnych chemicznie związków. Wstępnie identyfikowano je używając chromatografii cienkowarstwowej TLC, a ich obecność na chromatogramie wywoływano odczynnikami anyżowym lub analizowano przy użyciu światła UV.

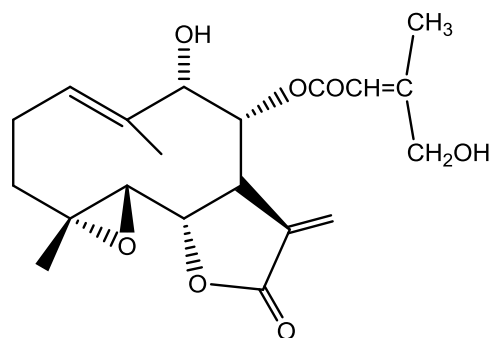
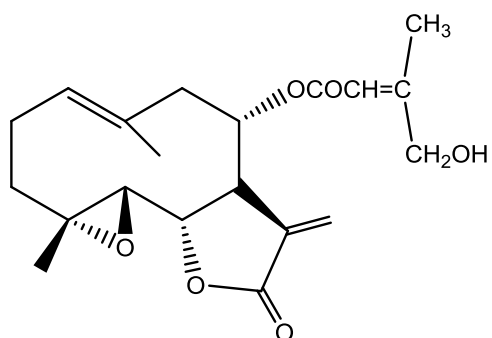
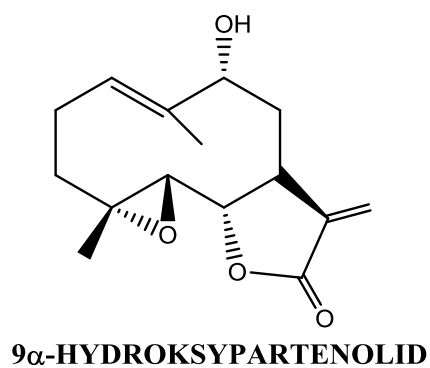
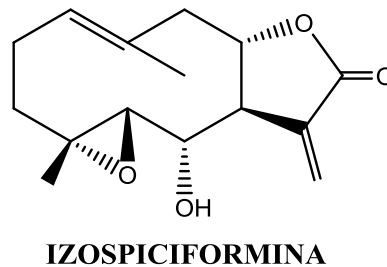
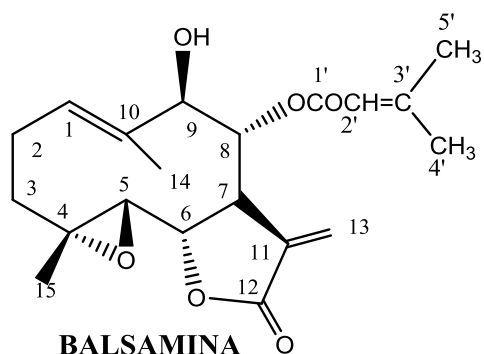
Określano barwę plam oraz R_f i jeżeli była taka możliwość porównywano ze wzorcem (Rycina 17, str. 71). Ponadto dla związków krystalicznych mierzono temperaturę topnienia i porównywano z danymi literaturowymi. Szczegółową strukturę wyizolowanych związków określano używając metod spektralnych: ¹H NMR (600 MHz), ¹³C NMR (150 MHz), dwuwymiarowe widma ¹H/¹H COSY, widma HSQC, widma HMBC, MS.

Wynikiem przeprowadzonej analizy fitochemicznej wyizolowano z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* 7 laktonów seskwiterpenowych pochodnych germakranu (Rycina 49, str. 131) oraz 1 acetylowany glukozyd fenolowy (Rycina 40, str. 117). Germakranolidy charakteryzują się obecnością 4 α ,5 β -epoksydem trans podwójnym wiązaniem pomiędzy 1 a 10 węglem i trans γ -laktonem połączonym z grupą egzometylenową (Rycina 10, str. 26). Wyjątek stanowi izospiciformina, która posiada 7,8 pierścień laktonowy. Związek ten wyróżnia się też obecnością grupy OH na C6. Pozostałe germakranolidy posiadają grupy hydroksylowe na C9 lub C8. Podstawnik hydroksylowy na C8 może być zablokowany grupą estrową. Większość uzyskanych germakranolidów znana jest w rodzaju *Stizolophus* [Nowak et al., 2011; Nowak et al. 2013]. Wyjątek stanowią 9 α -hydroksypartenolid, który znany jest z występowania w gatunkach rodzaju *Zoegea* [Budesinsky et al., 1983; Nawrot et al., 2015] i *Anvillea garcini* [Tyson et al., 1981].

Wyizolowane laktony seskwiterpenowe barwią się na chromatogramach w trzech rodzajach kolorów, które odpowiadają niektórym szczegółom w strukturze związków (Rycina 50). Barwa zielona plam na chromatogramach sugeruje obecność podstawników tlenowych na C8 i C9, barwa fioletowa na obecność podstawnika tylko na C9 a kolorem purpurowym na TLC charakteryzują się germakranolidy z podstawnikiem tlenowym tylko na C8.

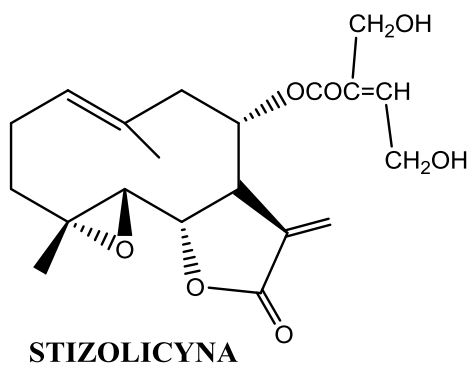
Wyciąg octanu etylu z ziela tytułowej rośliny zawierał glukozyd fenolowy - senecian (3,3dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4dihydroksyfenylopropanolu (Rycina 40,

str.117). Na chromatografach barwi się na kolor czarny (Rycina 32, str. 105). Jest to nowy związek, jedynie jego forma nieestrowa występuje w owocach indyjskiej rośliny ajowan (*Carum ajowan*) [Toru et al., 2001].

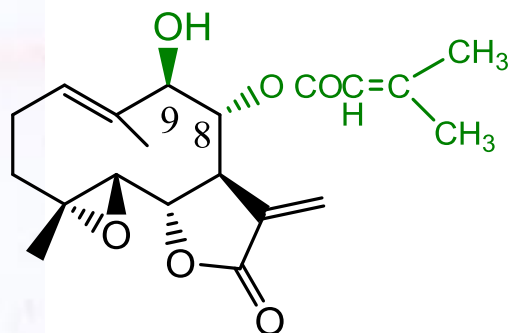


**8 α -(4'-HYDROKSY)SENECIOYLOKSY-
PARTENOLID**

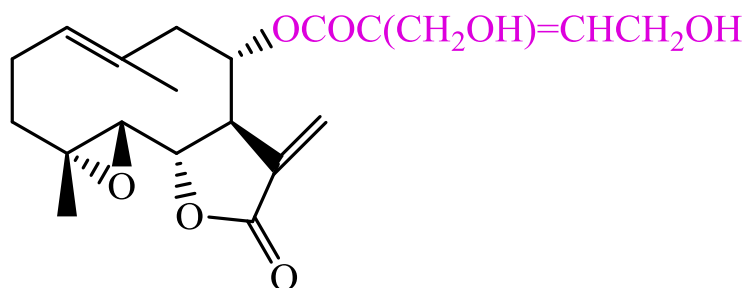
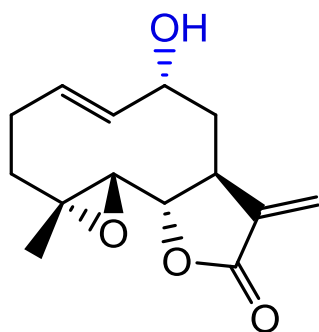
**8 α -(4'-HYDROKSY)SENECIOYLOKSY-
9 α -HYDROKSYPARTENOLID**



