

Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



Anna Adamska

**Aktywność cytotoksyczna ekstraktów i głównych
metabolitów wtórnych nasion czarnuszki siewnej**

Nigella sativa

ROZPRAWA DOKTORSKA

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

Promotor pracy:
prof. dr hab. J. Renata Ochocka

Gdańsk, 2019

Składam serdeczne podziękowania

Pani Prof. dr hab. Renacie Ochockiej

za inspirację podjęcia niniejszej pracy oraz cenne uwagi. Ponadto, jestem wdzięczna za życzliwość, wyrozumiałość, poświęcony czas i okazaną pomoc w trakcie tworzenia niniejszej pracy doktorskiej.

Mojej Rodzinie za nieocenione wsparcie i motywację w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej za okazaną pomoc oraz życzliwość.

Pracę tę dedykuję mojej Mamie.

Praca obejmuje wyniki dotychczas nieopublikowane oraz zawarte w następujących publikacjach:

Oryginalne prace eksperymentalne:

1. Stefanowicz-Hajduk J, Adamska A, Bartoszewski R, Ochocka JR. Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. *Biotechniques*. 2016;61(3):117-22
2. Adamska A, Stefanowicz-Hajduk J, Ochocka J. Alpha-Hederin, the Active Saponin of *Nigella sativa*, as an Anticancer Agent Inducing Apoptosis in the SKOV-3 Cell Line. *Molecules*. 2019;24(16).

Prace przeglądowe:

1. Adamska A, Ochocka JR. *Nigella sativa* źródłem związków bioaktywnych. *Post. Fitoter.* 2016. p. 97-105.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	9
STRESZCZENIE	12
ABSTRACT	14
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	16
1. Charakterystyka botaniczna gatunku <i>Nigella sativa</i>	16
1.1. Systematyka.....	16
1.2. Występowanie, morfologia.....	16
1.3. Skład chemiczny <i>Nigella sativa</i>	18
1.4. Znaczenie, właściwości farmakologiczne i zastosowanie lecznicze <i>Nigella sativa</i>	21
1.5. Aktywność biologiczna ekstraktów <i>Nigella sativa</i>	23
1.6. Aktywność biologiczna α -hederyny	24
2. Badania cytotoksyczności ekstraktów i metabolitów roślinnych w warunkach <i>in vitro</i>	27
2.1. Metody badania cytotoksyczności	27
2.2. Zastosowanie elektrycznej impedancji i systemu Real-Time Cell Analysis	27
3. Linia komórkowa raka jajnika SKOV-3, RAK JAJNIKA	30
II. CELE PRACY.....	33
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	35
1. Aparatura i sprzęt.....	35
1.1. Sporządzanie ekstraktów	35
1.2. Hodowla komórkowa	35
1.3. Badanie cytotoksyczności za pomocą systemu RTCA.....	36
1.4. Badanie cytotoksyczności metodą MTT:	36
1.5. Badanie zmian w jądrze komórkowym badanych komórek (barwienie Hoechst)	37
1.6. Badanie mechanizmu działania <i>in vitro</i> α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3 za pomocą cytometrii przepływowej.....	37
1.7. Badanie aktywności kaspaz 8/9	37
1.8. Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC-UV	37
2. Odczynniki.....	38
2.1. Sporządzanie ekstraktów	38
2.2. Hodowla komórkowa	38
2.3. Badanie cytotoksyczności za pomocą systemu RTCA.....	38

2.4.	Badanie cytotoksyczności metodą MTT	39
2.5.	Badanie zmian w jądrze komórkowym badanych komórek.....	39
2.6.	Badanie mechanizmu działania <i>in vitro</i> α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3 za pomocą cytometrii przepływowej.....	39
2.6.1.	Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych (test z aneksyną)	39
2.6.2.	Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach.....	39
2.6.3.	Określenie spadku aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2.....	39
2.6.4.	Określenie aktywności kaspaz-3/7 w badanych komórkach.....	39
2.6.5.	Badanie zahamowania fazy cyklu komórkowego.....	40
2.7.	Badanie aktywności kaspaz-8/9.....	40
2.8.	Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC-UV	40
3.	Materiał do badań	41
3.1.	Nasiona <i>Nigella sativa</i> L.	41
3.2.	α -hederyna	41
3.3.	Linie komórkowe.....	41
4.	Metodyka	42
4.1.	Sporządzenie ekstraktów roślinnych i frakcji <i>Nigella sativa</i>	42
4.2.	Metody badań aktywności cytotoksycznej ekstraktów, frakcji <i>Nigella sativa</i> oraz α -hederyny	45
4.2.1.	Określenie aktywności cytotoksycznej <i>in vitro</i> ekstraktów, frakcji oraz α -hederyny na wybranych liniach komórkowych za pomocą systemu RTCA	45
4.2.2.	Regeneracja E-płytek w systemie RTCA.....	46
4.2.3.	Określenie aktywności cytotoksycznej <i>in vitro</i> ekstraktów, frakcji oraz α -hederyny na wybranych liniach komórkowych za pomocą testu MTT	49
4.3.	Metody badań fitochemicznych metabolitów wtórnych z gatunku <i>Nigella sativa</i>	50
4.3.1.	Analiza HPLC wybranych ekstraktów oraz frakcji otrzymanych z <i>Nigella sativa</i>	50
4.3.2.	Analiza identyfikacyjna związku pozyskanego z frakcji <i>Nigella sativa</i>	50
4.4.	Metody badań mechanizmu działania α -hederyny w hodowli komórkowej raka jajnika, SKOV-3	51
4.4.1.	Określenie zmian w jądrze komórkowym linii SKOV-3 (barwienie Hoechst)	51
4.4.2.	Badanie <i>in vitro</i> mechanizmu działania cytotoksycznego α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3	51

4.4.2.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych.....	53
4.4.2.2. Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach SKOV-3	53
4.4.2.3. Określenie spadku aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2 w hodowli SKOV-3	54
4.4.2.4. Określenie aktywności kaspaz-3/7 w badanych komórkach SKOV-3	54
4.4.2.5. Badanie zahamowania fazy cyklu komórkowego w hodowli SKOV-3	55
4.4.3. Określenie aktywacji kaspaz-8/9 w hodowli SKOV-3 za pomocą luminometru	55
4.5. Analiza statystyczna	57
IV. WYNIKI I DYSKUSJA	59
1. Wyniki badań aktywności cytotoksycznej ekstraktów i frakcji <i>Nigella sativa</i>	59
1.1. Wyniki aktywności cytotoksycznej <i>in vitro</i> ekstraktów roślinnych z <i>Nigella sativa</i>	59
1.2. Wyniki aktywności cytotoksycznej <i>in vitro</i> frakcji roślinnych z <i>Nigella sativa</i>	63
2. Wyniki badań fitochemicznych frakcji gatunku <i>Nigella sativa</i>	70
2.3. Wyniki analizy HPLC wybranych frakcji otrzymanych z ekstraktów nasion <i>Nigella sativa</i>	70
2.4. Identyfikacja pochodnej hederageniny w nasionach <i>Nigella sativa</i>	73
3. Wyniki aktywności cytotoksycznej <i>in vitro</i> α -hederyny na wybranych liniach komórkowych.....	77
4. Wyniki działania frakcji „N” na komórki SKOV-3	79
4.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych.....	79
4.2. Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach SKOV-3	86
4.3. Określenie spadku aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2 w hodowli SKOV-3	89
5. Wyniki badań mechanizmu działania α -hederyny w hodowli komórkowej raka jajnika, SKOV-3	92
5.1. Określenie zmian w jądrze komórkowym badanych komórek (barwienie Hoechst) pod wpływem działania α -hederyny	92
5.2. Wyniki badań <i>in vitro</i> mechanizmu działania cytotoksycznego α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3	94
5.2.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych	94
5.2.2. Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach SKOV-3.....	99
5.2.3. Określenie aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2 w hodowli SKOV-3.....	103
5.2.4. Określenie aktywności kaspaz-3/7 w badanych komórkach SKOV-3	106

5.2.5.	Badanie zahamowania fazy cyklu komórkowego w hodowli SKOV-3	111
5.3.	Określenie aktywacji kaspaz-8/9 w hodowli SKOV-3 za pomocą luminometru	113
V.	PODSUMOWANIE	120
VI.	WNIOSKI	123
VII.	PIŚMIENNICTWO	125
VIII.	WYKAZ ILUSTRACJI I TABEL.....	139

Wykaz skrótów

- ATCC (*ang. American type culture collection*) – Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych
- ATP – adenozy-5'-trifosforan, nukleotyd adeninowy, molekularna jednostka w wewnątrzkomórkowym transporcie energii
- APAF-1- czynnik aktywacji proteaz apoptotycznych
- Bcl-2 – heterogenna grupa białek regulująca proces apoptozy
- BRCA (*ang. breast cancer*) – geny człowieka, których mutacje mogą stać się przyczyną dziedzicznych form raka piersi i jajnika
- DAD (*ang. diode array detector*) – detektor z matrycą diodową
- DMEM (*ang. Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) – rodzaj pożywki hodowlanej Eagle'a Dubelcco
- DMSO (*ang. dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek
- EACC (*ang. The European Collection of Cell Cultures*) – Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych
- E-płytki (*ang. E-plate*) – płytki stosowane w systemie Real Time xCELLigence
- EZ4U – test oceny proliferacji komórek i cytotoksyczności oparty na redukcji soli tetrazoliowej, firmy Biomedica, GmbH, Austria
- GABA - kwas gamma-aminomasłowy, organiczny związek chemiczny należący do grupy aminokwasów, pełni funkcję podstawowego neuroprzekaźnika o działaniu hamującym
- HaCaT – nienowotworowa linia ludzkich keratynocytów
- HeLa – linia ludzkich komórek raka szyjki macicy
- HPLC (*ang. high performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
- IC₅₀ (*ang. inhibitory concentration*) – stężenie związku, przy którym proliferacja komórek jest zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych
- IL-6 – interleukina 6, jeden z najważniejszych i najbardziej wielokierunkowo działających cytokin
- iNOS – indukowalna syntaza tlenu azotu
- LDH – dehydrogenaza mleczanowa
- MCF-7 – komórki estrogenozależnego raka sutka

- mRNA (*ang. messenger RNA*) – matrycowy rodzaj kwasu nukleinowego
- MTT – bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolowy
- NF- κ B (*ang. nuclear kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) – kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny
- NMR (*ang. nuclear magnetic resonance*) – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
- PARP – polimerazy poli-ADP-rybozy, białko katalizujące polimeryzację jednostek ADP-rybozy
- PBS (*ang. phosphate-buffered saline*) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
- PS (*ang. phosphatidylserine*) – fosfatydyloseryna
- RTCA (*ang. Real Time xCeLLigence*) – system do monitorowania proliferacji komórek adherentnych w czasie rzeczywistym
- SDS-PAGE (*ang. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) – to wariant elektroforezy w żelu poliakryloamidowym wykorzystujący cząsteczki dodecylosiarczanu sodu (SDS); służy do rozdzielania naładowanych cząsteczek w mieszaninach według ich mas cząsteczkowych w polu elektrycznym
- SKOV-3 – linia komórkowa raka jajnika
- $\Delta\Psi_m$ – elektrochemiczny potencjał mitochondrialny
- \pm SD – odchylenie standardowe
- α -HN - α -hederyna
- TLC (*ang. thin layer chromatography*) – chromatografia cienkowarstwowa
- TNF- α (*ang. tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów
- UAE (*ang. ultrasound assisted extraction*) – ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami
- UPLC-Q-TOF-MS (*ang. Ultra Performance Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry*) - ultra sprawna chromatografia cieczowa sprzężona z analizatorem czasu przelotu z jonizacją metodą rozpylania w polu elektrycznym
- UV –promieniowanie ultrafioletowe, promieniowanie nadfioletowe; promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali od 10nm do 400nm
- WST (*ang. Water-soluble Tetrazolium salts*) – kolorymetryczny test określający żywotność komórek oparty na konwertowaniu soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego formazanu

- XTT – test kolorymetryczny określający żywotność komórek na podstawie redukcji soli tetrazolowej do formazanu, jednak w przeciwieństwie do testu MTT, produkt formazanu pochodzący z XTT jest rozpuszczalny w wodzie

STRESZCZENIE

Nigella sativa, czarnuszka siewna, jest gatunkiem należącym do rodziny *Ranunculaceae*, pochodzi z południowej Europy i Zachodniej Azji, w Polsce jest uprawiana i czasami miejscowo dziczejąca. Gatunek ten był cenionym surowcem już za czasów starożytnych, zaś w tradycji islamu uznawany był za panaceum.

W dzisiejszych czasach nasiona czarnuszki stanowią obiekt badań wielu ośrodków naukowych, szczególnie w krajach Bliskiego Wschodu. Większość badań dotyczyła szeroko wykorzystywanego olejku z czarnuszki siewnej i aktywności obecnego w nim tymochinonu. Tylko pojedyncze doniesienia dotyczyły badań ekstraktów z nasion, w tym aktywności przeciwnowotworowej. W piśmiennictwie, mimo stwierdzonej w nasionach *Nigella sativa* obecności wtórnych metabolitów z grupy triterpenowych saponin, w tym występowania α -hederyny, brak jest wystarczających informacji o badaniach dotyczących aktywności cytotoksycznej tej grupy związków. W piśmiennictwie nie ma również żadnych informacji na temat wpływu α -hederyny na linię komórkową SKOV-3 ludzkiego raka jajnika.

Przygotowanie ekstraktów i frakcji z *Nigella sativa* obejmowało zastosowanie rozpuszczalników o różnej sile elucji, w klasycznej metodzie ekstrakcji i wspomaganej ultradźwiękami – UAE (ultrasound assisted extraction). Najwyższą aktywnością cytotoksyczną odznaczały się ekstrakty wodno-etanolowe (50% v/v) otrzymane z zastosowaniem UAE.

W pracy dokonano oceny działania ekstraktów i ich frakcji z nasion *Nigella sativa* na komórki linii nowotworowych: linii komórkowej raka szyjki macicy HeLa, linii komórkowej raka jajnika SKOV-3 i nienowotworowej linii komórek ludzkich keratynocytów. Najwyższą aktywnością cytotoksyczną wykazano dla frakcji, w których stwierdzono obecność α -hederyny. Badania aktywności cytotoksycznej prowadzono za pomocą dwóch metod: systemu Real-Time xCELLigence oraz testu MTT.

Szczegółowym badaniom poddano wpływ α -hederyny na linię komórkową SKOV-3. Przeprowadzając badania zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach, określając spadek aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2, określając aktywność kaspaz-3/7 i -8/9 oraz badając zahamowania fazy cyklu komórkowego w hodowli SKOV-3, dowiedziono, że w komórkach tej linii pod wpływem działania α -hederyny,

dochodzi do indukcji procesu apoptozy. Stwierdzono również, że znaczącą rolę w tym procesie odgrywa wewnętrzny szlak mitochondrialny.

Przeprowadzone badania znacząco pogłębiają wiedzę na temat aktywności biologicznej nasion *Nigella sativa* oraz mechanizmu działania aktywności cytotoksycznej α -hederyny w stosunku do linii komórkowej SKOV-3 ludzkiego raka jajnika.

ABSTRACT

Nigella sativa, black cumin, is a species belonging to the family *Ranunculaceae*, native to southern Europe and West Asia, in Poland it is cultivated and sometimes locally wild. This species was a valued resource already in ancient times, while in the Islamic tradition it was considered a panacea.

Nowadays, black cumin seeds are the subject of research in many scientific centres, especially in the Middle East. Most studies concerned the widely used black cumin oil and the activity of thymoquinone present in it. Only single reports concerned studies of seed extracts, including anti-cancer activity. In the literature, despite the presence of secondary metabolites from the triterpene saponin group in *Nigella sativa* seeds, including the presence of α -hederin, there is an insufficient information on studies on the cytotoxic activity of this group of compounds. There is also no information in the literature about the effect of α -hederin on the SKOV-3 human ovarian cancer cell line.

Preparation of extracts and fractions from *Nigella sativa* included the use of solvents with different elution strength, in the classical method of extraction and assisted by ultrasound - ultrasound assisted extraction (UAE). The highest cytotoxic activity was found in water-ethanol extracts (50% v / v) obtained using UAE.

The work evaluates the effect of extracts and their fraction from *Nigella sativa* seeds on cancer cell lines: HeLa cervical cancer cell line, SKOV-3 ovarian cancer cell line and non-cancer human keratinocyte cell line. The highest cytotoxic activity was demonstrated for the fractions in which the presence of α -hederin was found. Cytotoxic activity studies were conducted using two methods: Real-Time xCELLigence system and MTT assay.

The effect of α -hederin on the SKOV-3 cell line was subjected to detailed studies. While conducting studies of: mitochondrial potential changes in cells, determining the decrease in Bcl-2 antiapoptotic protein activation, determining caspase-3/7 and -8/9 activity and studying cell cycle phase inhibition in SKOV-3 culture, it was proved that in this cell line being influenced by the action of α -hederin, the process of apoptosis is induced. It has also been found that an internal mitochondrial pathway plays a significant role in this process.

The conducted research significantly broadens our knowledge about the biological activity of *Nigella sativa* seeds and the mechanism of action of cytotoxic activity of α -hederin in relation to the SKOV-3 cell line of human ovarian cancer.

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna gatunku *Nigella sativa*

1.1. Systematyka

Nigella sativa niezależnie od zastosowanych systemów taksonomicznych przynależy do rodziny *Ranunculaceae*. Poniższa systematyka zgodna jest z systemem Cronquista (1)

Domena:	<i>Eukaryota</i> (jądrowe)
Królestwo:	<i>Plantae</i> (rośliny)
Podkrólestwo:	<i>Tracheobionta</i> (naczyniowe)
Nadgromada:	<i>Spermatophyta</i> (nasienne)
Gromada:	<i>Magnoliophyta</i> (okrytonasienne)
Klasa:	<i>Magnoliopsida</i> (dwuliścienne)
Podklasa:	<i>Magnoliidae</i> (magnoliowe)
Rząd:	<i>Ranunculales</i> (jaskrowce)
Rodzina:	<i>Ranunculaceae</i> (jaskrowate)
Rodzaj:	<i>Nigella</i> (czarnuszka)
Gatunek:	<i>Nigella sativa</i> (czarnuszka siewna)

1.2. Występowanie, morfologia

Występowanie

Nigella sativa, czarnuszka siewna pochodząca z rodziny jaskrowatych, *Ranunculaceae* (2-4), występuje w stanie naturalnym w strefach umiarkowanych i subtropikalnych, na suchych terenach basenu Morza śródziemnego: południowo-wschodniej Europy, północnej Afryki, a także na terenie Bliskiego Wschodu. W Polsce

jest uprawiana, głównie na południu kraju, czasem miejscowo zdziczała, spotykana wśród zbóż, na siedliskach ruderalnych (5-7).

Morfologia

Czarnuszka siewna, jako jednoroczna roślina zielna, dorasta do 40 cm, ma prostą i sztywną, bądź lekko rozgałęzioną łodygę ulistnioną skrętolegle. Pokrój rośliny został przedstawiony na Ryc. 1.



Ryc. 1. *Nigella sativa*, Fot. Anna Adamska

Liście *Nigella sativa* są barwy jasnozielonej, podwójnie pierzastosieczne o równowąskich odcinkach, zaś korzeń palowy. Czarnuszka kwitnie od maja do września. Jej kwiaty są dość duże (średnica około 3cm), wyrastające na szczycie pędów oraz posiadające podwójny okwiat, w którym zewnętrzny okótek posiada pięć działek kielicha barwy bładoniebieskiej lub białej wraz z błękitnym unerwieniem oraz seledynowymi szczytami, zaś wewnętrzny okótek ma osiem działek korony, szerokojawowych, zwężonych w krótki paznokiec i zakończony dzióbkiem, przekształconych w miodniki. Pomiedzy płatkami korony, rosną pręciki oraz pięć słupków, z których po zrośnięciu powstaje wielomieszek przypominający torebkę. Owoc czarnuszki zawiera wewnątrz wiele trójgraniastych nasion, początkowo białych, drobnych, a następnie pęczniejących i przybierających czarną barwę po dojrzeniu.

Nasiona te, *Semen Nigellae sativae*, są ostro trójkanciaste, o 1mm grubości, 3mm długości, 1,5mm szerokości (Ryc. 2).



Ryc. 2. Nasiona *Nigella sativa*, Fot. Anna Adamska

Nasiona posiadają silny muszkatołowy, korzenny zapach, a smak gorzkiej kawy. Czas potrzebny od zakwitnięcia do osiągnięcia dojrzałości przez nasiona to w przybliżeniu 75 dni. Zbiór nasion następuje we wrześniu (8-10).

1.3. Skład chemiczny *Nigella sativa*

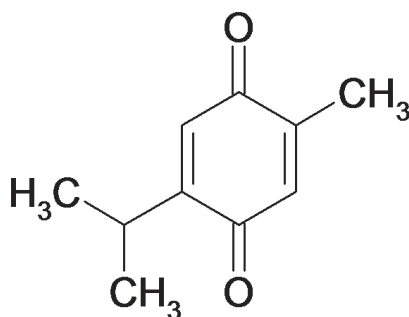
W skład nasion czarnuszki siewnej wchodzi: oleje (30-50%), białka, alkaloidy, saponiny oraz olejek eteryczny (0.4-2.5%) (11-13).

Olej tłusty

Fracja tłuszczowa (30-50%) jest bogatym źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie oleinowego, linolowego oraz α -linolenowego, a także mało spotykanego eikozadienowego; poza tym oleopalmitynowego, oleomirystynowego, margarynowego i margarooleinowego. Z pośród kwasów nasyconych występują: palmitynowy, stearynowy, arachidowy, mirystynowy, behenowy i lignocerynowy. W oleju tłustym nasion czarnuszki obecne są też tokoferol, fosfolipidy oraz fitosterole (14-18). Olej z nasion czarnuszki wyróżnia się długim czasem przechowywania i wysoką trwałością (9).

Olejek eteryczny

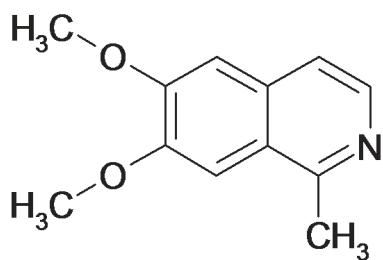
W oleju tłustym z nasion czarnuszki obecne jest 0,4-2,5% olejku eterycznego (5). Głównymi komponentami olejku są tymochinon (27,8-57,0%), tymohydrochinon oraz ditymochinon. Najprawdopodobniej w olejku obecny jest polimer tymochinonu – nigellon (5), z którym identyfikowany jest także dimer ditymochinon (15). Tymochinon ulega dimeryzacji do ditymochinonu w obecności światła (19). Pozostałe składniki olejku eterycznego to m.in. p-cymen (7,1-15,5%), karwakrol (5,8-11,6%), 4-terpineol (2,0-6,6%), t-anetol (0,25-2,3%), longifolen (1,0-8,0%), limonen, α -tujon, α -pinen, karwon oraz tymol. Zawartość olejków eterycznych nie wykazuje istotnych różnic między surowcami wywodzącymi się z różnych krajów, w tym z Indii, Izraela, Algierii, a także krajów Europy np. Austrii (5, 8). Badania zespołu prof. Kalemby wykazały, że olejek z nasion czarnuszki, hodowanej w centralnej Polsce, zawierał 48 związków terpenowych i seskwiterpenowych. Autorzy zidentyfikowali obecność nie stwierdzonych wcześniej dwóch związków terpenowych: cis- i trans-4-metoksytujonów (20).



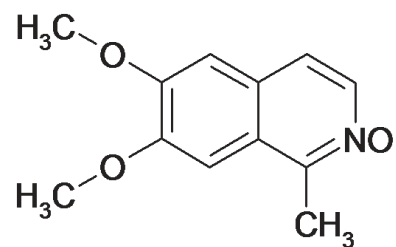
Tymochinon

Alkaloidy

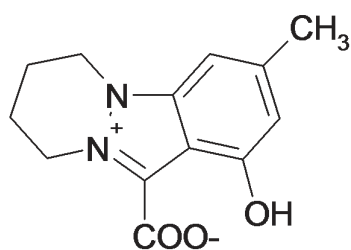
W nasionach czarnuszki obecne są alkaloidy diterpenowe o strukturze dolabellanu (21), tj. nigellaminy A1-A5, B1-B2 oraz C, ponadto alkaloidy będące pochodnymi izochinoliny nigellamina (22) i jej N-tlenek nigellina (23), a także alkaloidy zawierające w swej strukturze pierścień indazolowy - nigellicyna (24) i nigellidyna (25). Nigellidyna oraz nigellicyna zgromadzone są przeważnie w łupinie nasiennej (8).



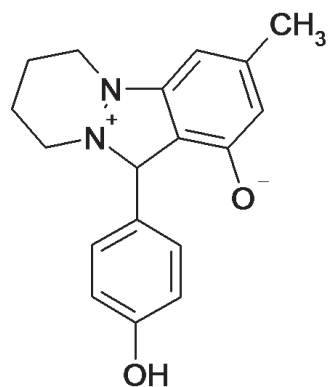
Nigellimina



N-tlenek nigelliminy



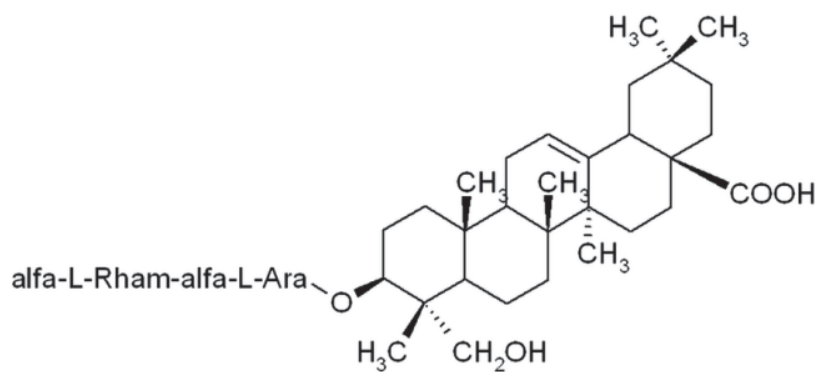
Nigellicyna



Nigellidyna

Saponiny

Nasiona czarnuszki siewnej zawierają saponiny triterpenowe. W piśmiennictwie niewiele jest danych na temat występowania tej grupy związków w nasionach *Nigella sativa*. Stwierdzona została obecność takich związków jak: melantyna, hederakozyd C, pochodne hederageniny (11, 12) oraz α -hederyna (26), która - przeciwieństwo do alkaloidów - rozdystrybuowana jest równomiernie w tkankach nasion (8).



α -hederyna

Białka

W nasionach czarnuszki obecnych jest ok. 22% białka. Frakcjonowania białek dokonano za pomocą metody SDS-PAGE, dzięki której wykryto proteiny o masie 10-94 kDa. W składzie białek czarnuszki wyróżnić można osiem z dziewięciu egzogennych aminokwasów, brak jest histydyny (5, 8, 15, 17, 18).

Węglowodany

W nasionach czarnuszki występują węglowodany w ilości ok. 32 % (9) i są to przeważnie monosacharydy, tj. glukoza, ksyluloza, ramnoza oraz arabinoza, a także disacharydy – fruktoza, sacharoza, celobioza oraz glukopiranoza (8, 15, 18).

Inne

W nasionach czarnuszki obecne są także: melanina; karoten; witaminy B₁ i B₆; flawonoidy (pochodne kemferolu i kwercyiny); sole mineralne (Ca, Fe, K, Na, Mg, Se, Zn) (9, 15, 17), a także alkohole cukrowe (ksylitol, galaktitol, inozytol); kwasy organiczne (bursztynowy, jabłkowy, fumarowy, cytrynowy) oraz GABA (8, 18).

1.4. Znaczenie, właściwości farmakologiczne i zastosowanie lecznicze *Nigella sativa*

Czarnuszka siewna, *Nigella sativa*, zwana czarnym kminkiem, była znana i ceniona już za czasów starożytnej Asyrii, wzmianki o niej można znaleźć również w Biblii. Z jej leczniczych właściwości korzystał Hipokrates, a opatrzył opisem Dioskurides, grecki lekarz (27). W tamtejszych czasach nasiona czarnuszki stosowano jako panaceum w nieżycie żołądka oraz jelit. Ponadto, w Polsce nasiona te stanowiły alternatywę dla zbyt drogich przypraw z dalekiego wschodu (5, 28).

W dzisiejszych czasach, nasiona czarnuszki są wykorzystywane chętnie w różnych gałęziach przemysłu. W przemyśle cukierniczym korzysta się z olejku eterycznego czarnuszki, w sztuce kulinarnej nasiona są często dodawane do potraw m.in. w Bułgarii, czy na dalekim wschodzie. Również w Polsce popularne stało się posypywanie chleba nasionami czarnego kminku – samych, bądź też w połączeniu z miodem, a także do aromatyzowania wina, czy do sporządzania warzywnych przetworów. Ponadto, nasiona czarnuszki po zmieleniu stanowią substytut pieprzu dla

osób cierpiących na nadwrażliwość żołądka, ponieważ są łagodne dla jego błony śluzowej (28, 29).

W ogrodnictwie, kwiat oraz owoce czarnuszki siewnej są wykorzystywane jako ozdoby, *Nigella sativa* hodowana jest na ogrodowych rabatach oraz na kwiaty cięte do bukietów.

W kosmetyce zarówno olejek eteryczny, jak i olej tłusty stają się coraz modniejszą komponentą kosmetyków naturalnych. Spotykane są szampony, czy mydła na bazie składników pochodzących od czarnuszki siewnej. Także przemysł perfumeryjny czerpie z bogactwa tej rośliny (5, 30).

Również, w kulturze medycyny folklorystycznej i tradycyjnej wykorzystuje się wielokierunkowe właściwości lecznicze czarnego kminku, szczególnie w Indiach (31, 32), czy krajach arabskich, gdzie nazywany jest 'habbatu sawda' lub 'habbatu el baraka' i tam czarne nasiona posiadają status panaceum na wszelkie dolegliwości, z wyjątkiem uchronienia od śmierci (28, 33-35). Także w Polskim folklorze czarnuszka siewna jest cenioną rośliną (36).

Surowiec leczniczy stanowią nasienie i olej czarnuszkowy – *Semen et Oleum Nigellae sativae*. Wykazują działanie: silnie antybiotyczne, przeciwwirusowe, przeciworobacze, żółciopędne i żółciotwórcze, poprawiające trawienie, wiatropędne, przeciwzapalne – również w reumatyzmie, przeciwbólowe, hipoglikemiczne, moczopędne, zażywane całe nasiona pomagają w eradykacji *Helicobacter pylori*; zaś zewnętrznie stosowane napary pomocne są w atopowym zapaleniu skóry, czy trądziku (37-39).

Z piśmiennictwa wynika, że gatunek *Nigella sativa* badany był już w latach 60-tych ubiegłego stulecia (40, 41).

Wiele właściwości leczniczych stosowanych intuicyjnie w medycynie ludowej zostało potwierdzonych przez badania naukowe przeprowadzanych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Doniesienia literaturowe skupiają się przede wszystkim na aktywności przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej (42), przeciwbakteryjnej (43), hipoglikemicznej (44), przeciwrzodowej (45), a także przeciwnowotworowej (46) czarnuszki siewnej. Nasiona podawano doustnie w czystej postaci, bądź oleju z czarnuszki, administrowano olejek eteryczny w miejsce nowotworu(47) lub też aplikowano do hodowli

komórkowych w postaci ekstraktów, czy roztworów wyizolowanych metabolitów wtórnych (37). Olej z nasion czarnuszki wykazuje właściwości cytoprotekcyjne dla szczurzych jajników przy aplikowaniu doustnym (48).

Jednym z metabolitów wtórnych nasion czarnego kminku, wielokrotnie poddawanych badaniom naukowym, jest tymochinon, główny składnik olejku eterycznego. Wykazuje on bardzo szerokie spectrum aktywności biologicznych, m.in. przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne (49), antyutleniające, przeciwzapalne, immunostymulujące, przeciwhistaminowe, hepato-, nefro-, neuro- oraz gastroprotekcyjne, wspomagające w zaburzeniach sercowo-naczyniowych, a także w zaburzeniach płodności, czy układu oddechowego, również wspomagająco w cukrzycy oraz zaburzeniach kostnych (50). Ponadto, stwierdzono w badaniach *in vitro*, że jest silnym czynnikiem cytotoksycznym w stosunku do linii komórkowych m.in. na liniach: białaczki (51, 52), raka żołądka (53), raka piersi (54), raka jelita grubego (55-58), raka trzustki (59), raka wątroby (60), włókniakomięsaka (61), raka nerki (62), raka prostaty (63, 64) wraz ze zbadanymi mechanizmami swoich właściwości antynowotworowych (65, 66). Istnieją także badania na temat wpływu tymochinonu na komórki raka jajnika (67-69).

1.5. Aktywność biologiczna ekstraktów *Nigella sativa*

Ekstrakty czarnuszki siewnej poddawano analizom zarówno w modelach badawczych *in vivo* m.in. z oceną działania przeciwzapalnego, neuroprotekcyjnego, hepatoprotekcyjnego, przeciwbólowego, antybiotycznego i przyspieszającego gojenie ran oraz zrastanie kości (29, 70-75), jak i *in vitro*. Informacje na temat badań *in vitro* dotyczą głównie ekstraktów etanolowych, metanolowych, wodnych, heksanowych, czy benzenowych oraz ich właściwości antyoksydacyjnych w porównaniu do kwasu askorbowego (76), a także ich aktywności antybiotycznej przeciwko szczepom *Salmonelli* oraz *E.coli* (77, 78), czy przeciwzapalnych w astmie (79).

Ekstrakty z nasion czarnuszki przebadano także ze względu na ich aktywność cytotoksyczną na wybranych liniach komórkowych.

W przypadku ekstraktu etanolowego badano jego cytotoksyczność m.in. na następujących liniach nowotworowych: dwóch białaczkowych - P388 i Molt4, ponadto

pięciu pochodzących z guzów litych - Wehi 164, LL-2, Hep G2, SW620 i J82 za pomocą testu MTT. Dodatkowo, ekstrakt etanolowy podzielono na frakcje, z których octan etylu wykazywał największą aktywność cytotoksyczną (80). Ponadto, ekstrakt ten przebadano na linii komórek raka piersi MCF-7 (81), a także na linii A-549 (raka płuc) z uzyskanym efektem cytotoksycznym zależnym od dawki ekstraktu (82).

Ekstrakt metanolowy badano na dwóch liniach komórek nowotworowych U-937 i HL-60 oraz na jednym nienowotworowym HEK-293T również za pomocą testu MTT w porównaniu z cyklofosfamidem (83, 84). Ponadto, metanolowy ekstrakt przyniósł pomyślne rezultaty w hamowaniu wzrostu komórek linii AGS (raka żołądka) (37) oraz raka jelita grubego DLD-1 (78).

Aktywność ekstraktów wodnych oceniono na komórkach linii HeLa i Vero (85). Dowiedziono także właściwości cytoprotekcyjnych tegoż ekstraktu na komórkach linii PBLs (izolowanych limfocytów z krwi obwodowej) z indukowanymi bleomycyną uszkodzeniami cytogenetycznymi (86), a także na linii MCF-7 (raka piersi) (81).

Według stanu wiedzy autora, istnieje jedynie doniesienie konferencyjne na temat wpływu ekstraktów nasion czarnuszki na hodowlę komórek raka jajnika (SKOV-3). Etanolowy ekstrakt z nasion czarnuszki wykazał synergizm działania antynowotworowego w połączeniu z docetakselem i paklitakselem większy od pojedynczego działania każdej z wymienionych cytotoksycznych substancji (87).

W piśmiennictwie jest również doniesienie z Malezji na temat wpływu *Nigella sativa* na komórki raka jajnika, jednak na linię Caov-3 (88).

1.6. Aktywność biologiczna α -hederyny

α -Hederyna (α -HN), która obecna jest w nasionach czarnuszki siewnej (*Nigella sativa*), zidentyfikowana jest także w gatunkach *Hedera helix*, *Chenopodium quinoa*, *Kalopanax pictus*, to monodesmozydową saponina triterpenoidowa o wzorze chemicznym $C_{41}H_{66}O_{12}$. Znana jest także jako kwas (3β , 4α)-3 - [[2-O- (6-deoksy- α -L-mannopiranozylo)- α -L-arabinopiranozylo]oksy]-23-hydroksyolean-12-en-28-oowy (wzór str. 17). Ma postać białego krystalicznego proszku o masie cząsteczkowej 750,96, temperaturze topnienia 128-268°C. α -Hederyna jest rozpuszczalna w dimetyloformamidzie, di-metylosulfotlenku i etanolu (89)

α -Hederyna ma wiele znaczących działań biologicznych. Została ona zidentyfikowana jako kolejny, oprócz tymochinonu, składnik aktywny nasion *Nigella sativa*. Udowodniono, że saponina posiada właściwości przeciwzapalne i przeciwartretyczne, przeciwutleniające, cytotoksyczne i przeciwnowotworowe, a ponadto może zwalczać pasożyty i grzyby oraz jest środkiem desmutagennym i hepatoprotekcyjnym (90-100).

W przypadku przeciwnowotworowych właściwości α -hederyny, przeprowadzono jedynie kilka prac, jednakże mechanizm jej aktywności cytotoksycznej nie został jeszcze ostatecznie ustalony. Lorent i in. stwierdzili, że α -hederyna powoduje tworzenie porów błonowych oraz że α -hederyna wnika do komórki prawdopodobnie przez szlak zależny od sterolu (101, 102). Udowodniono również, że α -hederyna powoduje zmiany w błonie komórkowej łącznie z wakuolizacją cytoplazmy prowadzącą do śmierci komórek w hodowli komórek nowotworowych (czerniak) i nienowotworowych (mysie komórki fibroblastów 3T3) (99). Jeong HG i Choi CY twierdzą, że α -hederyna może zwiększać ekspresję iNOS poprzez transaktywację NF-kappa B, a zatem stymuluje uwalnianie tlenku azotu (NO), co przyczynia się do uszkodzeń oksydacyjnych komórek w mysich makrofagach (103). Z drugiej strony α -hederyna wraz z pentoksyfiliną okazały się cytotoksyczne przez obniżenie poziomu mRNA IL-6 i TNF- α w liniach komórkowych mysich makrofagów (RAW 264,7) i mysiego wątrobiaka (Hepa-1c1c7) (97). Co więcej, wytwarzanie reaktywnych form tlenu i wewnątrzkomórkowe zubożenie glutationu odgrywają również rolę w mechanizmie cytotoksycznego działania α -hederyny na komórki P388 mysiej białaczki (104). α -hederyna aktywuje ponadto kaspazę-3 i -9 poprzez depolaryzację potencjału błony mitochondrialnej, co wywołuje uwalnianie apoptosomu (Apaf-1) i cytochromu c w ludzkich komórkach raka piersi (MDA-MB-231 i MCF -7) (105). W raku krtani (HEp-2) α -hederyna wywołuje apoptozę i martwicę (100). Co więcej, α -hederyna jest aktywna wobec innych ludzkich linii komórek nowotworowych, na przykład przeciwko rakowi płuc Lewis (LL/2), mięśniom gładkim (HASM), ludzkiej nerki (HEK293) i transfekcji linii komórkowych HEK293 (26, 106). W odniesieniu do raka okrężnicy (HT-29), α -hederyna ma działać synergistycznie z 5-fluorouracylem i 3-O-alfa-L-ramnopiranozylo-(1 -> 2) -alfa-L-arabinopiranozydem (107, 108). Ponadto, badano również α -hederynę w porównaniu z nanocząstkami chitozanu sprzężonymi z cząsteczką α -hederyny (α -HN-CS-CD147-NP) na liniach komórek ludzkiego raka wątroby SMMC-7721 i HepG2. W

rezultacie, przeciwiało sprzężone z α -hederyną okazało się bardziej aktywne w stosunku do tych linii komórkowych niż sama α -hederyna (109). Ponadto α -hederyna w stężeniu 0,13–13,0 nmol/mL okazała się nie-mutagenna w ludzkich limfocytach z indukowaną toksycznością przez doksorubicynę (110). Jak wynika z przedstawionych wyników, badania dotyczyły aktywności przeciwnowotworowej α -hederyny na kilku liniach komórkowych. W piśmiennictwie nie ma żadnych informacji na temat wpływu α -hederyny na linię komórkową SKOV-3 ludzkiego raka jajnika.

2. Badania cytotoksyczności ekstraktów i metabolitów roślinnych w warunkach *in vitro*

2.1. Metody badania cytotoksyczności

Cytotoksyczność jest terminem oznaczającym szeroko rozumianą toksyczność substancji chemicznych lub poszczególnych rodzajów komórek wobec komórek określonego organizmu. Cytotoksyczność jest podstawą działania chemioterapeutyków używanych w farmakoterapii, dotyczy leków antybiotycznych i przeciwnowotworowych. Nowe związki chemiczne, roślinne wtórne metabolity mające możliwość potencjalnego wykorzystania w terapii zawsze podlegają ocenie badań *in vitro* opartych zazwyczaj na pomiarze zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, spowodowanych daną substancją (111). Badania cytotoksyczne nie są równoważne z toksykologicznymi badaniami *in vivo*. Służą do określenia mechanizmu na poziomie komórki, a nie na poziomie tkanki, czy narządu, bądź całego organizmu. Najczęściej stosowaną miarą liczbową cytotoksyczności jest IC_{50} , które jest stężeniem badanego czynnika hamujące w 50% proliferację komórek hodowli *in vitro* w porównaniu z próbą kontrolną (112, 113).

Badania cytotoksyczności oparte są m.in. o zmiany zawartości białka lub materiału genetycznego, zdolności komórek do proliferacji, zmiany integralności błony komórkowej, czy aktywności enzymów komórki. Są to np. testy z zastosowaniem soli tetrazoliowej (MTT, XTT, WST, EZ4U, LDH) (114-121) lub wychwyty czerwieni obojętnej (122), a także testy przeżyciowe Alamar Blue (123). Ponadto, jedną z najnowszych metod do pomiaru zmian procesów komórkowych *in vitro* o wyższej czułości niż inne testy cytotoksyczności jest system RTCA (124, 125).

2.2. Zastosowanie elektrycznej impedancji i systemu Real-Time Cell Analysis

System Real Time xCELLigence (RTCA), wprowadzony na rynek światowy w 2008 roku, pozwala na ciągły monitoring proliferacji linii komórkowych w czasie rzeczywistym dzięki zastosowaniu elektrycznej impedancji (126). Hodowane komórki nowotworowe wysiewane są i inkubowane w wielodołkowych płytkach zintegrowanych

z mikroelektronicznym czujnikiem. Pozwala to na ciągłą obserwację interakcji komórek z elektronicznymi biosensorymi w odniesieniu do ich przeżywalności, liczebności, morfologii oraz stopnia adhezji. Metoda zapewnia powtarzalność i odtwarzalność doświadczeń dzięki wielogodzinnej kontroli inkubowanych hodowli komórek. Możliwa jest kontrola wpływu zastosowania różnych stężeń ekstraktów roślinnych na badane komórki nowotworowe oraz czas, po którym efekt cytotoksyczny zostanie osiągnięty. Ponadto, w badaniu monitorowany jest wpływ różnych związków na testowane komórki, określenie ich aktywności cytotoksycznej, a także poznanie mechanizmów działania nowych, nieanalizowanych jeszcze związków, dzięki porównaniu ze znanymi profilami kinetycznymi pochodzącymi od dobrze poznanych związków. Krzywe te zależą od rodzaju komórki, stężenia użytego związku, czasu ekspozycji komórki nowotworowej na związki cytotoksyczne oraz mechanizmu działania.

Zaletą tej metody jest możliwość ciągłej obserwacji zmian zachodzących w badanych komórkach oraz ocena wartości IC_{50} przez całe prowadzone doświadczenie, w przeciwieństwie do tradycyjnych metod (np. do testów z wykorzystaniem soli tetrazolowej MTT, XTT), które dostarczają obrazu wrywkowego w wybranych punktach (127), (128). Powyższa metoda umożliwia obserwację ponownej proliferacji komórki nowotworowej, migracji komórek, po uprzednio zaobserwowanym spadku przeżywalności.

Metoda Real-Time xCELLigence pozwala na przyspieszenie postępów w pracach badawczych w poszukiwaniu naturalnych związków wykazujących aktywność cytotoksyczną.

Jednym z celów pośrednich autora niniejszej pracy było opracowanie metody regeneracji E-płytek umożliwiającej wielokrotne ich stosowanie (129). Założenie dotyczyło opracowania metody na ponowne użycie E-płytek, które, według zalecenie producenta, są jednorazowego użytku. Wykazano, że płytki elektroniczne zawierające studzienki z elektrodami czujnikowymi, które mają szerokie zastosowanie w wielu obszarach badawczych, m.in. w profilowaniu reakcji na leki, w optymalizacji warunków hodowli komórkowych (130, 131), mogą być wielokrotnie regenerowane i ponownie wykorzystywane. Regeneracja płytek zmniejsza koszty oraz ilość odpadów powstałych podczas eksperymentów RTCA i, co ważniejsze, nie wpływała na odtwarzalność danych w naszych eksperymentach. Należy podkreślić, że całkowite

usunięcie substancji cytotoksycznej po każdym użyciu jest obowiązkowe, chociaż w przypadku niektórych związków może to nie być możliwe.