Ryc. 49 Germakranolidy wyizolowane i zidentyfikowane z wyciągu chlorku metylenu ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

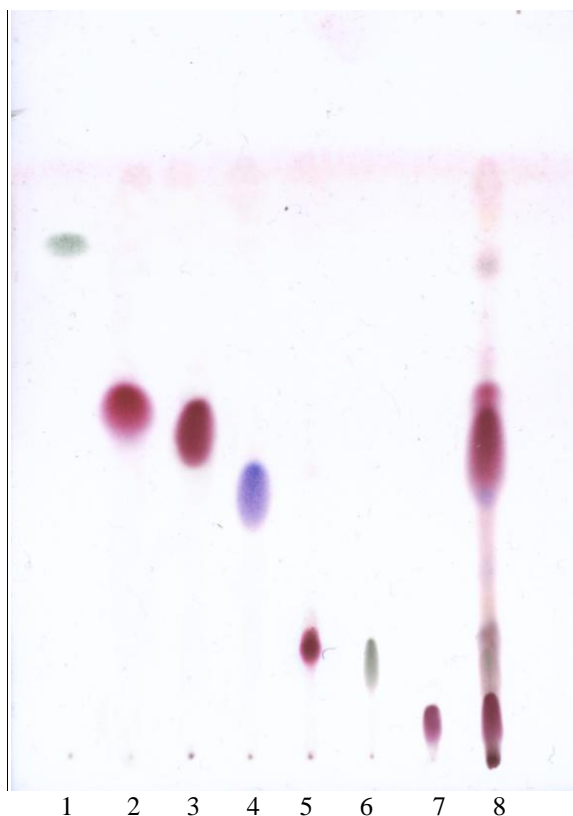


Adsorbent: żel krzemionkowy
Wywoływacz: odczynnik anyżowy
Układ rozwijający: chlorek metylenu –
 aceton 8:1
 1. balsamina
 2. 9α-hydroksypartenolid
 3. stizolicyna



1 2 3

Ryc. 50 Chromatogram i struktury gerkranolidów, które warunkują charakterystyczne barwy plam



- Adsorbent:** żel krzemionkowy
Wywoływacz: odczynnik anyżowy
Układ rozwijający: chlorek metylenu – aceton 8:1
1. balsamina
 2. izospiciformina
 3. stizolina
 4. 9 α -hydroksypartenolid
 5. 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksy-partenolid
 6. 8 α -4'-hydroksy)senecioyloksy-9 α -hydroksypartenolid
 7. sizolicyna
 8. wyciąg chlorku metylenu z ziela *S. balsamitaefolius*

Ryc. 51 Chromatogram germakranolidów z ekstraktu chlorku metylenu ziela *Stizolophus balsamitaefolius*

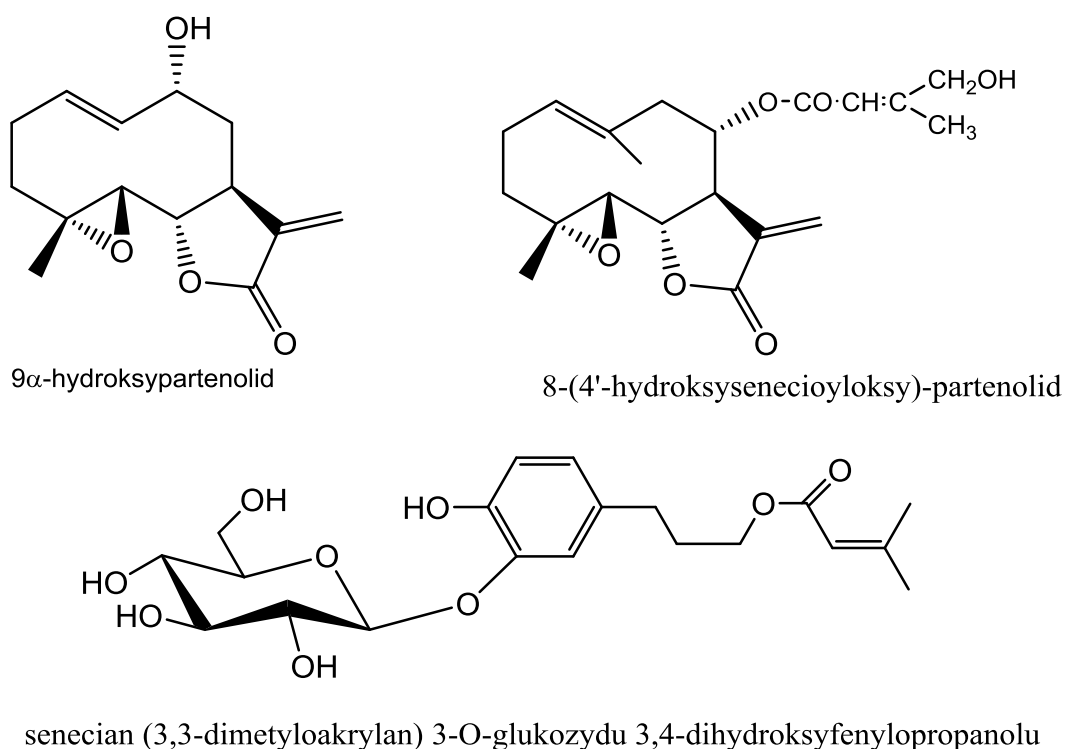
Szczegółowa analiza fitochemiczna udowodniła, że badany gatunek stanowi źródło cennych związków o działaniu przeciwserotoninowym i potencjalnym przeciwmigrenowym. Spośród wyizolowanych i zidentyfikowanych związków wybrano: izospiciforminę, stizolinę i stizolicynę celem sprawdzenia ich aktywności biologicznej. Dodatkowo dołączono ekstrakt metanolowy, który będzie tańszym i łatwiejszym w pozyskiwaniu składnikiem preparatu leczniczego niż pojedyncze związki. Badanie przeprowadzono, po uzyskaniu zgody od Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Uchwała 20/2012 z dn. 11.05.2012), gdyż w eksperymencie użyto krwi szczurzej, z której pozyskiwano frakcję wysokopłytkową (ang. Platelet Rich Plasma – PRP). Szczury szczepu Wistar o masie ciała ok. 200 pochodziły z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Doświadczenie miało na celu sprawdzenie zdolności poszczególnych

związków i ekstraktu do hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi. Dodatkowo porównano aktywność biologiczną poszczególnych związków i ekstraktu z siłą działania partenolidu – germakanolidu o udowodnionym działaniu przeciwserotoninowym.

Krew pobierano od szczurów w ilości ok. 10 ml/osobnika do probówek z dodatkiem cytrynianu trisodowego w ilości 1 ml/10ml krwi i odwirowano (160 g, 10 min., następnie 500 g 10 min., w temp 37°C). Uzyskano PRP, gdzie średnia ilość płytek wynosiła: $1119 \times 10^3/\mu\text{l}$. Kolejnym etapem było dodawanie roztworów poszczególnych związków (izospiciformina, stizolina, stizolicyna), wyciągu metanolowego z ziela oraz roztwór partenolidu i roztwór ADP. Partenolid służył jako wzorzec, ADP stanowił czynnik agregacyjny trombocytów, w wyniku którego uwolniona została serotonina z płytek krwi. Celem ilościowego określenia stężenie serotoniny w poszczególnych próbach użyto ultraczułego testu immunoenzymatycznego Serotonin Research ELISA™ BA E-5937 firmy Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG. oraz urządzeń spektrofotometrycznych, mierząc absorbancję, przy długości fali $\lambda=450$ nm. Próbkę kontrolną stanowiła analiza zawierająca ADP oraz rozpuszczalnik (3% EtOH rozpuszczonego w PBS), którego użyto celem przygotowania roztworów ze związkami badanymi. Ustalono, że stężenie serotoniny we wszystkich próbach badanych było niższe niż w próbce kontrolnej, co potwierdziło doniesienia literaturowe o zdolności inhibicyjnej germakranolidów wobec uwalniania 5-HT [Robin et al., 1992]. Najniższe stężenie serotoniny - 0,23 mg/ml, odczytano w próbce zawierającej izospiciforminę. Było ono niższe aż o 97,98% niż w próbce kontrolnej (Tabela 12, str. 120). Porównując aktywność biologiczną wyizolowanych laktonów seskwiterpenowych oraz wyciągu z partenolidem, zauważono, że izospiciformina, stizolina oraz ekstrakt wykazują wyższą aktywność niż wzorzec. Stizolicyna tylko nieznacznie słabiej hamowała uwalnianie 5-HT z płytek krwi niż partenolid (Rycina 48, str.124).