Prowadzone wszystkie badania zawarte w niniejszej monografii zaliczane są do metod alternatywnych, których definicja opiera się między innymi na zasadach zaproponowanych przez Russella i Burcha w 1959 roku. Dotyczą one zastąpienia zwierząt w eksperymencie przez model badawczy „3Rs koncept” (Refinement, Reduction and Replacement) tj. udoskonalenie metod badawczych (Refinement), „nie odczuwający cierpień” (ang. Replacement) oraz zmniejszenia liczby zwierząt, na których trzeba przeprowadzić badania (ang. Reduction) (132). Należy podkreślić, że Komisja Europejska przywiązuje dużą wagę do opracowywania i wprowadzania do praktyki metod alternatywnych (Dyrektywa Rady nr 86/609/EEC).

3. Linia komórkowa raka jajnika SKOV-3, RAK JAJNIKA

Linia SKOV-3 (lub wymiennie SK-OV-3) pochodzi z komórek raka jajnika zebranych w 1973 r. od 64-letniej kobiety i wykazuje wysoką odporność na liczne środki cytotoksyczne, w tym TNF, adriamycynę i cisplatynę (133, 134). Ponadto, jest to linia nadająca się do badań przedklinicznych, cechująca się podobieństwem do nowotworu jajnika *in vivo* oraz wykazująca dużą zdolność do tworzenia guzów u myszy po wstrzyknięciu w określonych miejscach (135). Linia ta jest często wykorzystywana w badaniach naukowych (136-140), także podczas poszukiwań nowych leków (141).



Ryc. 3. Komórki SKOV3 w hodowli, pasaż 38. Powiększenie 100x. Zdjęcie wykonane w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej. Fot. Anna Adamska

Rak jajnika jest uważany za jeden z najgroźniejszych ginekologicznych nowotworów, plasowany jest na czwartym miejscu wśród zgonów spowodowanych kobiecymi nowotworami (142). Ponadto, wg statystyk, zachorowalność na ten typ nowotworu wciąż rośnie (143). Spowodowane jest to nie tylko faktem późnego wykrywania choroby, z uwagi na brak specyficznych jej objawów, ale także braku badań przesiewowych w kierunku tego nowotworu, również wśród chorych objętych kontrolą z powodu rozpoznanej mutacji genów BRCA (144). Dodatkowo, istnieją wciąż niewystarczające metody terapii nowotworu jajnika, a także względnie szybko rosnąca oporność komórek nowotworowych na dostępną i stosowaną chemioterapię (145). Zatem, odkrywanie nowych sposobów zwalczania tego typu nowotworu wraz z

poznaniem jego molekularnych mechanizmów karcenogenezy jest uzasadnionym kierunkiem.

Etiologia ponad 95-ciu procent złośliwych nowotworów jajnika jest pochodzenia nabłonkowego. Najważniejsze czynniki ryzyka występowania tego nowotworu to:

- posiadanie mutacji w genach BRCA 1/2 (odnosi się do 13-stu procent wykrytych przypadków złośliwego nowotworu jajnika)
- zespoły dziedzicznego raka jajnika i piersi
- rodzinne występowanie dziedzicznego raka jelita grubego niepolipowatego (zespół Lyncha)
- długotrwała stymulacja owulacji, bezdzietność, nieudane próby zapłodnień *in vitro*

Ryzyko zachorowalności na raka jajnika jest zmniejszone podczas stosowania antykoncepcji hormonalnej, okluzji jajowodów, bądź wycięcia jajników, jajowodów oraz macicy, a także podczas karmienia piersią (146).

Zdiagnozowanie raka jajnika w początkowych stadiach szacuje się jedynie na około 20-30 %, pozostałe 70 % to odsetek kobiet będących w III i IV stopniu zaawansowania choroby. U większości chorych pacjentek przez pierwszy rok przed rozpoznaniem pojawiają się atypowe dolegliwości dyspeptyczne, brak jest zaś objawów patognomicznych (147). Notuje się także podwyższony poziom antygenu CA125, a także płyn w jamie otrzewnej brzusznej, często także w jamie opłucnej. U części pacjentek jajniki stwierdza się prawidłowej wielkości, bądź wyłącznie nieznacznie powiększone, pomimo, że nowotwór jest już rozsiany w jamie brzusznej.

W każdym przypadku stwierdzonego guza jajnika, rekomenduje się wykonanie standardowego testu ROMA lub obliczenie indeksu RMI, które to klasyfikują przynależność pacjentki do określonej grupy ryzyka, a zatem rekomendują także objęcie leczeniem w specjalistycznej placówce z doświadczeniem w nowotworach jajnika (146, 148).

Leczenie raka jajnika jest terapią skojarzoną uwzględniającą zarówno cytoredukcję na drodze operacji, jak i chemioterapię. Leczenie farmakologiczne opiera się przeważnie na dwóch grupach leków – pochodnych platyny (cisplatyna lub karboplatyna) oraz taksoidu (paklitaksel), łącznie z premedykacją lekami

przeciwhistaminowymi, blokerami receptora H₂, steroidowymi, a także w niektórych przypadkach stosowanym podtrzymująco bewacyzumabem (149-151). Konieczne jest monitorowanie parametrów krwi podczas trwania terapii, szczególnie obrazu krwinek czerwonych.

Niestety, rak jajnika jest typem nowotworu trudno uleczalnym, stąd – z uwagi na nawroty choroby – przyjmuje ona często charakter schorzenia przewlekłego. Dla większości pacjentek są to pojawiające się po sobie cykle wznowy choroby, następnie skracających się okresów bez objawów choroby, aż do momentu braku wrażliwości na leczenie preparatami cytostatycznymi. Stosowana farmakologia przybiera postać paliatywnej chemioterapii, gdzie priorytetem nie staje się uzyskanie pozytywnej odpowiedzi na leczenie, lecz celem jest poprawa jakości życia pacjenta, przeciwdziałanie objawom, opóźnienie pojawienia się objawowej progresji nowotworu, a także przedłużenie czasu życia (152-154).

Niezbędne jest zatem poszukiwanie nowych leków, o innych punktach uchwytu, innych mechanizmach molekularnych niż dostępne i stosowane środki farmakologiczne do walki z rakiem jajnika.

II. CELE PRACY

Podjęcie w realizacji pracy doktorskiej badań dotyczących aktywności cytotoksycznej nasion czarnuszki siewnej *Nigella sativa*, uzasadniały wyniki badań tego gatunku prowadzone przez różne ośrodki naukowe. Większość badań dotyczyła szeroko wykorzystywanego olejku z czarnuszki siewnej i aktywności obecnego w nim tymochinonu. Tylko pojedyncze doniesienia dotyczyły badań ekstraktów z nasion, w tym aktywności przeciwnowotworowej. W badaniach wykazano aktywność cytotoksyczną w stosunku m.in. do komórek linii MCF-7 (rak piersi), A-549 (rak płuc), jak również w stosunku do komórek linii AGS (rak żołądka) oraz raka jelita grubego DLD-1. Jak dotąd nie odnotowano żadnych informacji o badaniach wpływu ekstraktów z nasion *Nigella sativa* na komórki linii raka jajnika SKOV-3.

W piśmiennictwie, mimo stwierdzonej w nasionach *Nigella sativa* obecności wtórnych metabolitów z grupy triterpenowych saponin, w tym występowania α -hederyny, brak jest wystarczających informacji o badaniach dotyczących aktywności cytotoksycznej tej grupy związków. W piśmiennictwie nie ma również żadnych informacji na temat wpływu α -hederyny na linię komórkową SKOV-3 ludzkiego raka jajnika.

Przedstawiony powyżej stan wiedzy na temat *Nigella sativa* uzasadnia podjęcie badań, które miały dwa główne cele:

Oszacowanie:

- aktywności cytotoksycznej ekstraktów oraz metabolitów wtórnych nasion gatunku *Nigella sativa* na liniach komórek nowotworowych (linia komórkowa SKOV-3 – linia komórkowa raka jajnika; linia komórkowa HeLa – linia komórkowa raka szyjki macicy) i nienowotworowej linii komórek ludzkich keratynocytów (linia komórkowa HaCaT)

Poznanie:

- mechanizmu aktywności cytotoksycznej α -hederyny na linii komórkowej SKOV-3

W rozprawie doktorskiej wyznaczono także cele pośrednie:

- Ocena wpływu sposobów ekstrakcji nasion *Nigella sativa* na aktywność cytotoksyczną ekstraktów i frakcji
- Porównanie metody badania aktywności cytotoksycznej MTT z systemem Real-Time xCelligence (RTCA).
- Opracowanie metody regeneracji E- płytek w systemie RTCA
- Analiza metabolitów z grupy saponin triterpenowych
- Oznaczenie zawartości α -hederyny w wybranych frakcjach oraz ekstraktach z nasion *Nigella sativa*

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura i sprzęt

1.1. Sporządzanie ekstraktów

- Łaźnia wodna W410E, LaboPlay, Polska
- Łaźnia ultradźwiękowa UM-1, Unitra-Unima, Polska
- Łaźnia wodna B-490, Büchi, Szwajcaria
- Waga analityczna As 220/C/2, Radwag, Polska
- Młynek elektryczny A-10, 20000 rpm, Yellow line IKA- Werke, Niemcy
- Pompa próżniowa KNF Laboport, KNF, USA
- Sączi bibułowe
- Sączi membranowe 0,22 μ m
- Strzykawki
- Szkło laboratoryjne
- Wyparka próżniowa Rotavapor R-200, Büchi, Szwajcaria
- Zestaw do dejonizacji wody, MILLI-RO i MILLI-Q MILLIPORE, Francja
- Wyrzaskarka MS3 basic, IKA, Niemcy
- Liofilizator ALPHA 2-4Lplus, Martin Christ, Niemcy
- Wstrząsarka Vortex MS-1 – IKA-Werke, Niemcy

1.2. Hodowla komórkowa

- Zestaw pipet automatycznych (0,4 -2,5 μ l; 1-100 μ l x12; 30-300 μ l x12) – Eppendorf, Niemcy

- Zestaw pipet automatycznych (1-10 μ l; 2-20 μ l; 10-100 μ l; 20-200 μ l; 100-1000 μ l) – Biohit, Finlandia
- Zestaw pipet automatycznych (1-10 μ l; 2-20 μ l; 10-100 μ l; 20-200 μ l; 100-1000 μ l) – Brand, Niemcy
- Pipetor automatyczny Accumax PipetController – Fine Care Biosystems, Indie
- Pipetor automatyczny Pipet-Aid – Drummond, USA
- Pompa aspiracyjna FTA-1, Biosan, Łotwa
- Mikroskop odwrócony DM IL LED, Leica, Szwajcaria
- Inkubator CO₂ CB150, Binder, Niemcy
- Laminar Labculture Reverse Horizontal Flow Cabinets, Esco, Singapur
- Sprzęt jednorazowy (końcówki do pipet automatycznych, końcówki do aspiratora, tipsy do pipet automatycznych, próbówki typu Eppendorf 1.5ml, próbówki typu Falcon 15ml i 50ml)
- Butelki do hodowli komórkowych T25 i T75
- Rękawiczki jednorazowe

1.3. Badanie cytotoksyczności za pomocą systemu RTCA

- RTCA DP Analyzer, Roche, USA
- E-plate 16, Roche, USA
- Komputer osobisty, Hewlett Packard, USA
- Oprogramowanie RTCA Software 1.2.1, Roche, USA

1.4. Badanie cytotoksyczności metodą MTT:

- Wytrząsarka IKA KS130 Basic – IKA-Werke, Niemcy
- Spektrofotometr Epoch – BioTek, USA

- Komputer osobisty – Asus, Tajwan
- Płytki 96-dołkowe do MTT

1.5. Badanie zmian w jądrze komórkowym badanych komórek (barwienie Hoechst)

- Mikroskop fluorescencyjny Leica, Szwajcaria

1.6. Badanie mechanizmu działania *in vitro* α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3 za pomocą cytometrii przepływowej

- Mikrokapilarny cytometr przepływowy, Muse Cell Analyzer, Merc Millipore
- Probówki kompatybilne z mini cytometrem przepływowym Muse Cell Analyzer
- Płytki 6- oraz 12-dołkowe

1.7. Badanie aktywności kaspaz 8/9

- Luminometr Glomax Multi+ Detection System (Promega), USA
- Płytki 96-dołkowe kompatybilne z luminometrem

1.8. Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC-UV

- Chromatograf Acquity Ultra Performance Liquid Chromatograph firmy Waters wyposażony w detektor DAD
- Warunki chromatograficzne:
 - Kolumna: LumiSep HPLC column, C18 3 μ m, 120Å, 2,1x50mm
 - Temperatura kolumny: 35°C

2. Odczynniki

2.1. Sporządzanie ekstraktów

- Etanol 96%, Polmos, Polska
- Butanol, POCh Gliwice, Polska
- Octan etylu, POCh Gliwice, Polska
- Woda dejonizowana oraz destylowana – Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

2.2. Hodowla komórkowa

- Pożywka McCoy's, Sigma-Aldrich, USA
- Pożywka DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Sigma-Aldrich, USA
- Bufor PBS (Phosphate Buffered Saline) – Sigma-Aldrich, USA
- FBS (Fetal Bovine Serum) – Sigma-Aldrich, USA
- Trypsyna 0,25% w EDTA – Sigma-Aldrich, USA
- L-glutamina 200mM/mL – Sigma-Aldrich, USA
- Penicylina 10000jμm/mL + streptomycyna 10mg/mL – Sigma-Aldrich, USA

2.3. Badanie cytotoksyczności za pomocą systemu RTCA

- Składniki do hodowli – jw.
- 1% roztwór kolagenu pochodzącego ze skóry cielęcej – Sigma Aldrich
- Siarczan winblastyny – Sigma-Aldrich

2.4. Badanie cytotoksyczności metodą MTT

- MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy) – Sigma-Aldrich, USA
- DMSO (dimetylosulfotlenek) – POCh, Polska

2.5. Badanie zmian w jądrze komórkowym badanych komórek

- Barwnik Hoechst (Hoechst dye 33342) - Life Technologies, USA

2.6. Badanie mechanizmu działania *in vitro* α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3 za pomocą cytometrii przepływowej

- Wszystkie odczynniki z Merc Millipore

2.6.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych (test z aneksyną)

- Odczynnik MuseTM Annexin V & Dead Cell Reagent (7-AAD)

2.6.2. Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach

- Odczynnik Mitopotential dye (kationowy, liofilowy barwnik służący do detekcji zmian w potencjale mitochondrialnym), znacznik martwych komórek (7-AAD) oraz bufor przeznaczony do analizy (assay buffer, part No. 4700-1330).

2.6.3. Określenie spadku aktywacji białka antyapoptycznego Bcl-2

- Dwa specyficzne skoniugowane ze sobą przeciwciała: a phospho-specific anti-phospho-Bcl-2 (Ser70)-Alexa Fluor 555 oraz anti-Bcl-2-PECy5
- Bufory do analizy (assay buffer, fixation buffer, permeabilization buffer)

2.6.4. Określenie aktywności kaspaz-3/7 w badanych komórkach

- Odczynnik MuseTM Caspase-3/7 reagent NucViewTM4

- 7-AAD
- Bufor do analizy (assay buffer BA, part No. 4700-1360)
- PBS

2.6.5. Badanie zahamowania fazy cyklu komórkowego

- Odczynnik: Muse Cell Cycle reagent
- 70% etanol

2.7. Badanie aktywności kaspaz-8/9

- Zestaw do analizy kaspazy 8 i 9 - Caspase-Glo 8 and 9 Assay Kits (Promega, USA)

2.8. Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC-UV

- Faza ruchoma:

A: H₂O, 0,1% kwas mrówkowy

B: 90% ACN 0,1% kwas mrówkowy

3. Materiał do badań

3.1. Nasiona *Nigella sativa* L.

- Kraj pochodzenia – Polska
- Zakład Zielarski „KAWON – HURT” Nowak sp. j.
- Zbiór nasion - wrzesień 2013 r.

3.2. α -hederyna

- α -hederyna – Sigma-Aldrich, USA

3.3. Linie komórkowe

- **Linia komórkowa SKOV-3** – linia komórkowa raka jajnika; komórki adherentne, epitelialne; pożywka McCoy's 5A+ streptomycyna (100 μ g/ml) + penicylina G (100j m /mL) + FBS (10%); pasaż co 3 dni; pochodzenie ATCC
- **Linia komórkowa HeLa** – linia komórkowa raka szyjki macicy; komórki adherentne, epitelialne; pożywka DMEM + L-glutamina (2mM/mL) + streptomycyna (100 μ g/ml) + penicylina G (100j m /mL) + FBS (10%); pasaż co 3 dni; pochodzenie ATCC
- **Linia komórkowa HaCaT** – nienowotworowa linia komórek ludzkich keratynocytów; komórki adherentne, epitelialne; pożywka DMEM + L-glutamina (2mM/mL) + streptomycyna (100 μ g/ml) + penicylina G (100j m /mL) + FBS (10%); pasaż co 3 dni; pochodzenie ATCC

4. Metodyka

4.1. Sporządzenie ekstraktów roślinnych i frakcji *Nigella sativa*

W pracy założono badania ekstraktów wodnych i etanolowych („ekstrakty pierwotne”) otrzymanych z nasion *Nigella sativa* oraz frakcji przygotowanych z „ekstraktów pierwotnych” wykazujących aktywność cytotoksyczną. Proces ekstrakcji prowadzony był w temperaturze 40°C, co zapewniało bezpieczne warunki dla zawartych w nich związków saponinowych, w tym α -hederyny.

Przygotowanie ekstraktów obejmowało następujące etapy:

- proszkowanie nasion (20 g) *Nigella sativa*,
- dodanie 200 g rozpuszczalnika (woda dejonizowana, 50% etanol (v/v) lub 95% etanol),
- wytrząsanie na wstrząsarce automatycznej przez 60 minut,
- maceracja w łaźni wodnej w 40 ° C przez 24 godziny lub w łaźni ultradźwiękowej przez 45 minut,
- filtracja ekstraktu, zagęszczanie na wyparce próżniowej,
- liofilizacja.

Otrzymano pięć ekstraktów pierwotnych: (**Aq**) ekstrakt wodny, (**Aqs**) wodny ekstrakt wspomagany ultradźwiękami, (**E50**) 50% ekstrakt etanolowy, (**Es50**) 50% etanolowy ekstrakt wspomagany ultradźwiękami i (**E95**) 95% ekstrakt etanolowy.

Zliofilizowane ekstrakty rozpuszczono w wodzie dejonizowanej do uzyskania pożądanego stężenia wyjściowego do badań cytotoksyczności (2mg/mL lub 20mg/mL).

Fracje wykonano z pierwotnego ekstraktu wodnego (**Aq**), 50% ekstraktu etanolowego (**E50**) i 50% etanolowy ekstrakt wspomagany ultradźwiękami (**Es50**).

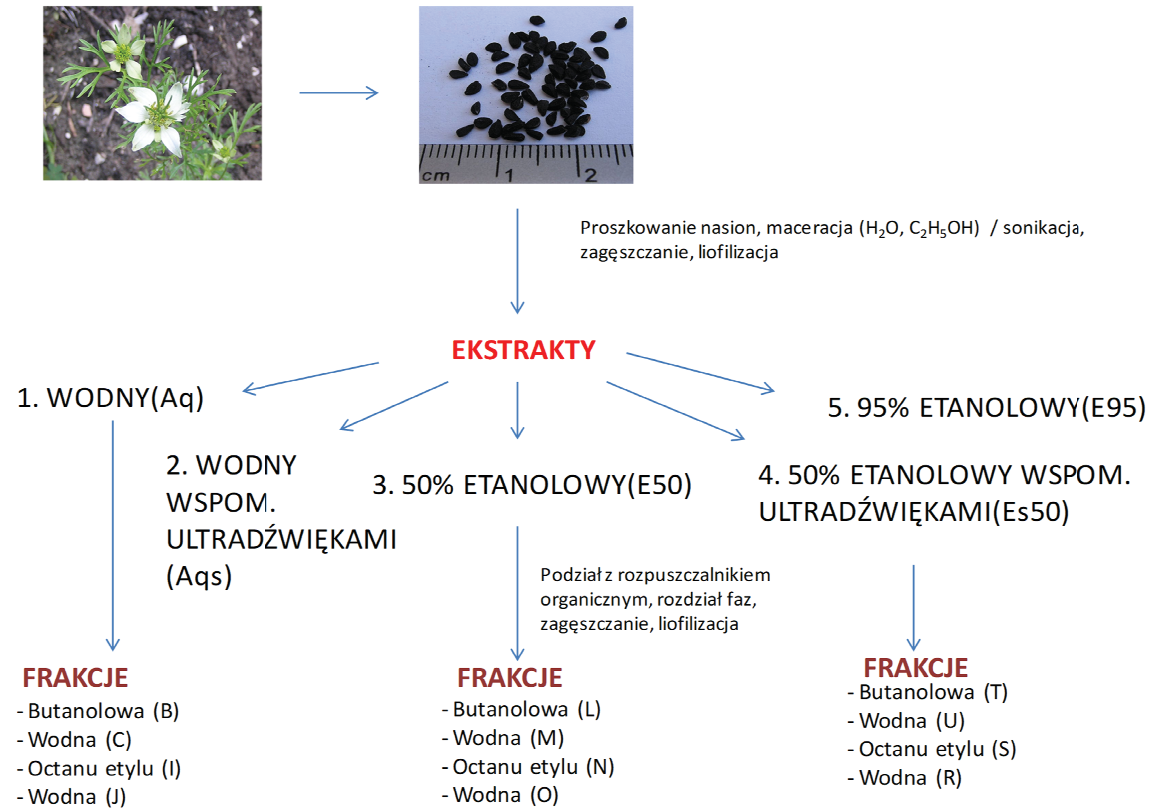
Przygotowanie frakcji obejmowało:

- rozpuszczenie każdego zliofilizowanego ekstraktu (1000 mg) w 50 ml wody dejonizowanej,
- połączenie rozpuszczonego ekstraktu z równą ilością (50 ml) rozpuszczalnika organicznego (n-butanol i octan etylu) w rozdzielaczu, wstrząsanie, rozdzielanie faz po ustaleniu równowagi (proces dodawania rozpuszczalnika i rozdzielanie dwóch faz powtarzano dwukrotnie),
- zatężanie i liofilizacja faz.