Przeprowadzona analiza fitochemiczna oraz eksperyment biologiczny dają nadzieję, iż wyciąg z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* może stanowić materiał do dalszych prac ukierunkowanych na tworzenia leku roślinnego pomocnego w leczeniu migreny. Badania wykazały, że ziele zawiera w swym składzie związki wykazujące wyższą aktywność biologiczną niż partenolid i dodatkowo nie ulegają one rozkładowi podczas analizy HPLC.

Ponadto wobec różnych propozycji klasyfikowania gatunków z rodzaju *Centaurea/Stizolophus* sekcji *Stizolophus* poznane laktony seskwiterpenowe z ziela *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* są wartościowymi markerami chemotaksonomicznymi dla tej jednostki taksonomicznej. Jej charakterystyczną cechą chemiczną jest 4,5 epoksyd w szkielecie germakranolidu. Natomiast 9 α -hydroksypartenolid, 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksypartenolidu oraz senecian (3,3dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4dihydroksyfenylopropanolu (Rycina 52) stanowią chemiczny wyróżnik tytułowej rośliny, co jest istotne w prowadzonej dyskusji na temat wydzielenia dwóch podgatunków *Stizolophus balsamita* [Dittrich et al., 1980; Bobrov et al., 1964]. Natomiast, wyniki analizy fitochemicznej tej pracy dają podstawy do rozwiązania problemu przynależności grupy „*Stizolophus*” do odpowiedniego rodzaju.



Ryc. 52 Związki wyróżniające tytułową roślinę pod względem chemicznym od pozostałych z grupy „*Stizolophus*”

VII. WNIOSKI

1. Ziele *Stizolophus balsamitaefolius* jest surowcem roślinnym bogatym w germakranolidy pochodne partenolidu.
2. Dominujące germakranolidy i ekstrakt z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* posiadają potencjalne właściwości przeciwmigrenowe.
3. Ekstrakt z ziela *Stizolophus balsamitaefolius* może stanowić substancję czynną skutecznego preparatu przeciwmigrenowego.
4. Położenie C7,8 pierścienia laktonowego w szkielecie germakranu prawdopodobnie znacząco zwiększa siłę działania przeciwserotoninowego izospiciforminy.
5. Podstawniki na węglach C8 i C9, izolowanych germakranolidów, stabilizują cząsteczkę pochodnych partenolidu.
6. Trzy związki: 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksy-partenolid, 9 α -hydroksypartenolid i senecian (3,3-dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4-dihydroksyfenylopropanolu wyróżniają pod względem chemicznym tytułową roślinę od pozostałych z rodzaju *Centaurea/Stizolophus*.
7. 4,5-epoksyd w szkielecie germakranolidu może być chemicznym argumentem do utworzenia jednej jednostki taksonomicznej na poziomie rodzaju pod nazwą *Stizolophus* a nie *Centaurea*.

VIII. STRESZCZENIE

Część teoretyczna pracy zawiera kompendium wiedzy na temat migreny (*hemicrania*). Przedstawiony został jej podział i klasyfikacja oraz kryteria diagnostyczne proponowane przez IHS mogące pomóc lekarzom praktykom. Opisano wszystkie znane teorie próbujące wytłumaczyć mechanizm powstawania bólu migrenowego (teoria naczyniowa, teoria biochemiczna, teoria neuronalna i genetyczne podłoże bólu). Zebrano także informacje o aktualnych schematach leczenia (farmakoterapia zapobiegawcza, przerywająca napad, nowości lekowe, fitoterpia). Szczegółowo przedstawiono opis zioła *Chrysanthemum parthenium* i jego głównego związku partenolidu - od lat stosowanego w ziołolecznictwie jako surowiec o działaniu przeciwmigrenowym. Ponadto zaznaczono również wpływ diety i składników odżywczych na częstotliwość występowania napadu migrenowego. Dodatkowo dokonano charakterystyki *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. / syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. Opisano grupę charakterystycznych związków występujących w rodzaju *Centaurea*, którą spodziewano się wyizolować z badanej rośliny, tj. laktony seskwiterpenowe. Podano ich biogenezę, występowanie i właściwości biologiczne, w tym przede wszystkim ich aktywność przeciwserotoninową. Podkreślono dużą liczbę publikacji potwierdzających szerokie działanie partenolidu, który niestety ze względu na niestabilność i rozkład podczas analizy HPLC traci swoje znaczenie w fitoterapii migreny.

Migrena stanowi duży problem zdrowotny, ale także społeczno-ekonomiczny. Mimo wieloletnich badań nadal nie jest znana przyczyna jej powstawania. Nieustannie poszukiwane są nowe terapie mające pomóc w jej leczeniu, także wśród surowców zielarskich. To właśnie spowodowało, że zdecydowano się podjąć próbę poznania składu chemicznego interesującej rośliny, która według danych literaturowych powinna zawierać związki o potencjalnym działaniu przeciwmigrenowym. Była nią *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam./syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass., roślina, dotąd niebadana pod kątem chemicznym oraz biologicznym.

Celem pracy było podjęcie próby wyizolowania i zidentyfikowania związków potencjalnie czynnych z zioła *Stizolophus balsamitaefolius* Cass, określenie zawartości procentowej wybranych gremakranolidów w wyciągu alkoholowym,

dokonanie oceny zdolności hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi dominujących laktonów seskwiterpenowych i ekstraktu oraz porównania ich aktywności z działaniem partenolidu, związku o udowodnionym działaniu przeciwmigrenowym. Ponadto, poddano analizie wyniki izolacji i identyfikacji związków badanej rośliny pod kątem ich wartości chemotaksonomicznej.

Pierwszym etapem prac była analiza fitochemiczna. Materiałem badawczym było wysuszone ziele uzyskane z uprawy prowadzonej w ogrodzie Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych UMP. Uzyskane wyciągi chlorku metylenu i octanu etylu z ziela badanej rośliny poddano analizie izolacyjnej metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Po uzyskaniu czystych chromatograficznie związków, poznano ich strukturę stosując nowoczesne metody identyfikacyjne: ^1H NMR (600 MHz), ^{13}C NMR (150 MHz), dwuwymiarowe widma $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY, HSQC, HMBC i MS. W Wyniku przeprowadzonych analiz fitochemicznych z ekstraktu chlorku metylenu wyizolowano 7 germakranolidów:

- balsaminę,
- 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksy-9 α -hydroksypartenolid,
- stizolicynę,
- izospiciforminę,
- stizolinę,
- 9 α -hydroksypartenolid,
- 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksypartenolid.

Natomiast z ekstraktu octanu etylu otrzymano glukozyd fenolowy:

- senecian (3,3-dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4-dihydroksyfenylopropanolu.

Związek ten jest nową strukturą, nieznaną dotąd w świecie roślinnym.

Kolejnym etapem było oznaczenie ilościowe dominujących związków (stizolina, stizolicyna, izospiciformina) w ekstrakcie metanolowym z ziela metodą HPLC. Dało to możliwość standaryzacji wyciągu, który stanowić może wartościową substancję czynną, z określoną dawką, przyszłego, nowego preparatu o działaniu przeciwmigrenowym.

Następnie podjęto próbę zbadania aktywności biologicznej stizoliny, stizolicyny, izospiciforminy i wyciągu metanolowego. Doświadczenie miało na celu

sprawdzenie ich zdolności do hamowania uwalniania serotoniny ze szczurzych płytek krwi. Dodatkowo porównano aktywność biologiczną niektórych związków i ekstraktu z siłą działania partenolidu – germakanolidu o udowodnionym działaniu przeciwserotoninowym. Najsilniejsze działanie wykazywała izospiciformina z charakterystycznym pierścieniem laktonowym umiejscowionym w szkielecie, w pozycji 7,8. Zauważono także, że izospiciformina, stizolina oraz wyciąg metanolowy bardziej hamują uwalnianie 5-HT z płytek krwi niż partenolid, wykazując wyższą aktywność biologiczną.

Zarówno wyniki analizy fitochemicznej, HPLC jak i rezultat badań biologicznych dają nadzieję, że badany surowiec roślinny może być brany pod uwagę jako składnik przyszłego leku stosowanego w fitoterapii migreny. Natomiast już teraz wyniki analiz fitochemicznych mogą wskazać właściwe umiejscowienie badanej rośliny w klasyfikacji botanicznej podplemienia *Centaureinae*, rodziny *Asteraceae*.

IX. ABSTRACT

Isolation, identification and biological activity of the compounds from the *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass.

Keywords: *Centaurea balsamita* subs. *balsamita*, sesquiterpene lactones, germacranolides, new phenolic glucoside, antiserotonin activity, migraine

The theoretical part of the work contains a compendium of information on migraine (hemicrania). The division, classification and diagnostic criteria proposed by the IHS for clinicians are presented. All known theories attempting to explain the mechanism of migraine pain (vascular theory, biochemical theory, neuronal theory and genetic basis of pain) are discussed. In addition to that, the information on the current treatment regimens has been collected (preventive therapy, drug interrupting the attack, new drug, phytotherapy). The *Chrysanthemi partheni* herb and its main active compound – parthenolide, which is generally known as anti-migraine plant material, is described in detail. In addition, the impact of diet and nutrients on the frequency of migraine attacks is shown. Besides, the characteristics of *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam./*Stizolophus balsamitaefolius* Cass is provided. Sesquiterpene lactones are described, as a group of characteristic compounds occurring in the genus *Centaurea*, expected to be isolated from tested plants. Their biogenesis, occurrence and biological properties are given. Their antiserotonin activity is described focused upon. A large number of publications confirming the broad effect of parthenolide is highlighted, though unfortunately due to the instability and degradation during HPLC analysis, it loses its application in migraine phytotherapy.

Migraine is a major health problem, but also a socio-economic one. Despite years of research, the cause of this disease is still unknown. Scientists have been constantly searching for new therapies to improve treatment of migraine, also among the herbal raw materials. Due to this situation, we decided to make an attempt to focus on the chemical composition of a potentially interesting plant, which according to the literature should contain compounds with anti-migraine properties. The plant in question was *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam./*Stizolophus balsamitaefolius* Cass., so far untested in terms of chemical and biological activity. The aim of the study was to isolate and identify potentially biological active compounds from the herb of *Stizolophus balsamitaefolius* Cass, determine the

percentage of selected gremacranolides in the alcohol extract, to assess the ability to inhibit the release of serotonin from platelets by sesquiterpene lactones, and to extract and compare their activity with the parthenolide, a compound with proven anti-migraine properties. In addition, we analyzed the results of the isolation and identification in terms of their chemotaxonomical value.

The first stage of the work was the phytochemical analysis. The plant material used for the studies was dried herb derived from the cultivation in the garden of the Department of Medicinal and Cosmetic Natural Products, Poznań University of Medical Sciences. Furthermore, some methylene chloride and ethyl acetate extracts were prepared from the tested plant. The extracts were separated by column chromatography on silica gel. After obtaining the pure compounds by chromatography, the following modern methods of identification were used to discover their structures: ^1H NMR (600 MHz), ^{13}C NMR (150 MHz), two-dimensional spectrum: $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY, HSQC, HMBC and MS.

The result of the phytochemical analysis of methylene chloride extract is the isolation of the following 7 germacranolides:

- balsamin,
- 8α -(4'-hydroxy) seneciolyloxy- 9α -hydroxyparthenolide.
- stizolicin,
- izospiciformin,
- stizolin,
- 9α -hydroxyparthenolide

The result of the phytochemical analysis of ethyl acetate extract is the isolation of a brand new phenolic glucoside:

- senecian (3,3-dimethacrylate) 3-O-glucoside β -3,4-dihydroxyphenylpropanol

This compound is a new structure, unprecedented in the world of plants.

The next step was to determine the quantitative dominant compounds (stizolin, stizolicin, izospiciformin) in a methanol extract of the tested herb by HPLC. This provided the possibility of standardizing the extract, which can be a valuable active

substance with a specified dose, as a new drug component with antimigraine properties.

Then, we investigated the biological activity of stizolin, stizolicin, izospiciformin and the methanol extract. The experiment was supposed to test their ability to inhibit serotonin release from rat platelets. In addition, we compared the biological activity of the tested compounds and extract with parthenolide - germacranolide with proven antiserotonin properties.

Izospiciformin containing characteristic lactone ring situated in the C7,C8 position of skeleton showed the strongest activities. It has also been noted that izospiciformin, stizolin and the methanol extract inhibited the 5-HT release from platelets in a more effective way than parthenolide, showing a higher biological activity.

Both the results of the phytochemical analysis and HPLC, and the result of biological research give hope that the tested plant material can be considered as a component of a future drug used in phytotherapy of migraine.

X. SPIS RYCIN

Ryc. 1

Systematyka *Centaurea balsamita* subsp. *balsamita* Lam..... 13

Ryc. 2

Centaurea balsamita subsp. *Balsamita* Lam. / syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass.....14

Ryc. 3

Centaurea balsamita subsp. *Balsamita* Lam. / syn. *Stizolophus balsamitaefolius* Cass. – pokrój.....15

Ryc. 4

Podstawowe struktury seskwiterpenów.....16

Ryc. 5

Biogeneza laktonów seskwiterpenowych.....19

Ryc. 6

Schemat biogenezy laktonów seskwiterpenowych..... 20

Ryc. 7

Najczęściej występujące gwajanolidy w rodzaju *Centaurea*.....21

Ryc. 8

Najczęściej występujące germakranolidy w rodzaju *Centaurea*..... 22

Ryc. 9

Wzór partenolidu z elementami struktury odpowiedzialnymi za efekt farmakologiczny..... 23

Ryc.10

Zależność właściwości farmakologicznych od struktur i grup funkcyjnych germakranolidu i gwajanolidu..... 26

Ryc. 11

Wzór strukturalny arglabiny.....28

Ryc. 12

Wzór strukturalny helenaliny..... 31

Ryc. 13

Wzór strukturalny alantolaktonu.....33

Ryc. 14	
Wzór strukturalny Serotoniny.....	45
Ryc.15	
Złocień maruna – <i>Chrysanthemum parthenium</i>	58
Ryc. 16	
Lepięźnik różowy - <i>Petasites hybridus</i>	61
Ryc. 17	
Przykładowy chromatogram z kontroli wycieków z kolumny podczas rozdzielania ekstraktu chlorku metylenu z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i>	71
Ryc. 18	
Struktura związku A – balsamina.....	87
Ryc. 19	
Widmo ¹ H NMR związku B.....	89
Ryc. 20	
Widmo ¹ H NMR związku B w D ₂ O.....	91
Ryc. 21	
Widmo ¹ H NMR związku B w D ₂ O (dalszy ciąg).....	92
Ryc. 22	
Widmo HSQC + HMBC związku B.....	93
Ryc. 23	
Widmo NOESY związku B – sprzężenia alfa/alfa, beta/beta. Korelacje z protonami beta: H-1 → H-7; H-5 → H-7; H-9 → H-8 → H-6	94
Ryc. 24	
Wzór konformacyjny związku B.....	95
Ryc. 25	
Struktura związku B - 8α-(4'-hydroksy)senecioloxy-9α-hydroksypartenolid.....	95
Ryc. 26	
Struktura związku C – stizolicyna.....	97
Ryc. 27	
Wyniki rechromatografii frakcji nr 15-45.....	98
Ryc. 28	
Struktura związku D – izospiciformina.....	99