Z trzech pierwotnych ekstraktów otrzymano 3 frakcje z n-butanolem, 3 frakcje z octanem etylu i 6 frakcji wodnych (po dwie z każdego ekstraktu pierwotnego). Frakcje rozpuszczano w wodzie dejonizowanej do osiągnięcia końcowego stężenia 20 mg/ml.

Proces przygotowania ekstraktów i otrzymanych z nich frakcji przedstawia poniższy schemat.

ETAPY PRACY



Schemat 1. Proces przygotowania ekstraktów i otrzymanych z nich frakcji

4.2. Metody badań aktywności cytotoksycznej ekstraktów, frakcji *Nigella sativa* oraz α -hederyny

4.2.1. Określenie aktywności cytotoksycznej *in vitro* ekstraktów, frakcji oraz α -hederyny na wybranych liniach komórkowych za pomocą systemu RTCA

System Real-Time xCELLigence (ACEA Biosciences, USA) jest wykorzystywany do monitorowania cytotoksyczności. Pomiar oparty jest o zmiany impedancji w elektronicznych biosensorach zintegrowanych z wielodołkowymi E-płytkami (Ryc. 4). Zasada działania systemu RTCA została szczegółowo opisana w rozdziale 2.2 części teoretycznej.



Ryc. 4. Od lewej: płytka E-16, dna studzienek pokryte elektrodami, rozwój komórek na dnie studzienki. (www. Roche-applied-science.com)

Komórki w ilości 2×10^4 komórek/studzienkę wysiano na 16-dołkową E-płytkę, każda studzienka wyjściowo zawierała 100 μ l pożywki. Gdy komórki wkroczyły w fazę logarymicznego wzrostu, dodano roztwory:

- wodne 5-ciu różnych ekstraktów o zakresie stężeń 10,0 – 2000 μ g/ml,
- wodne 12-stu różnych frakcji o zakresie stężeń 10 - 600 μ g/ml oraz
- roztwór α -hederyny (rozpuszczonej w 99,9% DMSO) w zakresie 1–70 μ g/ml.

Stężenie DMSO w kontroli nie przekraczało 0,7% (v/v).

Alfa-hederyna została rozpuszczona w DMSO w stężeniu 10 mg/ml do testów cytotoksyczności. DMSO dodano do komórek kontrolnych w stężeniach, które

odpowiadają maksymalnemu stężeniu DMSO stosowanemu z maksymalnym stężeniem alfa-hederyny w każdym eksperymencie. I tak na przykład w stosowanym zakresie stężeń 1-70 µg/ml alfa-hederyny końcowe stężenie DMSO w próbce kontrolnej wyniosło 0,7% (v/v) (alfa-hederyna została rozcieńczona 143 razy, aby uzyskać 70 µg/ml i DMSO (99,9%) również rozcieńczono 143 razy, więc końcowe stężenie DMSO dodanego do komórek wyniosło 0,7%). Gdy zakres stężeń alfa-hederyny wynosił 0,5-30 µg / ml, końcowe stężenie DMSO w próbce kontrolnej wynosiło 0,3% (v / v).

Komórki następnie inkubowano z ww. roztworami i monitorowano przez 24 godziny w 37°C w atmosferze 5% CO₂; eksperyment powtórzono niezależnie co najmniej trzykrotnie.

Indeks komórek, Cell Index, (CI) oraz wartości IC₅₀ uzyskano ze zmierzonej impedancji komórka-elektroda, która jest bezpośrednio związana z żywotnością i liczbą komórek.

Wartość CI oblicza się w następujący sposób:

$$CI = \frac{(Z_i - Z_0)\Omega}{15\Omega}$$

gdzie Z_i jest oporem zbadanym w dowolnym momencie eksperymentu,

Z_0 to oporność tła, która została zbadana dla samego medium tuż przed rozpoczęciem doświadczenia.

4.2.2. Regeneracja E-płytek w systemie RTCA

Pomimo wielu zalet systemu RTCA, które przedstawiono w poprzednich rozdziałach, głównym jego ograniczeniem jest zalecane przez producenta jednokrotne stosowanie E-płytek, co powoduje wysokie koszty użytkowania.

Założeniem prowadzonych w niniejszej pracy eksperymentów było opracowanie metody regeneracji E-płytek, z możliwością wielokrotnego ich stosowania.

W opracowanej metodzie (129) regeneracji E-płytek testowano dwa rodzaje E-płytek: płytki pokryte kolagenem i płytki bez kolagenu. Skuteczność metody testowano, używając komórki HeLa traktowane siarczanem winblastyny. Studzienki E-płytek przemywano dwukrotnie PBS. Komórki przyłączone do dna studzienki „odklejano”

przez dodanie 100 μ l roztworu trypsyny-EDTA. Następnie komórki usuwano, a studzienki przemywano dwukrotnie PBS. Wszystkie etapy przygotowania płytki przeprowadzono w sterylnym środowisku. Aby uniknąć uszkodzenia elektrody, media, bufor i trypsynę delikatnie usuwano przez odessanie. Przed każdym ponownym użyciem płytki, weryfikowano brak komórek na dnie studzienek pod mikroskopem.

W celu zbadania rezultatów ponownego użycia E-płytek, przeanalizowano profile impedancji RTCA i obliczono uzyskane wartości IC_{50} dla przeprowadzonych eksperymentów po traktowaniu komórek HeLa siarczanem winblastyny. Profile impedancji RTCA uzyskano z sześciu różnych grup płytek, które zostały oznaczone następująco:

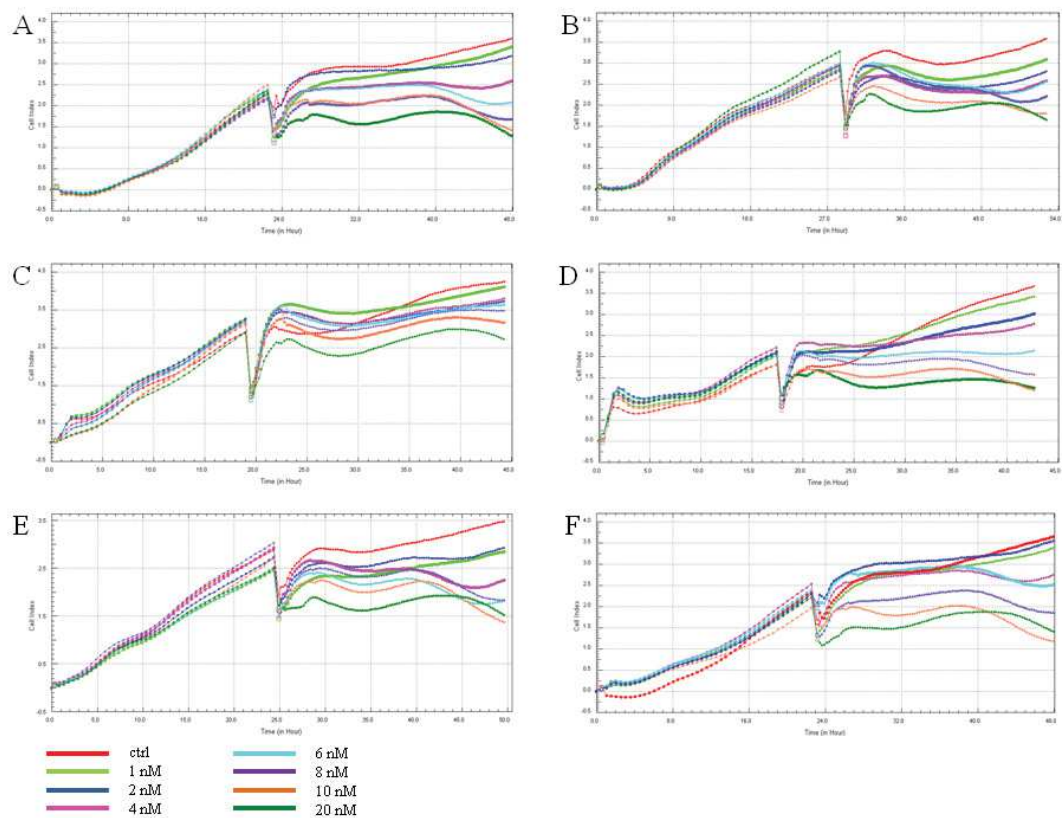
- płytki bez powłoki kolagenowej: A, B, C - odpowiednio nowe, jednokrotnie użyte i dwukrotnie użyte
- płytki z powłoką kolagenową; D, E, F — odpowiednio nowe, jednokrotnie użyte i dwukrotnie użyte.

Na Ryc. 5 przedstawiono profile impedancji uzyskane dla komórek HeLa, które były porównywalne we wszystkich sześciu grupach płytek.

We wszystkich eksperymentach wartości IC_{50} siarczanu winblastyny wynosiły 5,05–5,22 nM dla komórek HeLa (Tabela 1 oraz na Ryc. 6).

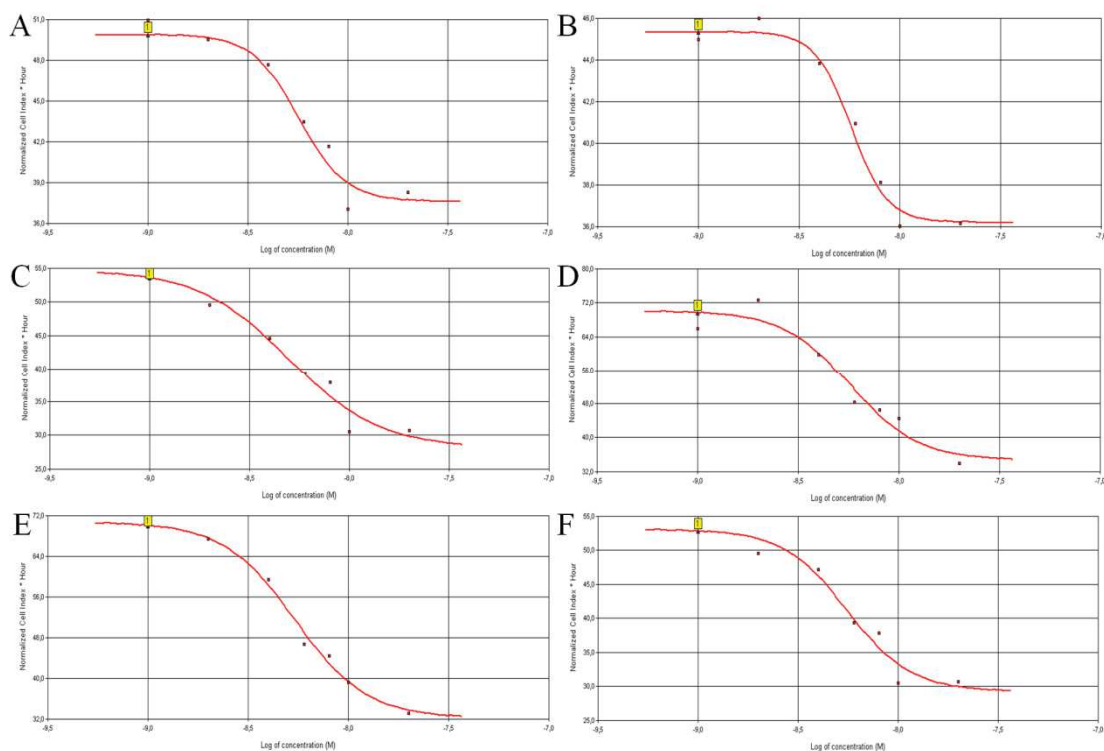
Tabela 1. Wartości IC_{50} (nM) siarczanu winblastyny w oparciu o RTCA uzyskane w eksperymentach z komórkami HeLa i E-płytkami użytymi do trzech razy.

E-płytki	IC_{50} [nM]; R^2		
	Płytki 1x użyte	Płytki 2x użyte	Płytki 3x użyte
Płytki bez kolagenu	5.06 \pm 0.35; $R^2=0.93$	5.22 \pm 0.56; $R^2=0.98$	5.11 \pm 0.58; $R^2=0.96$
Płytki pokryte kolagenem	5.05 \pm 0.37; $R^2=0.95$	5.21 \pm 0.50; $R^2=0.96$	5.16 \pm 0.39; $R^2=0.96$
R^2 - współczynnik determinacji			
* IC_{50} i R^2 wyniki wyrażono jako wartości średnie uzyskane z co najmniej dziesięciu niezależnych eksperymentów			



Ryc. 5. Profile impedancji RTCA E-płytek zawierających komórki HeLa traktowane siarczanem winblastyny przez 24 godziny w zakresie stężeń 1 – 20 nM. Analizy statystyczne nie wykazały znaczących różnic między wartościami IC_{50} sześciu różnych grup płytek. Stąd, ani trypsynizacja komórek, ani powłoka kolagenowa nie wpłynęły na wyniki cytotoksyczności.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że E-płytki mogą być wielokrotnie regenerowane i ponownie wykorzystywane, z dobrą odtwarzalnością danych w eksperymentach (129).



Ryc. 6. Wartości IC₅₀ otrzymane dla siarczanu winblastyny po 24-godzinnym traktowaniu komórek HeLa na 6-ciu różnych grupach E-płytek.

4.2.3. Określenie aktywności cytotoksycznej *in vitro* ekstraktów, frakcji oraz α -hederyny na wybranych liniach komórkowych za pomocą testu MTT

Żywotność komórek określano również za pomocą testu MTT (115, 155). Komórki w ilości 2×10^3 komórek / studzienkę wysiewano na 96-studzienkowe płytki, a następnie traktowano przez 24 godziny roztworami:

- wodnymi 5-ciu różnych ekstraktów o zakresie stężeń 10,0 – 2000 $\mu\text{g/ml}$,
- wodnymi 12 różnych frakcji o zakresie stężeń 10 - 600 $\mu\text{g/ml}$ oraz
- roztworem α -hederyny (rozpuszczonej w 99,9% DMSO) w zakresie stężeń 0,5- 50 $\mu\text{g/ml}$. DMSO dodano do komórek kontrolnych w stężeniu 0,5% (v/v).

Następnie pożywkę odrzucono i do komórek dodano świeżą pożywkę z roztworem MTT (0,5 mg / ml) oraz inkubowano przez 3 godziny w 37 ° C. Gęstość optyczną roztworu formazanu zmierzono przy długości fali 570 nm oraz 650 nm za

pomocą czytnika płytek Epoch (BioTek Instruments, USA). Wyniki trzech niezależnych eksperymentów wyrażono jako średnie wartości IC₅₀ (± SD).

4.3. Metody badań fitochemicznych metabolitów wtórnych z gatunku *Nigella sativa*

4.3.1. Analiza HPLC wybranych ekstraktów oraz frakcji otrzymanych z *Nigella sativa*

Analizy ekstraktów i frakcji oraz oznaczenie α -hederyny prowadzono metodą chromatografii cieczowej – HPLC-UV (Chromatograf Acquity Ultra Performance Liquid Chromatograph firmy Waters wyposażony w detektor DAD).

Warunki chromatograficzne:

- Kolumna: LumiSep HPLC column, C18 3 μ m, 120Å, 2,1x50mm
- Temperatura kolumny: 35°C

Analizy przeprowadzono we współpracy z Laboratorium Analizy Chromatograficznej Instytutem Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

4.3.2. Analiza identyfikacyjna związku pozyskanego z frakcji *Nigella sativa*

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H-NMR i ¹³C-NMR) były rejestrowane na spektrometrze Bruker AVANCE III 500 MHz, wyposażonym w szerokopasmową sondę BBFO. Sonda BBFO umożliwia akwizycję widm w szerokim zakresie jąder oraz wykonywanie eksperymentów korelacyjnych.

Analizowane próbki rozpuszczano w 0,6 ml D₂O i umieszczono w probówkach NMR o średnicy 5 mm. Dla wszystkich analizowanych próbek zarejestrowano widma ¹H NMR w temperaturze 25°C. Przesunięcia chemiczne były kalibrowane według sygnałów acetonu (δ_{H} 2,225; δ_{C} 31,45).

Analizy ekstraktów i frakcji *Nigella sativa* oraz określenie struktury pochodnej hederageniny prowadzono we współpracy z Pracownią Biochemii Strukturalnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

4.4. Metody badań mechanizmu działania α -hederyny w hodowli komórkowej raka jajnika, SKOV-3

4.4.1. Określenie zmian w jądrze komórkowym linii SKOV-3 (barwienie Hoechsta)

W prowadzonych badaniach do określenia zmian w jądrze komórkowym linii SKOV-3 stosowano technikę mikroskopii fluorescencyjnej.

Mikroskopia fluorescencyjna, jako odmiana mikroskopii świetlnej, daje możliwość identyfikacji struktur sub-komórkowych. W technice tej wykorzystuje się mikroskop fluorescencyjny, którego zasada działania oparta jest na zjawisku epifluorescencji umożliwiającym detekcję, a także wizualizację sygnału wywodzącego się z fluorochromu. Fluorochromy to substancje, które po wzbudzeniu światłem o konkretnej długości fali, zdolne są do emitowania światła fluorescencyjnego, które w tym układzie optycznym kierowane jest przez system lusterek i filtrów do obiektywu, dalej pada na analizowany preparat, po czym powraca do obiektywu i kierowane jest do detektora obrazu (156).

W celu określenia wpływu α -hederyny na jądra komórek SKOV-3 zastosowano niebieski fluorescencyjny barwnik Hoechst 33342 (Life Technologies, USA). Barwnik ten umożliwia wizualizację DNA w komórkach, ponieważ ma zdolność do penetracji błon komórkowych oraz wiązania się bezpośrednio z DNA.

W prowadzonych badaniach wysiano komórki w ilości 5×10^5 komórek/studzienkę w 6-dołkowych płytkach, a następnie potraktowano roztworem α -hederyny rozpuszczonej w DMSO o stężeniach 0,5, 2,0 i 10,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Stężenie DMSO w kontroli nie przekraczało 0,1% (v/v). Następnie, po 24 godzinach barwiono komórki SKOV-3 przez 25 minut w inkubatorze CO_2 barwnikiem Hoechsta o stężeniu 0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (rozpuszczonym w PBS). Zmiany zaistniałe w komórkach obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Leica, Szwajcaria).

4.4.2. Badanie *in vitro* mechanizmu działania cytotoksycznego α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3

W prowadzonych badaniach do określenia mechanizmu działania cytotoksycznego α -hederyny w komórkach raka jajnika posłużono się techniką cytometrii przepływowej.

Analiza cytometryczna umożliwia pomiar ilościowy, jak i jakościowy właściwości chemicznych oraz fizycznych pojedynczych komórek, bądź cząstek biologicznych np. mitochondriów, jąder, kwasów nukleinowych. Komórki są początkowo odpowiednio wybarwione przez wzbogacenie barwnikiem fluorochromowym, który został zintegrowany z przeciwciałami kompatybilnymi z antygenami badanych komórek. Przygotowana zawiesina komórek poddanych analizie wprowadzana jest do komory pomiarowej cytometru przepływowego, gdzie populacja ta porusza się ze stałą prędkością z uwagi na działanie układu hydrodynamicznego (157-160). Wiązka promieniowania laserowego, która oświetla badaną populację, ulega rozproszeniu oraz przeniesieniu na kolejne komórki, zaś fotodetektor znajdujący się w cytometrze rejestruje natężenie rozproszonego promieniowania. Detektor zapisuje wszystkie napotkane sygnały od każdego obiektu, umożliwiając rozróżnienie poszczególnych komórek (161, 162).

Stosowany w niniejszych badaniach mikrokapilarny cytometr przepływowy, Muse Cell Analyzer (Ryc. 7), jest kompaktowym urządzeniem stacjonarnym, wpisującym się w trend tzw. „intuicyjnych, inteligentnych technologii” z dotykowym ekranem. Posiada w zestawie zoptymalizowane testy dostarczające wiarygodnych, ilościowych danych na temat stanu analizowanych komórek oraz procesów życiowych w nich zachodzących.



Ryc. 7. Minicytometr przepływowy firmy Merck Milli Pore

http://www.merckmillipore.com/PL/pl/product/Muse-Cell-Analyzer,MM_NF-0500-3115#anchor_REF

4.4.2.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych

W celu oceny indukcji procesu apoptozy oraz populacji komórek nekrotycznych zastosowano test z aneksyną oraz markerem 7-AAD. Aneksyna służy do wykrywania cząsteczek fosfatydyloseryny (PS) translokowanej w początkowych stadiach apoptozy z wewnętrznej warstwy błony komórkowej do zewnętrznej jej części, gdzie cząsteczki PS zostają związane przez aneksynę. Natomiast, marker 7-AAD, będący wskaźnikiem integralności błon komórkowych (163), umożliwia rozróżnianie martwych komórek od żywych, ponieważ posiada zdolność przenikania wyłącznie przez uszkodzoną błonę martwych już komórek.

W prowadzonych badaniach komórki SKOV-3 w ilości 1×10^5 komórek/studzienkę wysiano na 24 godziny, a następnie poddano działaniu roztworu α -hederyny (rozpuszczonej w DMSO w stężeniu 10 mg/ml) w stężeniu 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny. Stężenie DMSO w kontroli nie przekraczało 0,3% (v/v). W pierwszym etapie badania zebrano komórki SKOV-3, a następnie wybarwiono je za pomocą zestawu Muse Annexin V i Dead Cell Assay Kit (7-AAD) i analizowano za pomocą Muse Cell Analyzer (Merck Millipore). Testy powtarzano co najmniej trzy razy niezależnie.

4.4.2.2. Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach SKOV-3

W początkowych stadiach apoptozy dochodzi do depolaryzacji błony komórkowej, a następnie spadku wewnętrznego potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi\text{m}$), co wskazuje na niepoprawne funkcjonowanie mitochondrium komórkowego.

Zastosowanie mikrokapilarnego cytometru przepływowego umożliwia określenie wpływu α -hederyny na proces depolaryzacji błony mitochondrialnej w komórkach SKOV-3.

Komórki SKOV-3 wysiano w ilości 1×10^5 komórek/studzienkę i następnie traktowano α -hederyną o zakresie stężeń 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ przez 3 godziny. Taki okres inkubacji wybrano w celu zaobserwowania wczesnego stadium dysfunkcji mitochondrialnej komórek SKOV-3. Stężenie DMSO (próbka kontrolna) nie przekraczało 0,3% (obj./obj.). Komórki zebrano po 3 godzinach ekspozycji i

przygotowano zgodnie z protokołem producenta zestawu Mitopotential Muse (Merck Millipore). W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskuje się ilość (procent) zdepolaryzowanych/żywych komórek w badanej populacji. Próby powtarzano co najmniej trzy razy niezależnie.

4.4.2.3. Określenie spadku aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2 w hodowli SKOV-3

Białka z rodziny Bcl-2, zakotwiczone w cytozolu i/lub w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, wykazują działanie hamujące proces apoptozy. Zahamowanie ich aktywności skutkuje indukcją procesu apoptozy.