Ryc. 29	
Struktura związku E – stizolina.....	101
Ryc. 30	
Struktura związku F – 9 α -hydroksypartenolid.....	103
Ryc. 31	
Sugerowana struktura związku G - 8 α -(4'-hydroksy)senecioyloksypartenolid.....	104
Ryc. 32	
Chromatogram związku H.....	105
Ryc. 33	
Widmo ¹ H NMR związku H.....	108
Ryc. 34	
Widmo 2D związku H.....	110
Ryc. 35	
Widmo ¹³ C NMR związku H.....	111
Ryc. 36	
Widmo HSQC i HMBC związku H	113
Ryc. 37	
Widmo NOESY związku H	114
Ryc. 38	
Widmo MS MR-TOF-ESI-MS związku H.....	115
Ryc. 39	
Widmo MS LR-ESI-MS związku H.....	116
Ryc. 40	
Struktura związku H- senecian (3,3-dimetyloakrylan) 3-O- β -glukozydu 3,4-dihydroksyfenylopropanolu.....	117

Ryc. 41

Przykładowa krzywa kalibracyjna przedstawiająca zależność stosunku pola powierzchni pików chromatograficznych izospiciforminy do jej stężenia w odniesieniu do wzorca zewnętrznego..... 118

Ryc. 42

Chromatogram ekstraktu metanolowego z ziela *Stizolophus balsamitaefolius*..... 119

Ryc. 43

Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej partenolid z próbą kontrolną..... 121

Ryc. 44

Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej izospiciforminę z próbą kontrolną..... 121

Ryc. 45

Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej stizolinę z próbą kontrolną..... 122

Ryc. 46

Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej stizolicynę z próbą kontrolną..... 122

Ryc. 47

Porównanie stężenia serotoniny [mg/ml] w próbce zawierającej wyciąg metanolowy z ziela *S. balsamitaefolius* z próbą kontrolną..... 123

Ryc. 48

Określenie zdolności hamowania uwalniania serotoniny z płytek krwi badanych związków i wyciągu metanolowego..... 124

Ryc. 49

Germakranolidy wyizolowane i zidentyfikowane z wyciągu chlorku metylenu ziela *Stizolophus balsamitaefolius*..... 131

Ryc. 50

Chromatogram i struktury germakranolidów, które warunkują charakterystyczne barwy plam..... 132

Ryc. 51

Chromatogram gerkranolidów z ekstraktu chlorku metylenu ziela *Stizolophus balsamitaefolius*..... 133

Ryc. 52

Związki wyróżniające tytułową roślinę pod względem chemicznym od pozostałych z grupy „*Stizolophus*” 135

XI. SPIS TABEL

Tabela 1.	Kryteria diagnostyczne migreny bez aury proponowane przez IHS.....	43
Tabela 2.	Kryteria diagnostyczne migreny z aurą proponowane przez IHS.....	43
Tabela 3.	Fazy rozwijające stosowane w chromatografii kolumnowej, wstępny rozdział związków występujących w ekstrakcie chlorku metylenu z ziela <i>Stizolophus balsamitaefolius</i>	85
Tabela 4.	¹ H NMR balsaminy (600 MHz w CD ₃ Cl).....	87
Tabela 5.	¹ H NMR związku B (600.20 MHz w DMSO).....	90
Tabela 6.	¹³ C NMR związku B (150.20 MHz w DMSO).....	90
Tabela 7.	¹ H NMR stizolicyny (600.20 MHz w CD ₃ OH)	96
Tabela 8.	¹ H NMR izospiciforminy (600.20 MHz w CD ₃ OH).....	99
Tabela 9.	¹ H NMR stizoliny (600.20 MHz w CD ₃ OH).....	100
Tabela 10.	¹ H NMR 9α-hydroksypartenolid (600.20 MHz w CD ₃ Cl).....	102
Tabela 11.	Dane spektralne NMR dla związku H w porównaniu z 3-O-β-D-glukopiranozyd 3,4 dihydroksyfenylopropanolu..	108
Tabela 12.	Stężenie serotoniny w poszczególnych próbkach badanych i kontroli.....	120

XII. PIŚMIENICTWO

1. Abad M.J., Bermejo P., Villar A.: An approach to the genus *Tanacetum* L. (*Compositae*): Phytochemical and Pharmacological Review. *Phytoteraphy Research*, 1995, 9(2): 79-92
2. Anderson K.N., Bejcek B.E.: Parthenolide induces apoptosis in glioblastomas without affecting NF-kappaB. *J. Pharmacol. Sci.*, 2008, 106: 318–320
3. Arnason J.T., Mata R., Romeo J.T.: Phytochemistry of Medicinal Plants. *Recent Advances in Phytochemistry*, 1995, 29: 333-354
4. Aydın A.A., Zerbès V., Parlar H., Letzel T.: The medical plant butterbur (*Petasites*): analytical and physiological review. *J Pharm Biomed Anal.*, 2013, 5(75): 220-9
5. Baer-Dubowska W., Gnojkowski J., Chmiel J.: Inhibition of glycolytic enzymes by sesquiterpene lactones in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Folia Medica Cracoviensia*, 1980, 22(3-4): 393-402
6. Bańkowski E.: *Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych.* Wydanie trzecie, Edra Urban & Partner, Wrocław 2016, s.271-272
7. Barrero A.F., Oltra J.E., Álvarez M., Raslan D.S., Saúde D.A., Akssira M.: New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia*, 2000, 71(1): 60-64
8. Barsby R.W., Knight D.W., McFadzean I.: A chloroform extract of the herb feverfew blocks voltage-dependent potassium currents recorded from single smooth muscle cells. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 1993, 45(7) :641–645
9. Béjar E.: Parthenolide inhibits the contractile responses of rat stomach fundus to fenfluramine and dextroamphetamine but not serotonin. *J Ethnopharmacology*, 1996, 50(1): 1–12
10. Błoszyk E.: Aktywność przeciwmigrenowa laktonów seskwiterpenowych. *Herba Polonica*, 1998, 44(1): 65-78
11. Bobrow J.G., Cwielew N.N.: *Flora CCCP. Stizolophus balsamita* Cass. Wydawnictwo Nauka. P. 366. Moskwa, 1964