Wpływ α -hederyny na aktywację białka antyapoptotycznego Bcl-2 w komórkach SKOV-3 przeprowadzono badania z użyciem specyficznych przeciwciał za pomocą cytometru przepływowego.

Komórki SKOV-3 wysiano w ilości 5×10^5 komórek / studzienkę, a następnie potraktowano roztworem α -hederyny o zakresie stężeń 0,5-30 μg / ml przez 24 godziny. Stężenie DMSO w kontroli nie przekraczało 0,3% (v/v). Komórki następnie zebrano, przemyto PBS i, zgodnie z protokołem producenta, dodano mieszaninę specyficznych przeciwciał (fosfo-specyficzny anty-fosfo-Bcl-2 (Ser70) -Alexa Fluor 555 i anty-Bcl-2 - PECy5 sprzężone przeciwciała) z zestawu Muse Activation Dual Detection Kit (Merck Millipore). Komórki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut w ciemności, a następnie zmierzono całkowity poziom ekspresji Bcl-2 i aktywowanej postaci tego białka za pomocą Muse Cell Analyzer. Eksperymenty powtarzano minimum trzy razy niezależnie.

4.4.2.4. Określenie aktywności kaspazy-3/7 w badanych komórkach SKOV-3

Aktywację kaspazy-3 i kaspazy-7 określono za pomocą zestawu Muse Caspase-3/7 (Muse Cell Analyzer). Zestaw mierzy dwa istotne parametry zdrowia komórki - status apoptozy na podstawie aktywacji kaspazy 3/7 oraz status śmierci komórki na podstawie barwnika 7-aminoaktynomycyny D, który jest wskaźnikiem integralności strukturalnej błony komórkowej i śmierci komórki. Metoda pozwala na jednoczesne określenie procentu żywych, apoptotycznych (wczesnej i późnej apoptozy) oraz martwych komórek. Błona komórkowa stanowi barierę przepuszczalną dla nietoksycznego odczynnika Muse Caspase-3/7 zawierającego barwnik wiążący DNA,

który połączony jest z peptydowym substratem DEVD. Aktywna kaspaza - 3/7 powoduje odcięcie DEVD oraz uwolnienie barwnika, który wnika do jądra komórkowego i wiąże DNA, emitując fluorescencję. Stąd, wzrost fluorescencji dostarcza informacji na temat obecności aktywnej kaspazy – 3/7.

Komórki wysiano w ilości 1×10^5 komórek/studzienkę w 6-studzienkowych płytkach, a następnie potraktowano roztworem α -hederyny rozpuszczonej w DMSO o zakresie stężeń 0,5; 2; 5; 10; 13; 17; 20 i 30 $\mu\text{g/ml}$. Stężenie DMSO w kontroli nie przekraczało 0,1% (obj./obj.). Po 24 godzinach komórki zebrano, wybarwiono odczynnikami Muse Caspase-3/7 i inkubowano przez 30 minut w inkubatorze CO_2 ; następnie barwiono 7-AAD i inkubowano w temperaturze pokojowej w ciemności przez 5 minut. Wynikiem prowadzonego procesu możliwa jest ocena aktywności kaspazy-3 i kaspazy-7 na komórkach SKOV-3. Eksperyment powtórzono trzy razy niezależnie.

4.4.2.5. Badanie zahamowania fazy cyklu komórkowego w hodowli SKOV-3

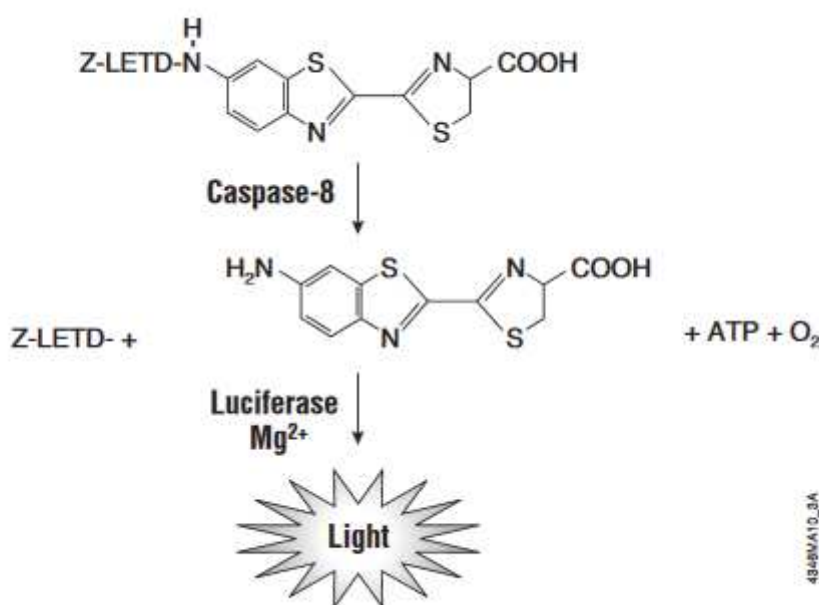
Badanie wpływu α -hederyny na przebiegający cykl komórkowy komórek SKOV-3 uwidoczniono w reakcji z barwnikiem interkalującym do DNA, jodkiem propidyny (PI), za pomocą mikrokapilarnego cytometru przepływowego oraz zestawu Muse Cell Cycle Assay (Merc Millipore).

Zastosowany barwnik pozwala na rozróżnienia komórek SKOV-3 na różnych etapach cyklu komórkowego. W prowadzonym eksperymencie komórki wysiewano w ilości 5×10^5 komórek / studzienkę w 6-studzienkowych płytkach, a następnie traktowano przez 24 godziny roztworem α -hederyny (rozpuszczonej w DMSO) o zakresie stężeń 0,5, 2, 10, 20 i 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Stężenie DMSO nie przekraczało 0,3% (v/v). Komórki SKOV-3 zebrano, wybarwiono odczynnikami Muse Cell Cycle zgodnie z protokołem producenta, inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej i analizowano za pomocą mikrokapilarnego cytometru przepływowego Muse Cell Analyzer. Eksperyment powtarzano co najmniej trzy razy niezależnie.

4.4.3. Określenie aktywacji kaspaz-8/9 w hodowli SKOV-3 za pomocą luminometru

Określenia aktywności kaspazy-8 oraz kaspazy-9 dokonano za pomocą zestawów odczynników Caspase-Glo 8 oraz Caspase-Glo 9 Assay Kits (Promega, USA), które umożliwiły przeprowadzenie pomiaru luminometrycznego. Test zawiera

luminogeny substrat kaspazy-8 lub kaspazy-9 (odpowiednio Z-LETD lub Z-LEHD; jest to kompleks sekwencji czteroaminokwasowej w połączeniu z aminolucyferyną) w układzie buforowym zoptymalizowanym pod kątem aktywności kaspaz, aktywności lucyferazy i lizy komórek. Dodanie buforu lizującego wraz z substratem Z (Z-LETD- lub Z-LEHD-aminilucyferyna) powoduje lizę komórek, a następnie uwolnienie z kompleksu Z przez aktywną kaspazę-8 lub -9 aminolucyferyny, która jest z kolei substratem dla lucyferazy. To powoduje wygenerowanie sygnału luminescencyjnego „typu jarzeniowego” (reakcja wytwarzana przez lucyferazę; Ryc. 8). Generowany sygnał jest proporcjonalny do aktywności kaspaz w badanych komórkach.



Ryc. 8. Schemat działania testu Caspase-Glo 8 and 9 Assay Kits (Promega, USA) wykorzystujący pomiar luminometryczny; źródło: Promega, technical bulletin.

Aktywność kaspazy-8 i kaspazy-9 zmierzono po 2, 5 i 24 godzinach ekspozycji komórek (1×10^4 komórek / studzienkę) na roztwór α -hederyny w DMSO o zakresie stężeń 0,5, 2, 5, 10, 13, 17, 20 i 30 $\mu\text{g/ml}$. Końcowe stężenie DMSO nie przekraczało 0,3% (v/v). Komórki następnie potraktowano Caspase-Glo 8 lub 9 Assay Kits (Promega, USA) zgodnie z protokołem producenta. Aktywność kaspaz analizowano za pomocą luminometru Glomax Multi + Detection System (Promega). Eksperyment powtórzono co najmniej trzy razy, niezależnie.

4.5. Analiza statystyczna

Metoda MTT

W analizach ocenę aktywności badanej próby do danej linii komórkowej przeprowadzano w 6 powtórzeniach w jednym eksperymencie. Każdy eksperyment powtarzano trzykrotnie. Dla uzyskiwanych wyników wyliczano wartość średnią i odchylenie standardowe. Obliczenia wszystkich pomiarów wykonano w programie Grafit 7.0.

System RTCA (Real Time xCELLigence)

Obliczenia uzyskanych pomiarów wykonano stosując oprogramowanie RTCA 1.2.1. Program wykreśla krzywe sigmoidalne zależności dawka-odpowiedź dla danych punktów pomiarowych i automatycznie wylicza wartość IC_{50} jak również współczynnik determinacji R^2 . Każdy eksperyment powtarzano trzykrotnie w odstępie czasowym.

W przypadku eksperymentów z zakresu regeneracji E-płytek RTCA, wszystkie dane wyrażono jako odchylenie standardowe z 10 powtórzeń ($\pm SD$). Porównania statystycznego między wynikami uzyskanymi z eksperymentów przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowego testu ANOVA. Różnice między poszczególnymi grupami wyników uznawano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

Muse

Obliczenia uzyskanych pomiarów uzyskano za pomocą systemu MuseTM (Merck Millipore), który obejmuje instrument minicytometr przepływowy Muse wraz ze zintegrowanym komputerem i oprogramowaniem do akwizycji i analizy danych. System automatycznie zlicza zawartość [%] poszczególnych populacji otrzymanych komórek. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe ($\pm SD$). Każdy eksperyment powtarzano trzykrotnie w odstępie czasowym. Otrzymane średnie wartości były porównywane z wynikiem kontroli za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych względem zmiennych. Różnice między wynikami były statystycznie istotne przy $p < 0,05$ i zostały oznaczone na wykresach jako „*”.

Luminometr

Zasada działania luminometru oparta jest o GloMax®-Multi Detection System wraz ze zintegrowanym komputerem i oprogramowaniem. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe (\pm SD). Każdy eksperyment z użyciem luminometru powtarzano trzykrotnie w odstępie czasowym. Otrzymane średnie wartości były porównywane z wynikiem kontroli za pomocą testu t-Studenta. Różnice między wynikami były statystycznie istotne przy $p < 0,05$ i zostały oznaczone na wykresie jako „*”.

IV. WYNIKI I DYSKUSJA

1. Wyniki badań aktywności cytotoksycznej ekstraktów i frakcji *Nigella sativa*

1.1. Wyniki aktywności cytotoksycznej *in vitro* ekstraktów roślinnych z *Nigella sativa*

Ekstrakty oraz frakcje pozyskane z nasion czarnuszki siewnej otrzymane zgodnie z metodyką opisaną w rozdz. 4.1 poddano analizie ich aktywności cytotoksycznej. W badaniach użyto trzech linii komórkowych: linię komórek raka jajnika SKOV-3, linię ludzkiego raka szyjki macicy HeLa oraz nienowotworową linię ludzkich keratynocytów HaCaT. Badanie przeprowadzono zgodnie z opisem w metodyce pracy (rozdz. 4.2.1 i 4.2.2).

W celu określenia aktywności cytotoksycznej badanych ekstraktów posłużono się systemem **Real-Time xCELLigence**, który działa w oparciu o elektryczną impedancję mierzoną w wielodołkowych płytkach wyposażonych w bioelektrody. Pozwala to na monitorowanie adherentnych komórek w sposób ciągły i ilościowy (164). Każda zmiana żywotności komórek, morfologii, liczby lub stopnia adhezji ma wpływ na impedancję elektrody, która jest reprezentowana przez parametr CI (165, 166). Wartość IC_{50} obliczano na podstawie CI w każdym punkcie pomiarowym doświadczenia. Uzyskiwane dane gromadzone są w ciągu całego okresu trwania eksperymentu. Zalety systemu RTCA zostały opisane w rozdz. 2.2. Dzięki zastosowaniu matryc czujników w płytkach, system RTCA wykrywa zmiany w komórkach z większą czułością niż inne testy cytotoksyczności (124, 125) i dostarcza więcej informacji niż wartości uzyskiwane w klasycznych testach (127, 128).

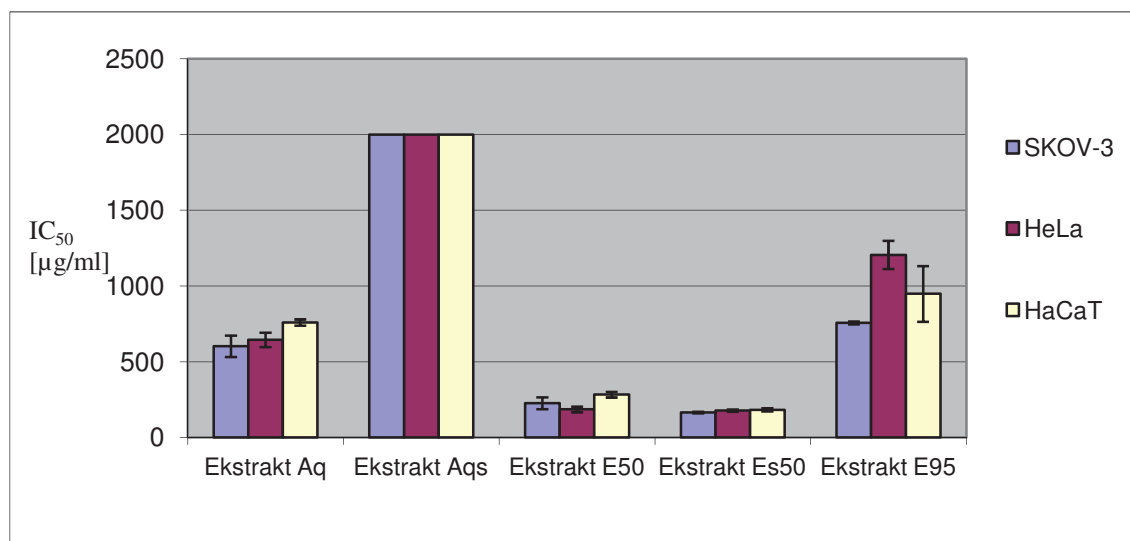
Wyniki aktywności cytotoksycznej IC_{50} ekstraktów pierwotnych otrzymanych z nasion *Nigella sativa*, uzyskane metodą RTCA i MTT przedstawiono w Tabeli 2 i Tabeli 3 oraz na Ryc. 9 i Ryc. 10.

Analizowane wyniki wskazują, że ekstrakt wodny **Aqs** wspomagany ultradźwiękami (sonifikowany), jak również 95% ekstrakt etanolowy **E95** nie wykazują aktywności cytotoksycznej w stosunku do wszystkich trzech badanych linii

komórkowych: SKOV-3, HeLa i HaCaT. Niską aktywność wykazuje ekstrakt wodny **Aq**, wyższą ekstrakty etanolowe, zarówno 50% ekstrakt etanolowy **E50**, jak i 50% ekstrakt etanolowy wspomagany ultradźwiękami **Es50**, przy czym ekstrakt **Es50** (wspomagany ultradźwiękami) wykazał najsilniejsze działanie cytotoksyczne (wartości IC_{50} : 165,56 $\mu\text{g/ml}$, 178,16 $\mu\text{g/ml}$ i 183,30 $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio dla hodowli komórkowych SKOV-3, HeLa i HaCaT).

Tabela 2. Średnie wyniki IC_{50} dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą systemu Real-Time xCELLigence (n=12)

Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT	
	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$
Ekstrakt Aq	602,70	71,05	645,39	47,28	759,55	20,58
Ekstrakt Aqs	2000,00	0,00	2000,00	0,00	2000,00	0,00
Ekstrakt E50	226,50	38,89	185,57	17,79	282,90	18,24
Ekstrakt Es50	165,56	5,18	178,16	7,94	183,30	10,04
Ekstrakt E95	757,62	9,11	1206,10	93,34	948,37	183,48



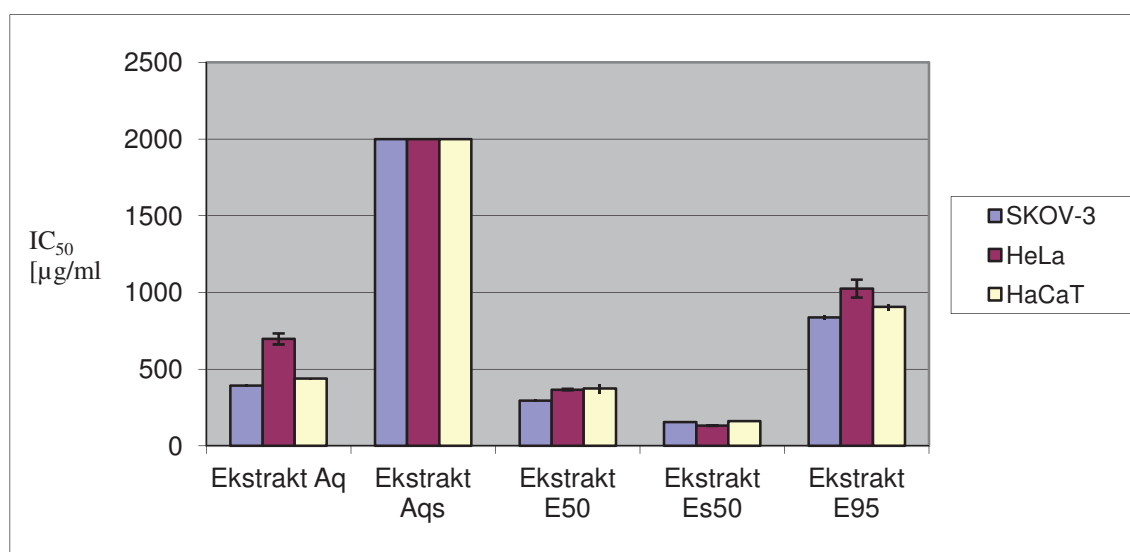
Ryc. 9. Średnie wyniki IC_{50} dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą systemu RTCA (n=12).

Wyniki wartości IC_{50} dla ekstraktów określone w teście MTT potwierdziły wartości IC_{50} uzyskane z zastosowaniem systemu RTCA (Tabela 3, Ryc. 10).

Najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazały 50% ekstrakty etanolowe **Es50**, jak i **E50**. Analogicznie jak w przypadku analiz RTCA, wartości IC_{50} dla ekstraktu **Es50** otrzymane metodą MTT są najwyższe: 155,34 $\mu\text{g/ml}$, 132,48 $\mu\text{g/ml}$ i 160,63 $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio dla hodowli komórkowych SKOV-3, HeLa, HaCaT.

Tabela 3. Średnie wyniki IC_{50} dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą testu MTT (n=18)

Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT	
	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$
Ekstrakt Aq	391,74	8,29	697,18	36,13	439,00	5,08
Ekstrakt Aqs	2000,00	0,00	2000,00	0,00	2000,00	0,00
Ekstrakt E50	294,01	9,48	366,63	4,61	373,03	31,54
Ekstrakt Es50	155,34	4,09	132,48	1,14	160,63	0,97
Ekstrakt E95	837,78	13,68	1025,93	58,57	906,19	22,13



Ryc. 10. Średnie wyniki IC_{50} dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą testu MTT (n=18).

Uzyskane wyniki wskazują, na znaczący wpływ nie tylko stosowanego rozpuszczalnika (woda, 50% etanol, 95% etanol), ale również sposobu ekstrakcji. Z przeglądu piśmiennictwa dotyczącego ekstrakcji surowców roślinnych wspomaganej ultradźwiękami – UAE (Ultrasound assisted extraction) wynika, że jest to proces

zwiększający efektywność ekstrakcji, ale również mogący wpływać degradująco na ekstrahowane związki.

Ekstrakcja UAE jest procesem złożonym. W procesie tym wykorzystuje się zdolność fal ultradźwiękowych o małej częstotliwości (20-100 kHz) do wywoływania efektu kawitacji (łac. *cavitas* – jama, pustka), który ma wpływ na właściwości fizykochemiczne i biochemiczne ekstrahowanych materiałów (167, 168).

Kawitacja jest spowodowana implozją pęcherzyków gazu (169). Tworzące się w miejscu zderzenia pęcherzyków kawitacyjnych siły mechaniczne jak również fala generowana po ich implozji są czynnikami wpływającymi na uszkodzanie komórek. Efektem kawitacji w przypadku ekstrakcji materiałów roślinnych jest dezintegracja struktur komórkowych, niszczenie ścian i błon komórkowych, co skutkuje sprawniejszym uwalnianiem zawartości komórki do środowiska. Jako skutecznie wspomagającą metodą w procesie ekstrakcji UAE była stosowana m.in. w ekstrakcji etanolem związków fenolowych z owoców *Euterpe edulis* i *Vaccinium myrtillus* (170).

Niekorzystny wpływ UAE, przy zastosowaniu ekstrakcji wodnej może być spowodowany zachodzącą sonolizą. Proces sonolizy wykorzystywany jest m.in. do destrukcji estrogenów obecnych w komunalnych i przemysłowych ściekach (171).

Rozkład ekstrahowanych z użyciem UAE wtórnych metabolitów z roślin, z użyciem UAE stwierdzono m.in. dla związków terpenowych (172) oraz alkaloidów (167).

Uzyskane wyniki wskazują również, że związki cytotoksyczne czarnuszki odznaczają się różną polarnością. Potwierdza to stwierdzona zróżnicowana aktywność cytotoksyczna ekstraktów. Wyższą aktywność wykazują ekstrakty wodno-etanolowe (E50 i Es50) w stosunku do nieaktywnego ekstraktu etanolowego 95% (E95), jak również ekstraktu wodnego o niskiej aktywności (Aq).

Wartości IC_{50} otrzymane dla badanych ekstraktów pierwotnych są znacznie wyższe od wskazanych przez Amerykański Narodowy Instytut Raka (ang. US National Cancer Institute – NCI), który przyjmuje, że za aktywne cytotoksycznie można przyjąć ekstrakty, dla których wartości $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ (173). W prowadzonych badaniach, ze względu na fakt stwierdzonej obecności w nasionach czarnuszki siewnej saponin triterpenowych, w tym aktywnego saponozydu – α -hedryny (8, 26), postanowiono przeprowadzić analizy aktywności frakcji otrzymanych z ekstraktów pierwotnych (frakcje butanolowe i z octanem etylu).

1.2. Wyniki aktywności cytotoksycznej *in vitro* frakcji roślinnych z *Nigella sativa*

Zgodnie z metodyką opisaną w rozdz. 4.1 z ekstraktów pierwotnych wodnych i etanolowych z nasion *Nigella sativa*, przygotowano frakcje butanolowe, z octanem etylu i wodne (Schemat 1) str. 44.

Wyniki aktywności cytotoksycznej IC_{50} w stosunku do trzech badanych linii komórkowych: SKOV-3, HeLa i HaCaT, otrzymano przy zastosowaniu testu MTT oraz systemu RTCA. Wyniki IC_{50} dla frakcji:

- butanolowej – **B**
- octanu etylu – **I**

przygotowanych z wodnego ekstraktu pierwotnego A, przedstawiono w tabelach (Tabela 4,

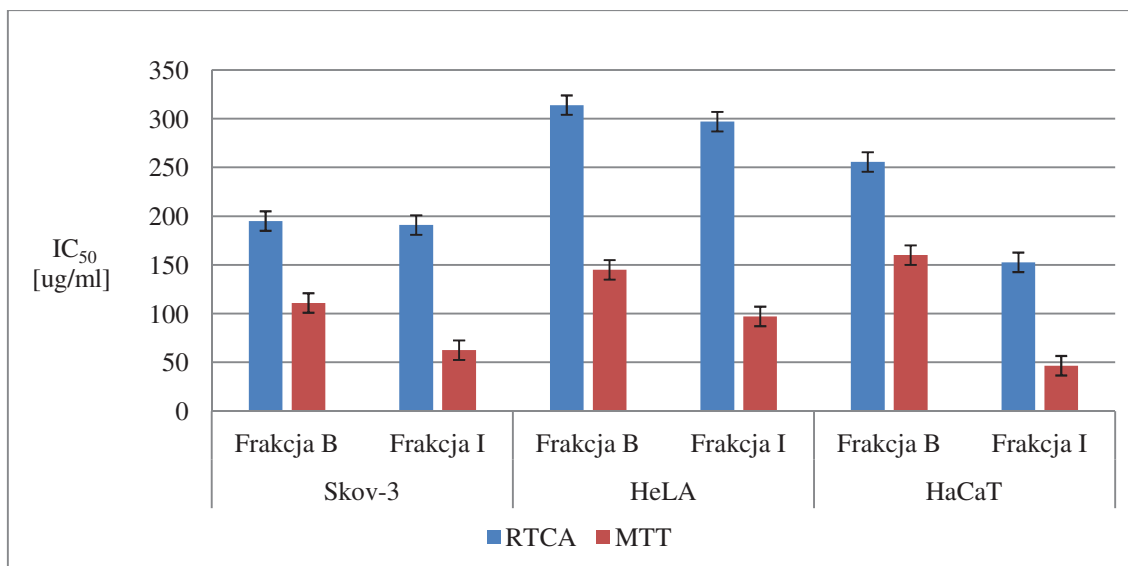
Tabela 5) oraz na rycinach Ryc. 11. Dla frakcji wodnej po butanolu oraz frakcji wodnej po octanie etylu uzyskano wartości $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$.

Tabela 4. Wyniki IC_{50} otrzymane metodą RTCA dla frakcji butanolowej – B, octanu etylu – I, przygotowanych z pierwotnego ekstraktu wodnego Aq, (n=12).

RTCA Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT		
	FRAKCJA	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$
	Frakcja B	195,04	3,88	313,90	10,35	255,61	4,65
	Frakcja I	190,89	4,23	297,00	8,48	152,67	10,78

Tabela 5. Wyniki IC_{50} otrzymane metodą MTT dla frakcji butanolowej – B, octanu etylu – I, przygotowanych z pierwotnego ekstraktu wodnego Aq, (n=12).

MTT Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT		
	FRAKCJA	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	$\pm\text{SD}$
	Frakcja B	111,01	14,17	144,88	12,65	160,06	7,17
	Frakcja I	62,60	5,15	97,18	5,35	46,66	1,63



Ryc. 11. Porównanie IC₅₀ frakcji butanolowej (B) oraz octanu etylu (I) otrzymanych z wodnego ekstraktu pierwotnego metodą RTCA i MTT.

Analogicznie jak dla frakcji otrzymanych z pierwotnego ekstraktu wodnego, analizowano aktywność cytotoksyczną frakcji otrzymanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% (E50).

Wyniki aktywności cytotoksycznej IC₅₀ w stosunku do trzech badanych linii komórkowych: SKOV-3, HeLa i HaCaT, otrzymane przy zastosowaniu systemu RTCA i testu MTT, dla frakcji przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% (E50):

- frakcji butanolowej – **L**
- octanu etylu – **N**
- wodnej po octanie etylu - **O**

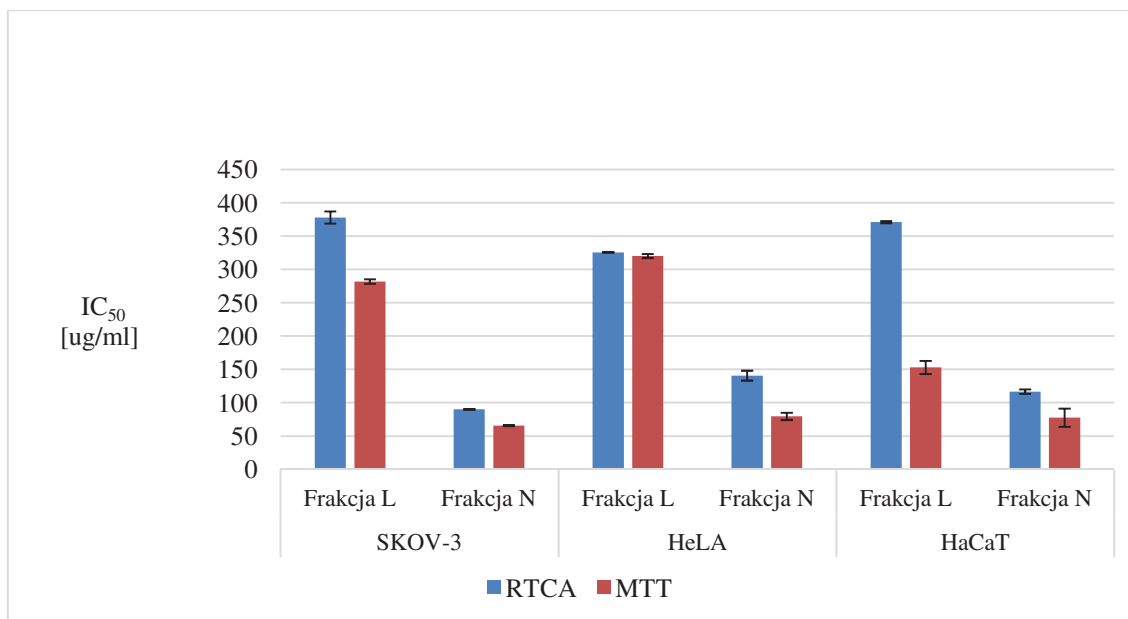
przedstawiono w Tabeli 6 i Tabeli 7 oraz na Ryc. 12. Dla frakcji wodnej po ekstrakcji butanolowej otrzymano wynik IC₅₀ > 1000 µg/ml.

Tabela 6. Wyniki IC₅₀ otrzymane metodą RTCA dla frakcji butanolowej – L, octanu etylu – N, wodnej po octanie etylu – O przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% (E50).

RTCA Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT	
	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD
Frakcja L	377,90	9,20	325,60	0,42	371,13	1,58
Frakcja N	90,08	0,61	140,72	7,39	88,30	2,67
Frakcja O	113,27	8,19	154,18	6,53	116,54	3,35

Tabela 7. Wyniki IC₅₀ otrzymane metodą MTT dla frakcji butanolowej –L, octanu etylu – N, wodnej po octanie etylu – O przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% (E50).

MTT Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT	
	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD
Frakcja L	281,89	3,24	320,19	3,00	152,96	9,71
Frakcja N	65,80	0,67	79,56	5,37	77,67	13,70
Frakcja O	113,24	5,95	139,30	7,58	82,40	2,91



Ryc. 12. Porównanie IC₅₀ frakcji butanolowej (L) oraz octanu etylu (N) z ekstraktu pierwotnego etanolowego 50% (E50) metodą RTCA i MTT.

Wyniki badania aktywności cytotoksycznej dla frakcji uzyskanych z ekstraktu **Es50** etanolowego 50%, otrzymanego w procesie ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami :

- butanolowej – **T**
- octanu etylu – **S**

przedstawiono w Tabela 8 i Tabela 9 oraz na Ryc. 13.

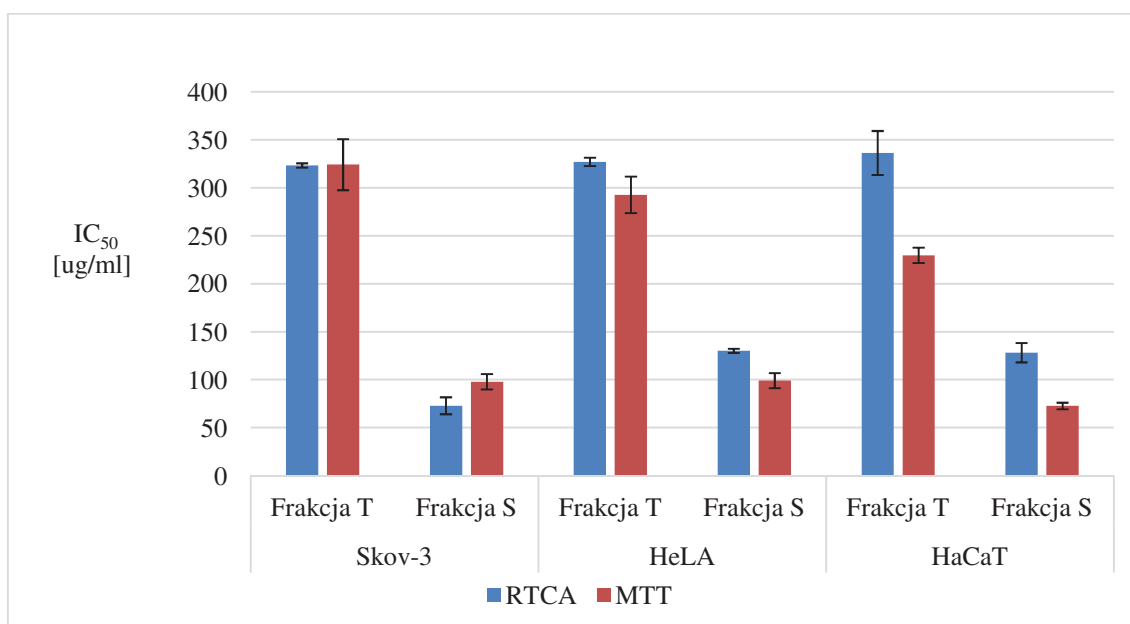
Dla poddanych badaniom frakcji wodnych po ekstrakcji butanolowej i po ekstrakcji octanem etylu otrzymano również wynik IC₅₀ > 1000 µg/ml.

Tabela 8. Wyniki IC₅₀ otrzymane metodą RTCA dla frakcji (butanolowej – T, octanu etylu – S) przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% wspomaganego ultradźwiękami (Es50).

RTCA Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT	
	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD
Frakcja T	323,36	2,28	327,20	4,34	336,40	22,93
Frakcja S	72,87	8,82	130,07	2,17	128,16	10,07

Tabela 9. Wyniki IC₅₀ otrzymane metodą MTT dla frakcji (butanolowej – T, octanu etylu – S) przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% wspomaganego ultradźwiękami (Es50).

MTT Linia komórkowa	SKOV-3		HeLa		HaCaT	
	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD	IC ₅₀ [µg/ml]	±SD
Frakcja T	342,21	26,64	292,78	18,98	229,6	8,00
Frakcja S	97,83	8,05	99,09	7,76	72,67	3,34



Ryc. 13. Porównanie IC₅₀ frakcji butanolowej oraz octanu etylu z ekstraktu pierwotnego etanolowego 50% wspomaganego ultradźwiękami (Es50) metodą RTCA i MTT.

Analiza aktywności cytotoksycznej badanych frakcji wskazuje, że najwyższymi aktywnościami odznaczają się frakcje z octanem etylu, otrzymane z ekstraktów 50 % etanolowych (frakcje N i S). Dla wymienionych frakcji, oznaczone IC₅₀ na linii SKOV-3 mają wartości poniżej 100 µg/ml, w zakresie od 65,8 µg/ml do 97,83 µg/ml, niezależnie od metody oznaczania. Wyniki świadczące o przechodzeniu substancji aktywnych do organicznego rozpuszczalnika są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami

(15, 47, 80). Uzyskane wartości są jednak wyraźnie wyższe od doniesień literaturowych dotyczących podobnych ekstraktów, czy frakcji z czarnuszki siewnej (47, 82, 83, 174). Przykładowo, frakcja octanu etylu wykazywała cytotoksyczność przy IC_{50} wynoszącym od 11 do 22 $\mu\text{g/ml}$ dla różnych linii nowotworowych pochodzących od guzów litych (Wehi-164, LL-2, Gep G2 i innych), lecz nie dostępne są informacje na temat wpływu tej frakcji na komórki raka jajnika. Różnice te mogą być wynikiem pewnych różnic w składzie surowca, zastosowanych metod oznaczania aktywności cytotoksycznej, bądź sposobem przeprowadzonej ekstrakcji związków, jak również badaną linią komórkową.

Dla badanych frakcji nie zaobserwowano także, aby były one selektywnie cytotoksyczne wobec linii nowotworowych. Linia nienowotworowa HaCat okazała się linią najwrażliwszą w wielu przeprowadzonych eksperymentach. W niniejszej pracy za kontrolę posłużyła nienowotworowa linia keratynocytów (HaCaT), gdyż posiada ona ludzkie pochodzenie oraz epitelialną morfologię, tak jak badana linia SKOV-3. W kolekcji ATCC nie istnieje linia komórek nienowotworowych jajnika. Dostępne są jedynie komórki jajnika nienowotworowe takich gatunków jak: *Spodoptera sp.*, *Cricetulus sp.*, *Antheraea sp.* Brak selektywności potencjalnych badanych związków w terapii nowotworu to częsty problem w poszukiwaniu nowych leków (175). Jednakże, w opozycji do uzyskanych wyników w niniejszej pracy prezentują się niektóre dane literaturowe na temat wybiórczego działania ekstraktów oraz wtórnych metabolitów pozyskanych z nasion czarnuszki siewnej. Dane te wskazują na wysoką aktywność tychże związków jedynie wobec linii nowotworowych, bez efektu hamującego wzrost komórek kontrolnych, nienowotworowych (80, 83, 84). Przykładowo, metanolowy ekstrakt sporządzony metodą maceracji na zimno powodował inhibicję wzrostu komórek nowotworowych linii HL-60 oraz linii U-937 z wartościami IC_{50} odpowiednio 13,7 $\mu\text{g/ml}$ oraz 28,31 $\mu\text{g/ml}$, natomiast nie wykazywał zahamowania wzrostu komórek kontrolnych, nienowotworowych linii HEK-293T. W tym samym badaniu zastosowany lek cytostatyczny, cyklofosfamid, powodował inhibicję każdej z testowanych linii. Podobnie, nie zaobserwowano wpływu badanej frakcji octanu etylu na linię ludzkich, nienowotworowych komórek śródbłonna w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ tej frakcji.

Wstępne analizy oceny zawartości α -hederyny w badanych frakcjach metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) wykazały jej obecność we frakcjach otrzymanych z ekstraktów etanolowych 50% oraz potwierdziły jej brak w ekstraktach i frakcjach niehamujących proliferacji badanych linii komórkowych. Ekstrakty etanolowe

50% i pochodzące z nich frakcje octanu etylu odznaczały się w niniejszych badaniach najsilniejszą aktywnością spośród wszystkich testowanych.

Istotną kwestią jest porównanie obu metod zastosowanych do badania cytotoksyczności. Największe różnice w uzyskanych wartościach IC_{50} zanotowano dla frakcji I (octanu etylu z ekstraktu pierwotnego wodnego Aq). Wartości IC_{50} oznaczone metodą MTT wynoszą poniżej 100 $\mu\text{g/ml}$; podczas, gdy oznaczone przez system RTCA wartości IC_{50} są w zakresie 152,67 - 297,00 $\mu\text{g/ml}$. Różnice te najprawdopodobniej spowodowane są faktem, że system RTCA dostarcza wyników zanalizowanych podczas całości przebiegu eksperymentu, obrazując cały profil działania związku na testowane komórki. Jeśli analizowany związek nie charakteryzuje się bardzo wysokimi właściwościami cytotoksycznymi, pozwalając komórkom na względnie długie przeżycie w czasie trwania eksperymentu zanim dojdzie do spadku ich przeżywalności, to wówczas system odnotowuje także te pierwsze, względnie wysokie wartości IC_{50} , które podnoszą ostateczny wynik. Przeciwnie dzieje się w przypadku zastosowania klasycznego testu MTT, który nie umożliwia prześledzenia wpływu badanych związków podczas trwania danej analizy. W przypadku, gdy analizowana substancja/związek wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną, powodując szybką śmierć inkubowanych komórek, ostateczny wynik efektu cytotoksycznego uzyskanego w wyniku zastosowanego systemu RTCA nie różni się znacząco od zastosowanych klasycznych metod analizy cytotoksyczności, jak np. MTT. Prześledzenie całego profilu badanego związku, czy frakcji umożliwia obserwację ponownej proliferacji komórki nowotworowej, po uprzednio zaobserwowanym spadku przeżywalności, tzw. „efekt odbicia”. Dodatkowo, uzyskane profile można porównać do profili substancji cytotoksycznych o znanych, zbadanych właściwościach przeciwnowotworowych w celu oszacowania ich potencjału antynowotworowego.

2. Wyniki badań fitochemicznych frakcji gatunku *Nigella sativa*

2.3. Wyniki analizy HPLC wybranych frakcji otrzymanych z ekstraktów nasion *Nigella sativa*

Analiza zawartości α -hederyny prowadzona była metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), zgodnie z opisem w rozdziale 4.3.1.

Analizy przeprowadzono na Chromatografie Acquity Ultra Performance Liquid Chromatograph firmy Waters wyposażonym w detektor DAD, w następujących warunkach:

Kolumna: LumiSep HPLC column, C18 3 μ m, 120Å, 2,1x50mm.

Temperatura kolumny: 35°C

Faza ruchoma:

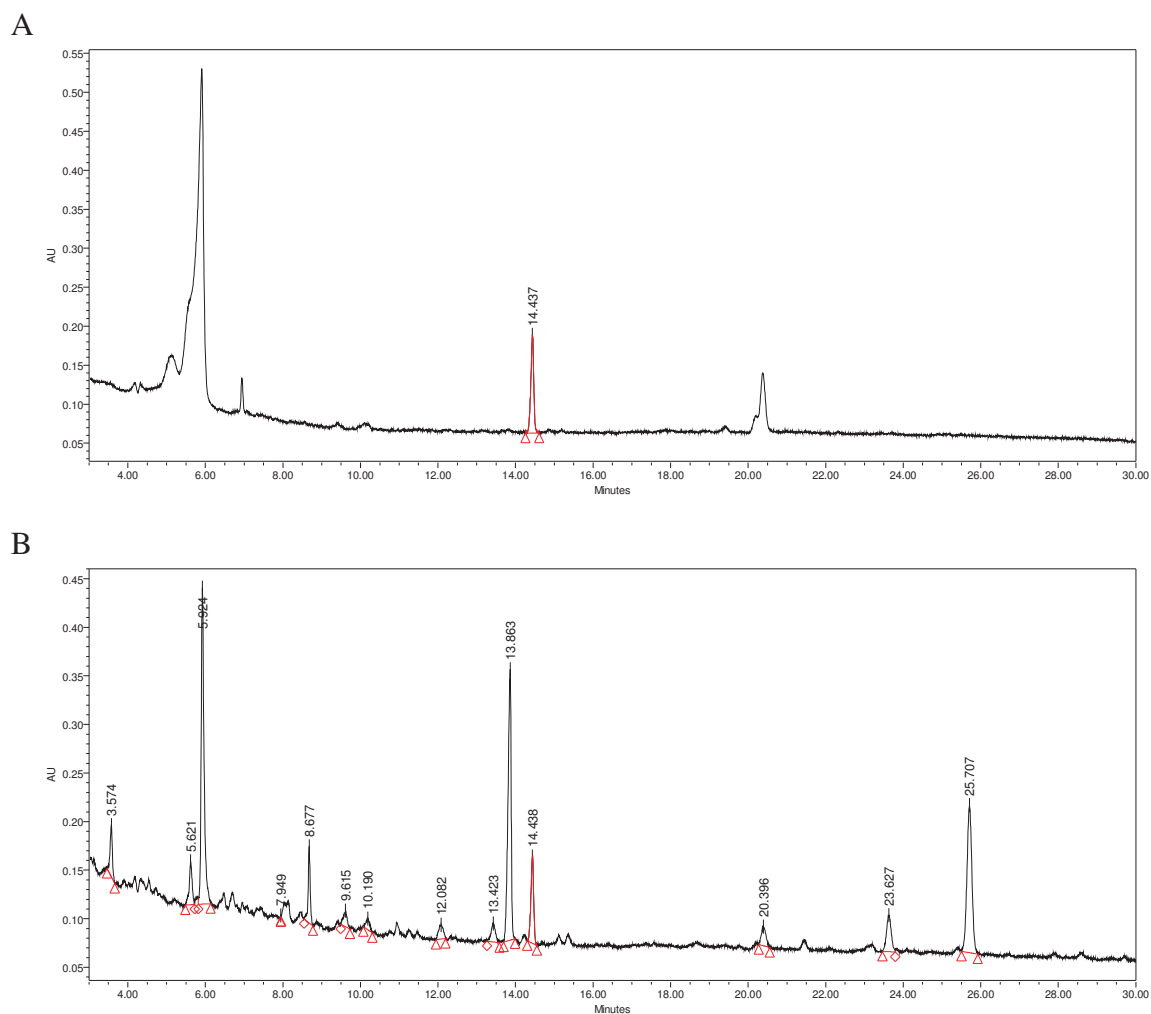
A: H₂O, 0,1% kwas mrówkowy

B: 90% ACN 0,1% kwas mrówkowy

Czas (min)	Przepływ (mL/min)	%A	%B
0	0,3	90	10
30	0,3	0	100
35	0,3	90	10

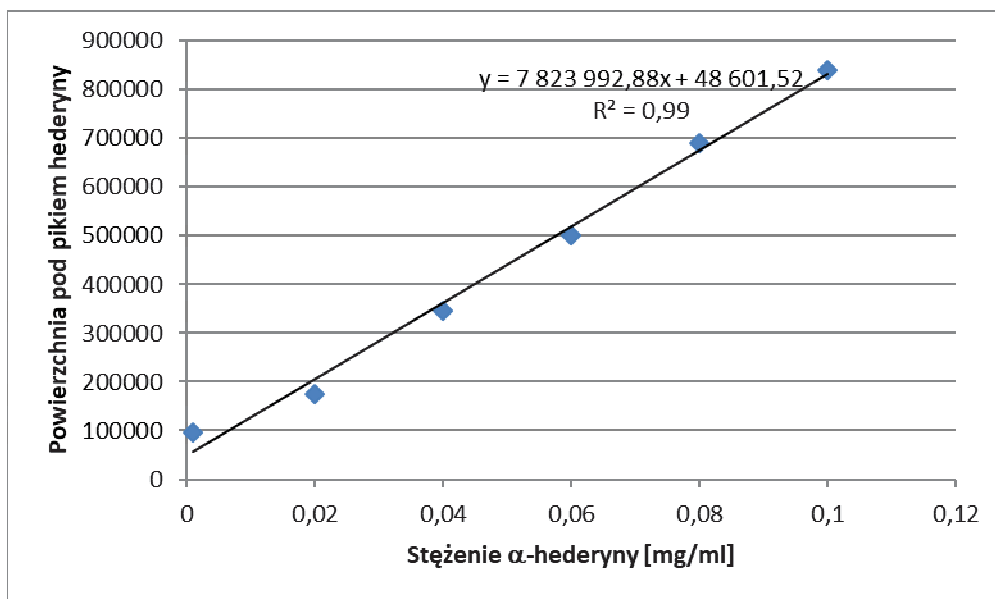
W identyfikacji α -hederyny w badanych próbach uwzględniono wartości czasu retencji (t_R) oraz przebieg widma UV z użyciem detektora DAD.