12. Borgdorff P., Tangelder G.J.: Migraine: Possible Role of Shear-Induced Platelet Aggregation With Serotonin Release. *Headache*, 2012, 52:1298-1318
13. Bork P.M., Schmitz M.L., Kuhnt M., Escher C., Heinrich M.: Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Letters*, 1997, 402(1): 85–90
14. Bottex-Gauthier C., Vidal D., Picot F., Potier P., Menichini F., Appendino G.: In vitro biological activities of arglabin, a sesquiterpene lactone from the Chinese herb *Artemisia myriantha* Wall. (*Asteraceae*). *Biotechnology Therapeutics*, 1993, 4(1-2): 77-98
15. Budesimsky M., Saman D., Nowak G., Drożdż B., Holub M.: 9 α -hydroksypartenolid from *Zoegea Laldschuanica* C. Winkl. And its absolute configuration. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, 1984, Vol. 49
16. Cassady J.M., Bean M.F., McLaughlin J.L., Aynehchi Y.: Structure revision and cytotoxicity of the germacranolide, stizolicin, from *Stizolophus balsamitus* (*Asteraceae*). *Experientia*, 1984
17. Cassady J.M., Chang C.J., McLaughlin J.E.: Recent advances in the isolation and structural elucidation of antineoplastic agents in higher plants. In: Beal JL, Reinhard E. (Eds.) *Natural products as medicinal agents*. Suppl. *Planta Medica*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1981, 93-124
18. Chaturvedi D.: Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry.10. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *India: Research Signpost*, 2011, 10: 313-334
19. Chemical Information Review Document for Butterbur (*Petasites hybridus*, ext.), CAS No. 90082-63-6]. Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program, 2009
20. Czyż M., Koprowska K., Sztiller-Sikorska M.: Parthenolide reduces the frequency of ABCB5-positive cells and clonogenic capacity of melanoma cells from anchorage independent melanospheres. *Cancer Biology & Therapy*, 2013, 14(2): 135–145
21. Czyż M., Lesiak-Mieczkowska K., Koprowska K., Szulawska-Mroczek A., Wozniak M.: Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 160(5): 1144–1157

22. Davis P.H., Kupicha F.K., Parris B.S.: The Flora of Turkey. Edinburgh University Press. 1975, 485
23. Deng Z.Q., Zheng H., Zhao L., Zhou S.Y., Li Y., Liang F.R.: Health economic evaluation of acupuncture along meridians for treating migraine in China: results from a randomized controlled trial. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 2012, 12:75
24. Deriu A., Zanetti S.A.L., Sechi L.A., Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuvèri E.: Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 31(6): 588–590
25. Dewick P.M.: Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, London 1998, s. 178
26. Diener H.C., Rahlfs V.W., Danesch U.: The first placebo-controlled trial of a special butterbur root extract for the prevention of migraine: reanalysis of efficacy criteria. *European Neurology*, 2004, 51(2): 89-97
27. Dietlmeier P.: Migrena i bóle głowy. Opieka farmaceutyczna – MedPharm Polska, Wrocław 2013
28. Dietlmeier P.: Migrena i bóle głowy. Opieka farmaceutyczna. MedPharm Polska, Wrocław 2013
29. Dittrich M., Petrak S., Rechinger K.H., Wagenitz G.: Flora Iranica. Akademischen Druck und Verlagsanstalt, Graz 1980, 332
30. Duechler M., Stańczyk M., Czyż M., Stepnik M.: Potentiation of arsenic trioxide cytotoxicity by Parthenolide and buthionine sulfoximine in murine and human leukemic cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacol.*, 2008, 61: 727–737
31. Döchler M., Stepnik M., Cytotoxic effects of a combination of three natural compounds to leukemia cells in vitro. *Cancer Therapy*, 2008, 6: 733–740
32. Erasto P., Grierson D.S., Afolayan A.J.: Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 106(1): 117–120
33. ESCOP Monographs. European Scientific Cooperative on Phytotherapy., *Tanacetii parthenii* herba, Thieme, New York, 2003
34. ESCOP Monographs. European Scientific Cooperative on Phytotherapy., *Matricariae* flos, Thieme, New York, 2003

35. Eikermann-Haerter K., Dileköz E., Kudo C., Savitz S.I., Waeber C., Baum M.J., Ferrari M.D., van den Maagdenberg A.M.J.M., Moskowitz M.A., Ayata C.: Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(1):99-109
36. Finocchi C., Sivori G.: Food as trigger and aggravating factor of migraine. *Neurological Sciences*, 2012, 33(1): 77-80
37. Fischer N.H., Olivier E.J., Fischer H.D.: *The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.* Springer-Verlag, Wien, New York 1979
38. Flemming M., Kraus B., Rasclé A., Jürgenliemk G., Fuchs S., Fürst R., Heilmann J.: Revisited anti-inflammatory activity of matricine in vitro: Comparison with chamazulene. *Fitoterapia*, 2015, 106:122-128
39. Fortuna A.M., Juárez Z.N., Bach H., Nematallah A., Gay-Av Y., Sánchez-Arreola E., Catalán C.A.N., Turbay S., Hernández L.R.: Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta*. *Phytochemistry*, 2011, 72(18): 2413–2418
40. Freudenstein J.: Experiences with the CO₂-extraction of *Tanacetum parthenium*. 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. Vienna, 1998; WSII/5
41. Ganzera M., Schneider P., Stuppner H.: Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sciences*, 2006, 78(8): 856–861
42. Geppert B., Drożdż B., Kielczewki M., Holub M.: Sesquiterpene lactones. XXIII. Isolation of sesquiterpene lactones from *Centaurea* L. species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1983, 52(1): 23-34
43. Ghantous A., Gali-Muhtasib H., Vuorela H., Saliba N.A., Darwiche N.: What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials. *Drug Discovery Today*, 2010, 15(15-16): 668-678
44. Giordano O.S., Guerreiro E., Pestchanker M.J., Guzman J., Pastor D., Guardia T.: The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *Journal of Natural Products*, 1990, 53(4): 803-809
45. Goebel H.: Classification of headaches. *Cephalalgia*, 2001, 21:770-773

46. Gören N., Jakupovic J., Topal S.: Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* var. *argyrophyllum*. *Phytochemistry*, 1990, 29(5): 1467-1469
47. Grech-Baran M., Pietrosiuk A.: Arglabina – lakton seskwiterpenowy o właściwościach przeciwnowotworowych. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM*, 2010, 3: 22-26
48. Groenewegen W.A., Heptinstall S.: A comparison of the effects of an extract of feverfew and parthenolide, a component of feverfew, on human platelet activity in vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1990; 42(8): 553-557
49. Hall I.H., Lee K.H., Starenes C.O., Sumida Y., Wu R.Y., Waddell T.G., Cochran J.W., Gerhart K.G.: Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1979, 68(5): 537–542
50. Hall I.H., Lee K.H., Starenes C.O., Waddell T.G.: Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1980, 69(5): 537-543
51. Harborne J.B., Swain T.: *Perspectives in Phytochemistry*. Academic Press, New York 1969
52. *Headache Classification* Subcommittee of the International Headache Society. *Classification of the Headache Disorders*, 2nd ed. *Cephalgia* 2004; 24(1): 1-151
53. Heptinstall S., Groenewegen W.A., Spangenberg P., Loesche W.: Extracts of feverfew may inhibit platelet behavior via neutralization of sulphhydryl groups. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1987, 39(6): 459-465
54. Heptinstall S., White A., Williamson L., Mitchell J.R.A.: Extracts of feverfew inhibit granule secretion in blood platelets and polymorphonuclear leucocytes. *The Lancet*, 1985, 325(8437): 1071-1074
55. Herz W.: Sesquiterpene lactones in the *Compositae*. In: V.H. Heywood, J.B. Harborne and B.L. Turner (eds.). *The biology and chemistry of the Compositae*. Academic Press, London 1997, 337-357
56. Hładoń B., Bobkiewicz T., Drożdż B.: Sesquiterpene lactones . Part XIX. Preliminary studiem on the mode of action. Inhibition of synthesis of tumor cells protein and RNA. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 1977; 25(2): 243-251

57. Hładoń B., Chodera A.: Sesquiterpene lactones XVII. Cytostatic and pharmacological activity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 1975, 23(6): 857-865
58. Horoszkiewicz-Hassan M.: Izolacja, identyfikacja i badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej laktonów seskwiterpenowych z wybranych gatunków rodzaju *Centaurea* L. Rozprawa doktorska, AM Poznań, 2004
59. Hu X.H., Markson L.E., Lipton R.B., Stewart W.F., Berger M.L.: Burden of migraine in the United States: disability and economic costs. *Archives of Internal Medicine*, 1999, 159(8): 813-818
60. Hwang D., Fischer N.H., Jang B.C., Tak H., Kim J.K., Lee W.: Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1996, 226(3): 810–818
61. Janczak-Bazan A.: Migrena – teorie na temat patogenezy, osiągnięcia medycyny. *Nowiny Lekarskie*, 2001; 5(70): 542-553
62. Janecka A., Wyrebska A., Gach K., Fichna J., Janecki T.: Natural and synthetic α -methylenelactones and α -methylenelactams with anticancer potential. *Drug Discovery Today*, 2012, 17(11-12): 561-572
63. Johnson E.S., Kadam N.P., Hylands D.M., Hylands P.J.: Efficacy of feverfew as prophylactic treatment of migraine. *British Medical Journal*, 1985, 291(6495): 569-573
64. Johnson E.S.: Patients who chew chrysanthemum leaves. *MIMS Magazine*, 1983, 15: 32-5
65. Kälín P.: The common butterbur (*Petasites hybridus*) - portrait of a medicinal herb. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.*, 2003, 10(1): 41-44
66. Kączkowski J.: *Biochemia roślin*. Tom II. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1993
67. Kemper K.J.: Blessed Thistle (*Cnicus Benedictus*). The Longwood Herbal Task Force, 1999
68. Kemper K.J.: Feverfew (*Tanacetum parthenium*). Longwood Herbal Task Force, 1999
69. Kim H.J., Hawke N., Baldwin A.S.: NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differentiation*, 2006, 13(5): 738–747

70. Kisiel W.: Laktony seskwiterpenowe w chemotaksonomii *Compositae*. Wiadomości Botaniczne, 1990, 34(1): 13-18
71. Kohlmünzer S.: Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003, s. 290
72. Kolhir V.K., Bykov V.A., Baginskaja A.I., Sokolov S.Y., Glazova N.G., Leskova T.E., Sakovich G.S., Tjukavkina N.A., Kolesnik Y.A., Rulenko I.A.: Antioxidant Activity of a Dihydroquercetin Isolated from *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. Wood. Phytotherapy Research, 1996, 10(6): 478-482
73. Koprowska K., Czyż M.: Molekularne mechanizmy działania partenolidu - stary lek z nową twarzą. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2010, 64: 100-114
74. Korycka A., Góra -Tybor J., Robak T.: Farmakologia i perspektywy klinicznego zastosowania selektywnego inhibitora białkowej farnezylotransferazy R115777. Acta Haematologica Polonica, 2001, 32(4): 367-374
75. Kowalewski Z., Kedzia W., Koniar H.: Action of helenin on microorganisms. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz), 1976, 24(1): 121-125
76. Kuzawińska O., Lis K., Cessak G., Bałkowiec-Iskra E.: Znaczenie CGRP w patogenezie i leczeniu migreny. Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii, 2015, 31(2): 127–140
77. Kwok H.B., Koh B., Ndubuisi I.M., Elofsson M.; Crew C.M.: The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. Chemistry & Biology, 2001, 8(8): 759-766
78. Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J.: Fitoterapia i leki roślinne. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007, s. 93, 156, 295
79. Lauritzen M.: Cortical spreading depression in migraine. Cephalalgia, 2001, 21: 757-760
80. Lee K.H. Toshiro I. , Wu R.Y., Geissman T.A.: Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. Phytochemistry, 1977, (16)8: 1177-1181
81. Lesiak K., Koprowska K., Zalesna I., Nejc D., Duchler M., Czyż M.: Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows

- anticancer activity against human melanoma cells in vitro. *Melanoma Research*, 2010, 20(1): 21–34
82. Linde K., Allais G., Brinkhaus B., Manheimer E., Vickers A., White A.R., Acupuncture for migraine prophylaxis. National Institutes of Health. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2009, (1): CD001218
 83. Linde M, Gustavsson A, Stovner LJ, Steiner TJ, Barré J, Katsarava Z, et al. The cost of headache disorders in Europe: the Eurolight project. *Eur J Neurol*. 2012, 19(5): 703-11
 84. Lipton R.B.: Epidemiology and burden of headache. *Advanced Studies in Medicine*, 2001, 1(11): 442-445
 85. Lipton R.B, Bigal M.E.: Migraine: Epidemiology, Impact, and Risk Factors for Progression. *Headache*, 2005, 45(1): 3-13
 86. Liu Z., Liu S., Xie Z., Pavlovicz R.E., Wu J., Chen P., Aimiwu J., Pang J., Bhasin D., Neviani P., Fuchs J.R., Plass C., Li P.K., Li C., Huang T.H., Wu L.C., Rush L., Wang H., Perrotti D., Marcucci G., Chan K.K.: Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2009, 329: 505–514
 87. Lone S.H., Bhat K.A., Khuroo M.A.: Arglabin: From isolation to antitumor evaluation. *Chemico- Biological Interactions*, 2015, 240: 180-898
 88. Lyss G., Knorre A., Schmidt T.J., Pahl H.L., Merfort I.: The Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF-kappaB by Directly Targeting p65. *Journal of biological chemistry*, 1998, 273(50): 33508-33516
 89. Ma C., Yang L., Wang W., Yang F., Zhao C., Zu Y.: Extraction of dihydroquercetin from *Larix gmelinii* with ultrasound-assisted and microwave-assisted alternant digestion. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(7): 8789-8804
 90. Makheja A.N., Bailey J.M.: A platelet phospholipase inhibitor from the medicinal herb feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 1982, 8(6): 653-660
 91. Maoz M., Kashman Y., Neeman I.: Isolation and Identification of a New Antifungal Sesquiterpene Lactone from *Inula viscosa*. *Planta Medica*, 1999, 65(3): 281-282

92. Marles R.J., Kaminski J., Arnason T.: A bioassay for inhibition of serotonin release from bovine platelets. *Journal of Natural Products*, 1992, 55(8): 1044-1056
93. Mathema V.B., Koh Y.S., Thakuri B.C., Sillanpää M.: Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone, Expresses Multiple Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities. *Inflammation*, 2012, 35(2): 560-566
94. Mauskop A., Altura B.M.: Role of magnesium in the pathogenesis and treatment of migraines. *Clinical Neuroscience*, 1998, 5(1): 24-27
95. Mauskop A., Varughese J.: Why all migraine patients should be treated with magnesium. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 2012, 119(5): 575-579
96. Millichap J.G., Yee M.M.: The diet factor in pediatric and adolescent migraine. *Pediatric Neurology*, 2003, 28(1): 9–15
97. Minucci S., Pelicci P.G.: Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(1): 38–51
98. Mittra S., Datta A., Singh S.K., Singh A.: 5-Hydroxytryptamine inhibition property of Feverfew: role of parthenolide content. *Acta Pharmacol Sin.*, 2000, 21(12): 1106-1114
99. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P.: *Farmakologia i toksykologia. Podręcznik. Wydanie IV, polskie poprawione*, MedPharma Polska, Wrocław 2016, 231
100. Nawrot J., Kaczerowska-Pietrzak K., Nowak G.: *Fitoterapia migreny. W Lekach pochodzeni naturalnego. 2^{ed}. Nawrot J., Nowak G. (eds) Wydawnictwo naukow UMP. Poznań 2017 (podręcznik w druku)*
101. Nawrot J., Dawid-Pać R., Kaczerowska-Pietrzak K., Urbańska M., Nowak G.: *9 α -hydroxyparthenolide in *Zoegea lept aurea* subsp. *mesopotamica* (Czerep.) Rech. (Asteraceae).Herba Pol.*, 2015, 61(2): 7-13
102. Nowak G.: A chemotaxonomic study of sesquiterpene lactones from subtribe Centaurea of the Compositae. *Phytochemistry*, 1992, 31(7): 2363-2368
103. Nowak G.: Chromatography of Twenty-six Sesquiterpene Lactones from *Centaurea bella*. *Chromatographia*, 1993, 35(5/6): 325-328