Przykład chromatogramów α -hederyny i frakcji N przedstawiono na Ryc. 14. Pík α -hederyny zaznaczony jest na czerwono na obu chromatogramach.



Ryc. 14. Chromatogramy HPLC α -hederyny (A) i frakcji N (B) *Nigella sativa*

W celu oznaczenia α -hederyny w analizowanych frakcjach *Nigella sativa*, przygotowano krzywą kalibracji (Ryc. 15), na podstawie analizy HPLC serii 6 roztworów wzorcowej α -hederyny w DMSO, o stężeniach odpowiednio: 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 oraz 0,001 mg/ml.



Ryc. 15. Krzywa kalibracji α-hederyny

Zawartość α-hederyny oznaczano we frakcjach ekstraktów etanolowych: **E50** i **Es50**. Analizowano frakcje butanolowe: **L** i **T** oraz frakcje octanu etylu: **N** i **S**.

Na podstawie uzyskanej krzywej kalibracji i otrzymanych chromatogramów badanych frakcji obliczono zawartość α-hederyny w próbkach w miligramach α-hederyny na gram ekstraktu:

FRAKCJA	L	T	N	S
α-hederyna [mg/g]	5	7	33	23

Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakcja α-hederyny z najwyższą efektywnością ma miejsce przy zastosowaniu octanu etylu.

Z przeglądu piśmiennictwa dotyczącego badań fitochemicznych *Nigella sativa*, tylko w pojedynczych pracach są informacje o stwierdzonej obecności α-hederyny w nasionach tego gatunku. W surowcu pochodzącym z Izraela analiza składu jakościowego metodą UPLC-Q-TOF-MS umożliwia identyfikację α-hederyny (8). Również w nasionach *Nigella sativa* z Singapuru zidentyfikowano α-hederynę (26), bez analizy ilościowej.

2.4. Identyfikacja pochodnej hederageniny w nasionach *Nigella sativa*

W badaniach mających na celu identyfikację saponin triterpenowych w nasionach czarnuszki siewnej, przeprowadzono analizy zgodnie z opisem zawartym w rozdz. 4.3.2.

Analizy ekstraktów i frakcji *Nigella sativa* oraz określenie struktury pochodnej hederageniny prowadzono we współpracy z Pracownią Biochemii Strukturalnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Dla analizowanych ekstraktów i frakcji rejestrowano widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) na spektrometrze Bruker AVANCE III 500 MHz wyposażonym w szerokopasmową sondę BBFO.

Z frakcji butanolowych wyizolowano związek, dla którego zarejestrowano ponadto widma dwuwymiarowe (2D NMR) homokorelacyjne ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY, TOCSY, ROESY) i heterokorelacyjne ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - HSQC, HMBC) wykorzystując standardowe sekwencje pulsów firmy Bruker. Na podstawie analizy ww. widm zestawiono wszystkie przesunięcia chemiczne ^1H i ^{13}C , wartości, których przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Przesunięcia chemiczne ^1H i ^{13}C NMR w aglikonie

Numer atomu węgla	^{13}C	^1H
1	38.34	1.633, 0.989
2	25.12	1.884, 1.771
3	80.98	3.638
4	42.71	-
5	46.80	1.286
6	17.35	1.506, 1.391
7	31.98	1.618, 1.308
8	39.10	-
9	47.46	1.652
10	36.31	-
11	23.12	1.921
12	122.36	5.282
13	143.50	-

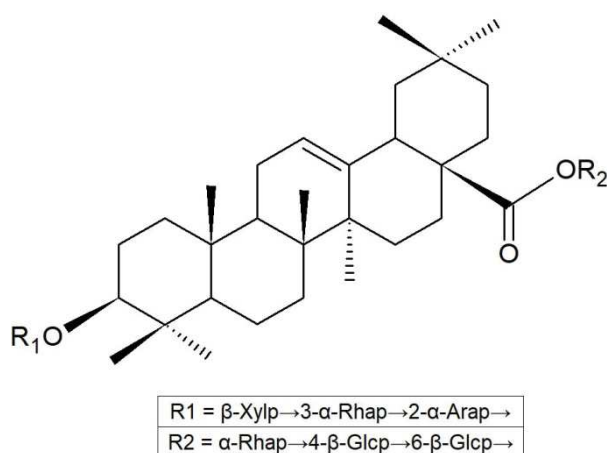
14	41.60	-
15	27.66	1.807, 1.107
16	22.75	2.071, 1.729
17	46.45	-
18	41.10	2.881
19	45.85	1.734, 1.176
20	30.22	-
21	33.32	1.414, 1.237
22	31.84	1.737
23	63.30	3.547, 3.371
24	12.35	0.727
25	15.07	0.997
26	16.47	0.825
27	24.83	1.196
28	176.72	-
29	32.07	0.931
30	22.71	0.967

Reszta	Numer atomu węgla	¹³ C	¹ H
t-Pen (E)	1	105.16	4.510
	2	73.82	3.317
	3	76.37	3.354
	4	69.66	3.513
	5	65.63	3.888, 3.236
→3-α-Rhap (B)	1	99.90	5.243
	2	70.26	4.101
	3	80.76	3.871
	4	71.38	3.590
	5	68.54	3.930
	6	16.64	1.270
→2-Penp (D)	1	103.31	4.549
	2	74.71	3.725
	3	72.87	3.717
	4	68.30	3.776
	5	64.09	3.858, 3.528
→t-α-Rhap	1	101.51	4.863

(C)	2	71.03	3.861
	3	70.85	3.657
	4	72.33	3.424
	5	69.19	3.984
	6	16.46	1.289
→4-β-Glcp (F)	1	102.84	4.427
	2	73.88	3.247
	3	75.30	3.485
	4	78.15	3.556
	5	75.30	3.320
	6	60.51	3.821, 3.675
→6-β-Glcp (A)	1	94.30	5.354
	2	72.45	3.355
	3	76.73	3.546
	4	69.60	3.421
	5	76.90	3.424
	6	68.06	4.103, 3.813

Na podstawie uzyskanych wyników określono strukturę wyizolowanego związku:

3-O-[β -D-ksylopiranozylo-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozylo]-28-O-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozyd]-hederageniny

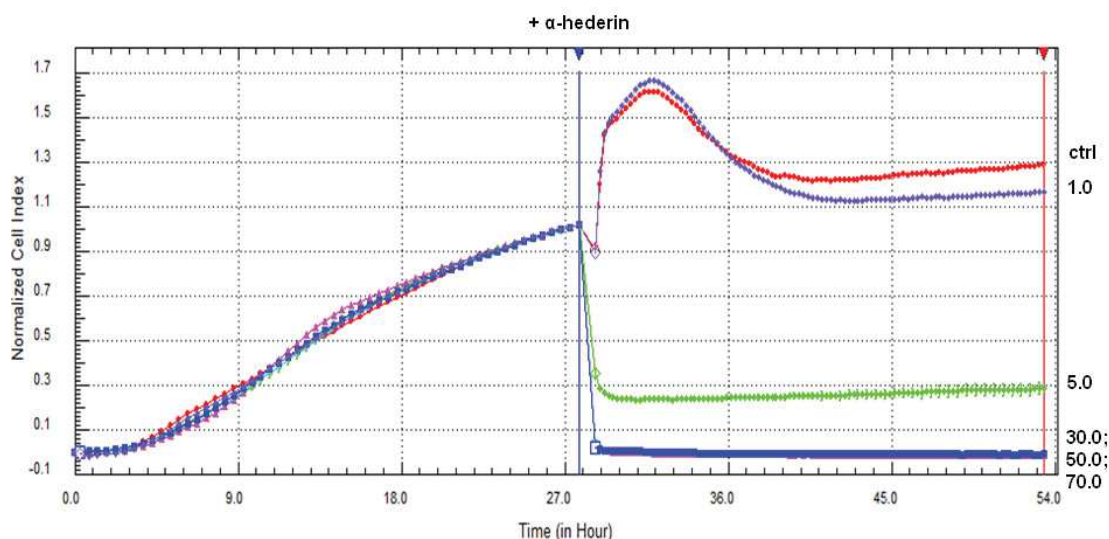


Określona struktura została potwierdzona za pomocą widm mas – MALDI TOF. Widma mas zostały zarejestrowane na spektrometrze Bruker BIFLEX III MALDI TOF, wyposażonym w laser azotowy ($\lambda=337\text{nm}$), wykorzystując kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy jako matrycę.

Stwierdzone występowanie pochodnej hederageniny w nasionach czarnuszki siewnej w surowcu polskiego pochodzenia jest potwierdzeniem występowania tego metabolitu w gatunku *Nigella sativa*. Uprzednio, metabolit ten został wydzielony i zidentyfikowany w badaniach saponin nasion *Nigella sativa*, w surowcach pochodzących z Indii (11) i Turcji (12).

3. Wyniki aktywności cytotoksycznej *in vitro* α -hederyny na wybranych liniach komórkowych.

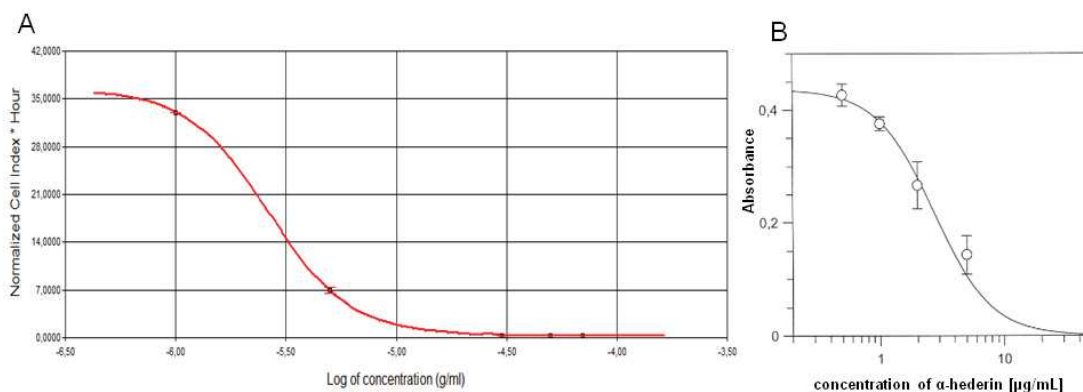
Wpływ α -hederyny, aktywnej saponiny triterpenowej, na żywotność komórek przetestowano za pomocą systemu Real-Time xCELLigence oraz testu MTT. Badanie cytotoksyczności przeprowadzono w stosunku do linii komórek SKOV-3 i HeLa, a także nienowotworowej linii HaCaT. Komórki w metodzie RTCA traktowano roztworem α -hederyny, w zakresie stężeń 1–70 $\mu\text{g/ml}$, a w teście MTT w zakresie stężeń 0,5–50 $\mu\text{g/ml}$. Przykładowy diagram przeżywalności komórek linii raka jajnika, SKOV-3 pozyskany za pomocą systemu RTCA obrazuje Ryc. 16.



Ryc. 16. Przykładowy diagram przeżywalności komórek linii raka jajnika SKOV-3 po 24-godzinnej inkubacji ze wzrastającymi stężeniami α -HN pozyskany za pomocą analizy systemem RTCA; kontrola – komórki inkubowane z 0,7% DMSO.

Żywotność komórek SKOV-3 spada po potraktowaniu roztworem α -hederyny. Krzywe są oznaczone cyframi i liczbami, które reprezentują wzrastające stężenia α -hederyny (odpowiednio 1–70 $\mu\text{g/ml}$), kontrolę stanowią komórki SKOV-3 inkubowane z 0,7% DMSO.

W prowadzonych badaniach analizowano krzywe zależności efektu działania od stężenia α -hederyny, uzyskiwane dla stosowanych linii komórek, za pomocą systemu RTCA i testu MTT. Przykład zależności efektu działania od stężenia α -hederyny na komórkach linii SKOV-3 przedstawia Ryc. 17.



Ryc. 17. Krzywe zależności efektu od stężenia uzyskane za pomocą systemu RTCA i testu MTT po traktowaniu komórek SKOV-3 roztworem α -HN stosowanym, odpowiednio, w stężeniach 1-70 i 0,5-50 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Wartości IC_{50} α -HN mierzono na podstawie krzywych zależności efektu od dawki za pomocą systemu Real-Time xCELLigence (A) i testu MTT (B). Odchylenia standardowe są reprezentowane przez słupki błędów.

Uzyskane za pomocą systemu RTCA i otrzymane w teście MTT wartości IC_{50} α -hederyny w stosunku do linii komórek SKOV-3, HeLa i HaCaT przedstawiono w Tabela 11.

Tabela 11. Wartości IC_{50} dla α -hederyny uzyskane za pomocą systemu RTCA oraz testu MTT dla linii SKOV-3, HeLa i HaCaT.

SKOV-3		HeLa		HaCaT	
RTCA	MTT	RTCA	MTT	RTCA	MTT
IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
$2,62 \pm 0,04$ $R^2 = 0,99$	$2,48 \pm 0,32$	$2,72 \pm 0,59$ $R^2 = 0,99$	$2,18 \pm 0,04$	$2,71 \pm 0,35$ $R^2 = 0,99$	$2,57 \pm 0,21$

R^2 -współczynnik determinacji

Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność cytotoksyczna α -HN w stosunku do badanych linii komórkowych jest wysoka, z porównywalną wartością IC_{50} . Przy wysokiej aktywności cytotoksycznej nie jest jednak aktywna selektywnie w stosunku do linii komórek nowotworowych.

4. Wyniki działania frakcji „N” na komórki SKOV-3

Analiza HPLC wybranych frakcji otrzymanych z ekstraktów nasion *Nigella sativa* dowiodły, że najwyższa zawartość α -hederyny znajduje się we frakcji N (rozdział 2.3 w części wynikowej). Badania aktywności cytotoksycznej wskazują, że jest to jedna z dwóch najsilniejszych frakcji spośród wszystkich 12-tu sporządzonych z ekstraktów nasion czarnuszki siewnej. Pozwala to potwierdzić przypuszczenie, że za wywarcie cytotoksycznego efektu w dużej mierze odpowiedzialna jest α -hederyna. Ponadto, niewiele jest danych w piśmiennictwie na temat mechanizmów działania cytotoksycznego frakcji pozyskanych z nasion *Nigella sativa*. Istnieją pojedyncze doniesienia mówiące o wpływie metanolowego ekstraktu z nasion czarnuszki siewnej na hodowlę raka piersi (MCF-7) i aktywacji kaskady kaspaz oraz białka p-53 (176). Dodatkowo, badano wpływ ekstraktów z nasion *Nigella sativa* na indukcję syntazy iNOS (177). Niedostępne są żadne dane na temat wpływu frakcji z *Nigella sativa* na komórki raka jajnika. Powyższe wyniki, jak i brak doniesień z piśmiennictwa skłoniły do przeanalizowania wpływu frakcji N na hodowlę komórkową SKOV-3 oraz ocenę pod względem wywarcia efektu apoptotycznego.

4.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych

W celu określenia populacji komórek apoptotycznych oraz populacji komórek nekrotycznych zastosowano test z aneksyną wiążącą fofatydyloserynę (PS) oraz markerem 7-AAD po inkubacji komórek z 30-320 $\mu\text{g/ml}$ roztworu frakcji N przez 24 godziny, a następnie zbadano analizatorem do cytometrii przepływowej Muse, zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.2.1. Testy wykorzystujące cytometrię przepływową pozwalają na przeprowadzenie ilościowej analizy populacji komórek z jednoczesną klasyfikacją ich na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe. Komórki martwe wykazują odmienne właściwości rozproszenia światła w porównaniu do populacji żywych komórek po zastosowaniu testu Muse Annexin V & Dead Cell Assay.

Komórki, które ulegają apoptozie, w początkowych stadiach znacząco się kurczą i tracą około 30% objętości w przeciągu kilku minut. Dochodzi wówczas do powstania zmian cytoszkieletowych, które powodują „wrzenie” błony cytoplazmatycznej, tzw.

zeiozę (178, 179). Podczas zejozy dochodzi do pęcherzykowania błony, powstają ciała apoptotyczne zawierające materiał jądrowy oraz organella komórkowe otoczone błoną cytoplazmatyczną w nienaruszonym stanie. Ciała te zostają pochłonięte przez sąsiadujące komórki, przeważnie makrofagi (180). Komórki fagocytyjące, za pomocą specyficznych receptorów, potrafią rozpoznać PS, która w początkowych stadiach apoptozy ulega redystrybucji z wewnętrznej warstwy błony lipidowej na zewnątrz. Dochodzi do związania oraz konsumpcji żywych jeszcze ciał apoptotycznych, co zapobiega lizie komórek apoptotycznych i uwolnieniu substancji o charakterze zapalnym. Apoptoza jest procesem fizjologicznym, zachodzącym „po cichu” w normalnych warunkach (181).

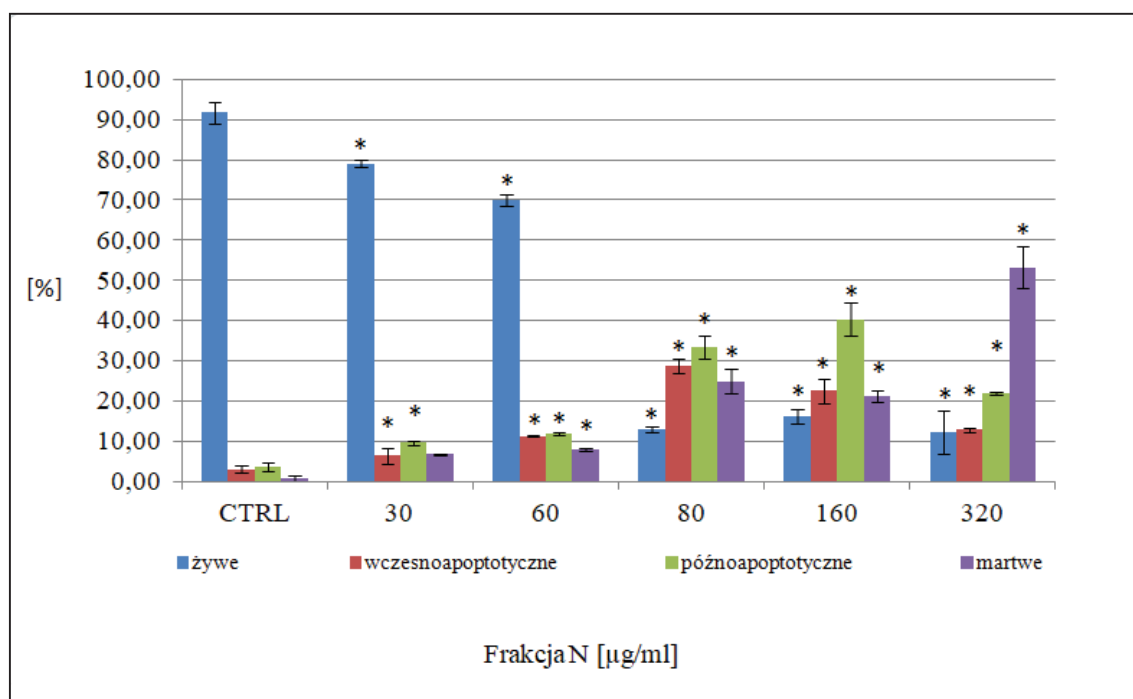
W wyniku przeprowadzonych doświadczeń z zastosowaniem metody barwienia aneksyną V / 7-AAD za pomocą cytometrii przepływowej zgromadzono ilościowe dane (“

Tabela 12, Ryc. 18) na temat czterech otrzymanych populacji komórek SKOV-3 uprzednio poddanych działaniu frakcji N w zakresie stężeń 30,0 – 320,0 µg/ml przez 24 godziny :

- komórki żywe, nieapoptotyczne: Aneksyna V (-) i 7-AAD (-); „Live”
- komórki wczesnoapoptotyczne: Aneksyna V (+) i 7-AAD (-); „Early apoptotic”
- komórki późnoapoptotyczne: Aneksyna V (+) i 7-AAD (+); „Late apoptotic”
- martwe komórki: Aneksyna V (-) i 7-AAD (+); „Dead”

Tabela 12. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi frakcji N w zakresie 30 - 320 µg/ml przez 24 godziny.