104. Nowak G., Dawid-Pa  R., Urbańska M., Nawrot J.: TLC of selected sesquiterpenoids of the *Asteraceae* family. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2011, XXX (DOI:10.5586/xxx)
105. Nowak G., Drożdż B., Buděšínský M., Holub M.: Sesquiterpene lactones XXXVII. Germacranolides in the genus *Stizolophus* Cass. *Acta Soc Bot Pol.* 1989, 58(2):247-251(a)
106. Nowak G., Drożdż B., Holub M.: Sesquiterpene lactones of the Cardueae, subtribe Centaureinae. In D.J.N. Hind & H.J. Beentje (eds). *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew 1994, 1: 219-227
107. Nowak G., Holub M., Buděšínský M.: Sesquiterpene lactones. XXXVI. Sesquiterpene lactones in several subgenera of the genus *Centaurea* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1989, 58(1): 95-102 (b)
108. Nowak G., Urbańska M., Nawrot J., Bernard M.K., Dawid-Pa  R: Color and Chemical Reactions of Selected Sesquiterpene Lactones and Ecdysones from *Asteraceae* on TLC Plates. *Journal of Planar Chromatography*, 2013, 26(3)
109. O zarowski M., Przystanowicz J., Adamczak A.: Phytochemical, pharmacological and clinical studies of *Petasites hybridus* (L.). P. Gaertn., B. Mey. & Scherb. A review. *Herba Polonica*, 2014, 59(4): 108-128
110. Pareek A., Suthar M., Rathore G. S., Bansal V.: Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacognosy Reviews*, 2011, 5(9): 103–110
111. Peikert A., Wilimzig C., K hne-Volland R.: Prophylaxis of migraine with oral magnesium: results from a prospective, multi-center, placebo-controlled and double-blind randomized study. *Cephalalgia*, 1996, 16(4): 257-263
112. Pickman A. K., Towers G.H.N.: Antibacterial Activity of Sesquiterpene Lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1983, 11(4): 321-327
Pickman A.K.: Antifungal activity of helenin and isohelenin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1983, 11(3): 183-186
113. Pickman A.K.: Antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1984, 12(1): 13-18
114. Pickman A.K.: Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1986, 14(3): 255-281

115. Pietrobon D.: Insights into migraine mechanisms and CaV2.1 calcium channel function from mouse models of familial hemiplegic migraine. *Journal Physiology*, 2010, 588.11: 871–1878
116. Prusiński A.: Bóle głowy. Biblioteka Lekarza Praktyka [w]: Bóle głowy w chorobach ogólnoustrojowych, układowych i narządowych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999, s. 48, 68, 76, 77
117. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. Wielosz M. : Farmakologia kliniczna. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2001, s. 159-161, 163, 164-165, 370
118. Rodriguez E., Towers G.H.N., Mitchell J.C.: Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 1976, 15(11): 1573-1580
119. Rozen T.D., Oshinsky M.L., Gebeline C.A., Bradley K.C., Young W.B., Shechter A.L., Silberstein S.D. Open label trial of coenzyme Q10 as a migraine preventive. *Cephalalgia*, 2002, 22(2): 137-141
120. Sacks O.: Migrena. Zysk i S-ka, 2012, s.289, 291, 295
121. Schneider G.: Pharmazeutische Biologie. Bibliographisches Institut. Mannheim, Wien, Zürich, 1985
122. Seaman F.C.: Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the *Asteraceae*. *The Botanical Review*, 1982, 48(2): 123–551
123. Sharp M.: Żywnienie w migrenowych bólach głowy. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2005, s. 30-35
124. Shu L., Cheung K.-L., Khor T.O., Chen C., Kong A.-N.: Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer and Metastasis Review*, 2010, 29(3): 483–502
125. Siemieniuk E., Skrzydlewska E.: Koenzym Q10 – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2005, 59: 150-159
126. Sieniawska E.: Mieć globusa, czyli o migrenie. *Aptekarz Polski* 2011, 55: 11-14
127. Silberstein S.D., Holland S., Freitag F., Dodick D.W., Argoff C., Ashman E.: Evidence-based guideline update: Pharmacologic treatment for episodic migraine prevention in adults: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society. *Neurology*, 2012, 78(17): 1337-1345

128. Somer E.: Encyklopedia witamin i składników mineralnych. Wydawnictwo Amber, Warszawa 2000
129. Spierings E. L.H.: Migrena - praktyczny poradnik. Wydawnictwo Medyczne Via Medica, Gdańsk 2006, s. 16-24, 33
130. Schrüks M., Rist P.M., Bigal M.E., Buring J.E., Lipton R.B., Kurth T.: Migraine and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2009, 339:h3914
131. Stępień A.: Bóle głowy - diagnostyka i leczenie. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004, s. 35, 38, 41, 42, 43, 44, 50
132. Stępień A.: Bóle głowy. Patofizjologia, Diagnostyka, Leczenie. Medical Tribune Polska, Warszawa 2010
133. Stępień A.: Migrena i jej postaciach klinicznych. Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2009, s. 20, 25, 95, 103, 110, 111, 114
134. Stovner LJ, André C, and On behalf of the Eurolight Steering Committee. Impact of headache in Europe: a review for the Eurolight project. *J Headache Pain* 2008; 9: 139-146
135. Strzelecka H., Kowalewski J.: Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000, s. 290-291
136. Stuessy T. F.: Plant Taxonomy: The Systematic Evaluation of Comparative Data. Columbia University Press, Nowy Jork, 2009, s. 239-242
137. Suleimenov E. M., Morozova O.V., Raldugin V.A., Gatilov Y.V., Rybalova T.V., Shakirov M.M., Seidakhmetov R., Aksartov R.M., Adekenov S.M.: Sesquiterpene lactones from *Stizolophus balsamita* and their biological activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 2005, 41(5)
138. Sur R., Martin K., Liebel F., Lyte P., Shapiro S., Southall M.: Anti-inflammatory activity of parthenolide-depleted Feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Inflammopharmacology*, 2009, 17(1): 42-49
139. Toru I., Yukiko S., and Junichi K.: Water-Soluble Constituents of Ajowan. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 49(7):840-844
140. Tyson RL, Chang C, Laughlin JL, Ayenhchi Y, Cassady JM. 9 α -hydroxy parthenolide, a novel antitumor sesquiterpene lactone from *Anvillea garcinii* (Burm.) DC. *Experientia* 1981, 37:441-442
141. Urbańska M., Nawrot J., Dawid-Pač R., Kaczerowska-Pietrzak K., Morağ M., Ratajczak L., Nowak g.: Detection of pharmacological active compounds of the

- Asteraceae family and their chemotaxonomical implications. *Journal of Plant Sciences*, 2014, 2(5): 187-191
142. Vormann J.: Magnesium: nutrition and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003, 24, 27-37
143. Vousden K.H., Prives C.: Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 2009, 137(3): 413–431
144. Wang L., Wang J., Li F., Liu X., Chen B., Tang Y.X., Wang M.K.: Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from Aerial Parts of *Xanthium sibiricum*. *Planta Medica*, 2013, 79(8): 661-665
145. Watson C., Miller D.A., Chin-Sinex H., Losch A., Hughes W., Sweeney C., Mendonca M.S.: Suppression of NF-kappaB activity by parthenolide induces X-ray sensitivity through inhibition of split-dose repair in TP53 null prostate cancer cells. *Radiation Research*, 2009, 171(4): 389–396
146. Williams C.A., Houtt J.R., Harborne J.B., Greenham J., Eagles J.: A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, 1995, 38(1): 267-270
147. World Health Organization (WHO). Headache disorders. Fact sheet No. 277, April 2016. Pozyskano z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs277/en/>
148. Wyrębska A., Szymanski J., Gach K., Piekielna J., Koszuk J., Janecki T., Janecka A.: Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(2): 1655–1663
149. Yesilada E., Gürbüz I., Bedir E., Tatli I., Khan I.A.: Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 95(2-3): 213–219