Komórki SKOV-3		Frakcja N [µg/ml]					
		CTRL	30	60	80	160	320
żywe	[%]	91,69	79,05	69,95	13,05	16,32	12,17
	± SD	2,56	0,88	1,30	0,73	1,77	5,40
wczesnoapoptotyczne	[%]	2,96	6,36	11,20	28,65	22,57	12,82
	± SD	0,86	1,90	0,23	1,80	3,01	0,57
późnoapoptotyczne	[%]	3,66	9,64	11,87	33,42	40,32	21,80
	± SD	1,06	0,48	0,49	2,83	4,18	0,30
martwe	[%]	0,72	6,68	7,93	24,88	21,04	53,22
	± SD	0,69	0,09	0,49	3,09	1,47	5,14

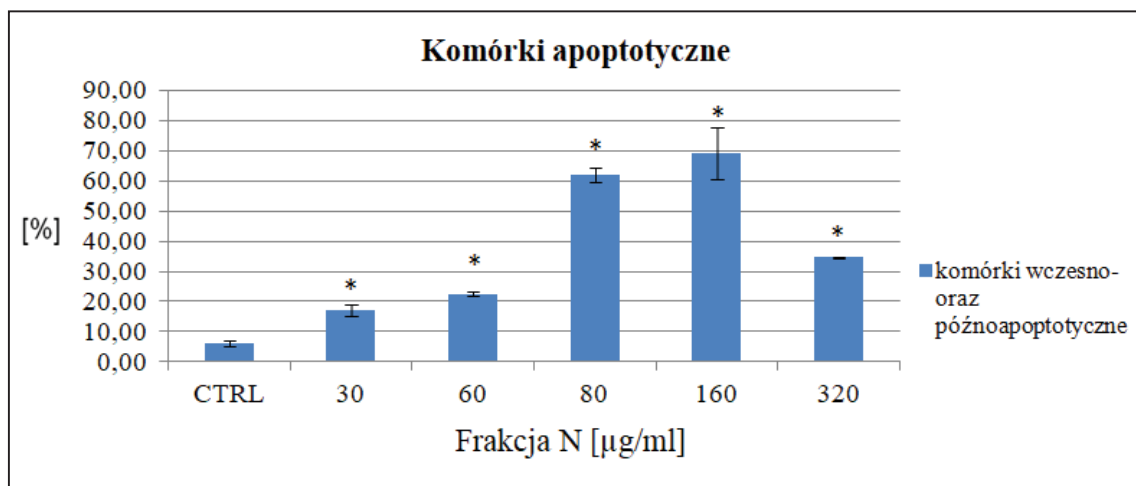


Ryc. 18. Zawartość [%] populacji komórek SKOV-3 żywych, wczesnoapoptotycznych, późnoapoptotycznych oraz martwych uzyskanych w wyniku działania roztworu frakcji N w zakresie stężeń 30 – 320 µg/ml przez 24 godziny, kontrola – komórki SKOV-3.

Wyniki zgromadzone w przeprowadzonych doświadczeniach świadczą o proapoptotycznych właściwościach frakcji N względem linii komórkowej SKOV-3. Procent komórek apoptotycznych oszacowano w próbce kontrolnej nietraktowanych komórek (CTRL) oraz z roztworem frakcji N w zakresie stężeń 30–320 µg/ml inkubowanych przez 24 godziny. Zaobserwowano, że procent populacji żywych komórek SKOV-3 maleje wraz ze wzrostem stężenia zastosowanej frakcji. Ponadto, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost zależnego od dawki odsetka komórek apoptotycznych już w stężeniu 30 µg/ml. Widoczny jest bardzo gwałtowny wzrost populacji wczesnoapoptotycznej począwszy od stężenia frakcji N 80 µg/ml względem komórek kontrolnych, a także bardzo zauważalny wzrost liczebności tej grupy komórek odnotowano dla stężenia frakcji N 160 µg/ml, zaś w przypadku stężenia 320 µg/ml przeważają już komórki martwe. W przypadku procentu komórek późnoapoptotycznych, zaobserwowano również statystycznie istotny wzrost tej populacji już przy stężeniu frakcji 30 µg/ml w stosunku do kontroli. Całkowity procent komórek apoptotycznych prezentuje Tabela 13 oraz Ryc. 19.

Tabela 13. Komórki SKOV-3 [%] wczesno- oraz późnoapoptotyczne uzyskane w wyniku działania roztworu frakcji N.

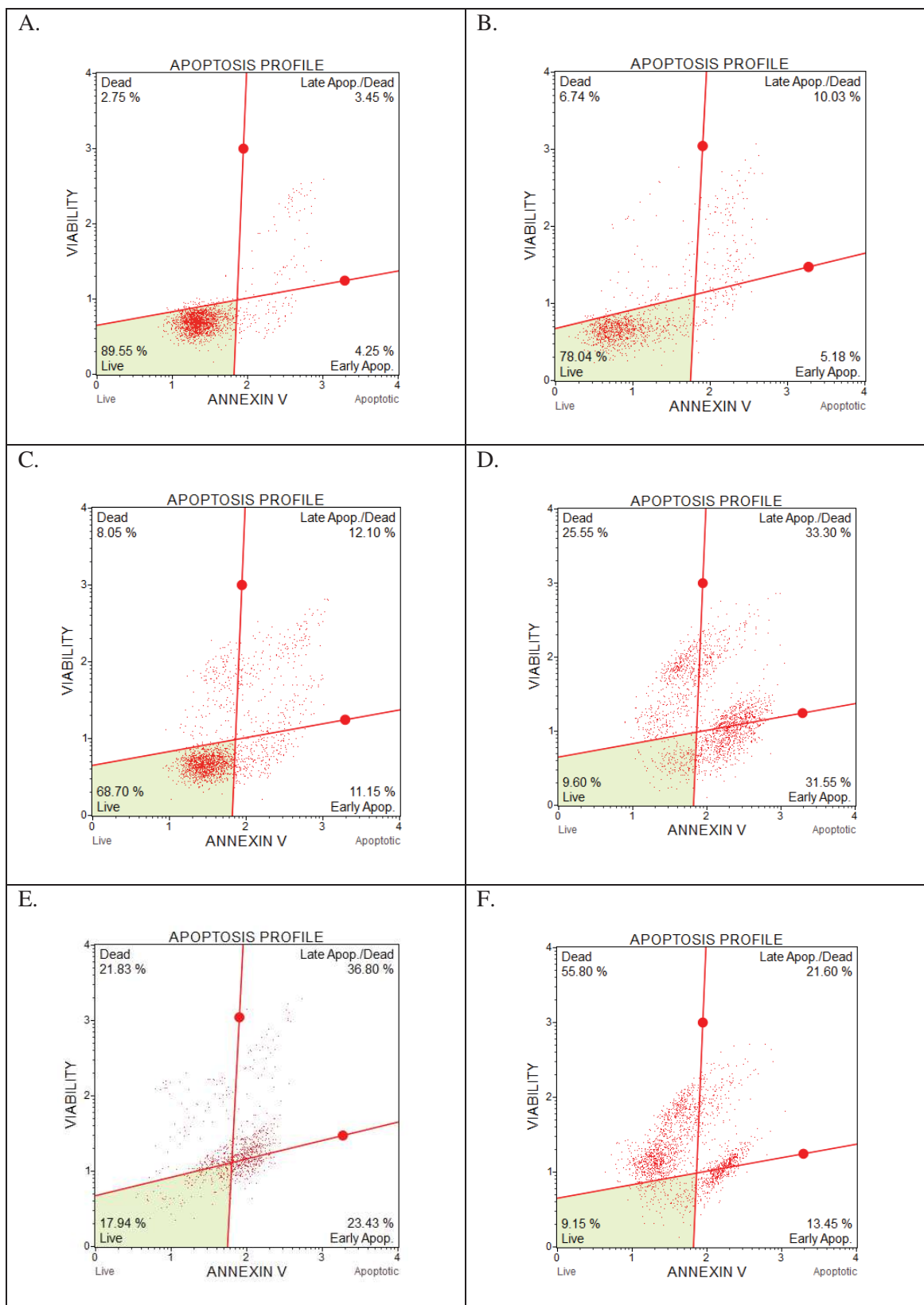
SKOV-3		CTRL	30	60	80	160	320
komórki wczesno- oraz późnoapoptotyczne	[%]	6,12	17,12	22,55	62,07	69,11	34,62
	± SD	0,95	2,05	0,82	2,50	8,71	0,39



Ryc. 19. Komórki SKOV-3 [%] wczesno- oraz późnoapoptotyczne uzyskane w wyniku działania roztworu frakcji N.

Widoczny jest wyraźny wzrost populacji komórek apoptotycznych, jakie otrzymano w wyniku działania wzrastających stężeń frakcji N na linii komórkowej SKOV-3 i jest on statystycznie istotny już od pierwszego zastosowanego stężenia frakcji N, czyli 30 µg/ml. Najwyższe zastosowane stężenie spowodowało martwicę badanych komórek.

Diagramy przedstawiające zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu frakcji N prezentuje Ryc. 20.



Ryc. 20. Diagramy przedstawiające zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu frakcji N; A - kontrola SKOV-3, B – frakcja N 30 $\mu\text{g/ml}$, C - frakcja N 60 $\mu\text{g/ml}$, D - frakcja N 80 $\mu\text{g/ml}$, E - frakcja N 160 $\mu\text{g/ml}$, F - 320 $\mu\text{g/ml}$.

4.2. Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach SKOV-3

Mitochondria stanowią ważne organella komórkowe, ponieważ utrzymują podstawowy bilans energii komórkowej. Utrata mitochondrialnego potencjału transbłonowego często wiązana jest z początkowymi stadiami apoptozy. Uważa się, że wraz ze spadkiem tego potencjału dochodzi do otwarcia porów w błonie mitochondrialnej i jej przepuszczalności, co skutkuje uwolnieniem cytochromu C do cytozolu, a następnie wyzwała następujące po sobie zdarzenia w kaskadzie apoptotycznej.

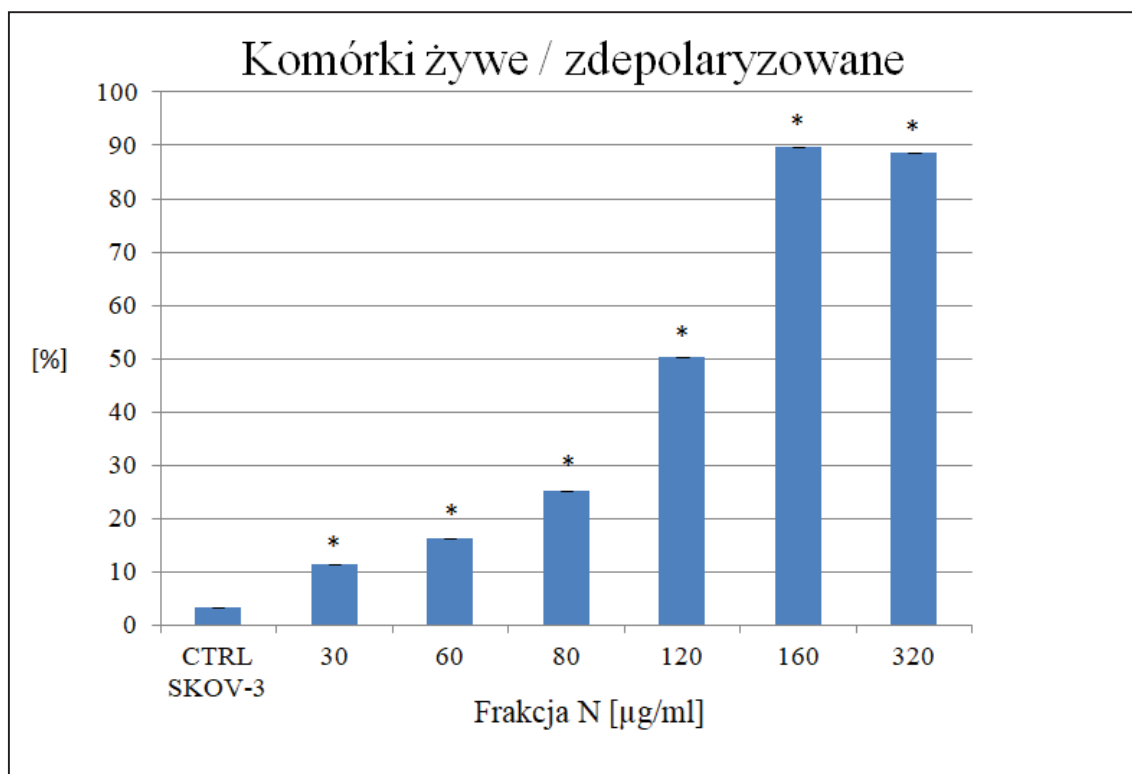
Stan błon mitochondrialnych komórek SKOV-3 po inkubacji z roztworem frakcji N oceniono za pomocą cytometrii przepływowej zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.2.2. W tym celu posłużono się odczynnikiem MitoPotential Dye będącym kationowym, lipofilowym barwnikiem do wykrywania zmian potencjału błony mitochondrialnej oraz zastosowano barwnik 7-AAD, który jest wskaźnikiem śmierci komórkowej. Na tej podstawie otrzymano 4 grupy populacji komórek:

- żywe komórki z nienaruszonym potencjałem mitochondrialnym:
MitoPotential (-) i 7-AAD (-); „Live”
- żywe komórki ze depolaryzowaną błoną mitochondrialną:
MitoPotential (+) i 7-AAD (-); „Depolarized/Live”
- martwe komórki ze depolaryzowaną błoną mitochondrialną:
MitoPotential (+) i 7-AAD (+); „Depolarized/Dead”
- martwe komórki z nienaruszonym potencjałem mitochondrialnym:
MitoPotential (-) i 7-AAD (+); „Dead”

Wewnętrzna błona nienaruszonych mitochondriów zgromadziła barwnik fluorescencyjny, który był widoczny w próbkach kontrolnych. Komórki inkubowane przez 3 godziny z roztworem frakcji N (30-320 µg/ml), u których doszło do depolaryzacji błony i spadku potencjału mitochondrialnego, przedstawiały zmniejszającą się fluorescencję, świadcząc o zachodzącym procesie apoptozy. Średnie wartości zdepolaryzowanych/żywych komórek po potraktowaniu roztworem frakcji N prezentuje Tabela 14 oraz Ryc. 21.

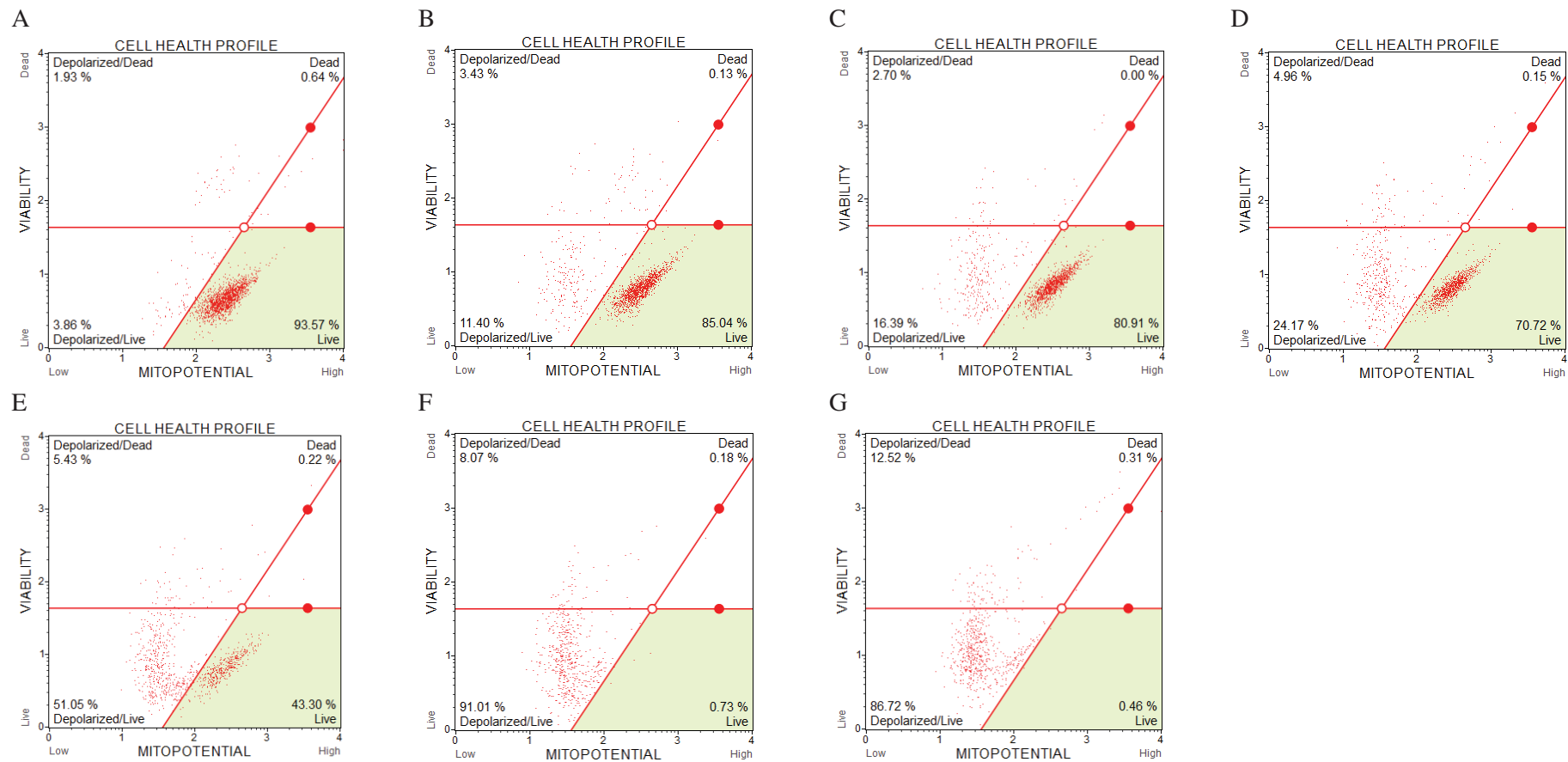
Tabela 14. Średnie wartości procentu komórek zdepolaryzowanych/żywych po inkubacji z roztworem frakcji N.

SKOV-3	CTRL	Frakcja N [$\mu\text{g/ml}$]					
		30	60	80	120	160	320
średnia [%]	3,40	11,42	16,42	25,22	50,24	89,65	88,66
$\pm\text{SD}$	0,87	0,15	1,37	2,40	2,55	2,58	1,68



Ryc. 21. Średnia zawartości [%] komórek depolaryzowanych/żywych w populacji komórek SKOV-3 po inkubacji z roztworem frakcji N.

Widoczny jest wyraźny, istotny statystycznie dla wszystkich zastosowanych dawek frakcji N wzrost komórek ze zdepolaryzowaną błoną mitochondrialną w stosunku do kontroli, u których – we wczesnych stadiach apoptozy – dochodzi do depolaryzacji tej błony oraz do utraty wewnętrznego potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi\text{m}$). Pogląd na wszystkie uzyskane populacje komórek SKOV-3 w wyniku działania roztworu frakcji N w zakresie stężeń 30-320 $\mu\text{g/ml}$ prezentuje Ryc. 22.



Ryc. 22. Diagramy przedstawiające zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu frakcji N; A - kontrola SKOV-3, B – frakcja N 30 µg/ml, C - frakcja N 60 µg/ml, D - frakcja N 80 µg/ml, E - frakcja N 120 µg/ml, F - frakcja N 160 µg/ml, G - frakcja N 320 µg/ml.

Uzyskane dane potwierdzają udział mitochondriów w indukcji apoptozy w wyniku działania wzrastających stężeń frakcji N na linii SKOV-3.

4.3. Określenie spadku aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2 w hodowli SKOV-3

Proces spadku potencjału mitochondrialnego jest ściśle powiązany z rolą białek z rodziny Bcl-2 zakotwiczonej w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i/lub w cytozolu. Białka te posiadają zdolność m.in. do hamowania procesu apoptozy. Przez zahamowanie ich aktywności dochodzi do powstania porów w błonie mitochondrialnej, spadku potencjału transbłonowego i uwolnienie cytochromu c do cytozolu, co w konsekwencji prowadzi do uruchomienia kaskady kaspaz.

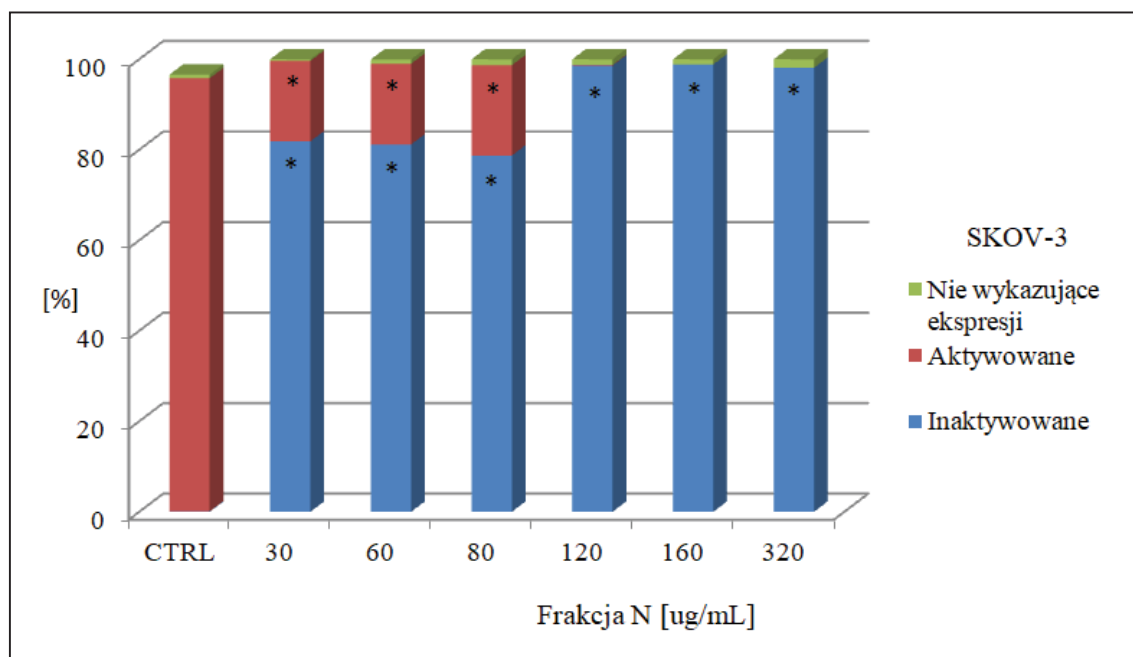
W przeprowadzonym badaniu oceniającym spadek aktywacji białka Bcl-2 zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.2.3 wykorzystywana jest para przeciwciał: jedno przeciwciało umożliwia wykrycie całkowitej ekspresji białka, a drugie umożliwia wykrycie ufosforylowanej (zaktywowanej) jego postaci. Zastosowanie obu skoniugowanych przeciwciał daje pogląd na całą ścieżkę aktywacji Bcl-2 mierzonej jednocześnie w jednej komórce. Dane uzyskane z cytometrii przepływowej przedstawiają wartości względne (w procentach) dla każdej populacji komórek zawierających Bcl-2: inaktywowane, aktywowane i niewykazujące ekspresji, uzyskane z trzech niezależnych powtórzeń. Obserwowany jest istotny oraz zależny od dawki efekt zahamowania aktywności tego białka (

Tabela 15, Ryc. 23).

Tabela 15. Całkowity poziom aktywacji białka Bcl-2 [%] w hodowli komórkowej SKOV-3.

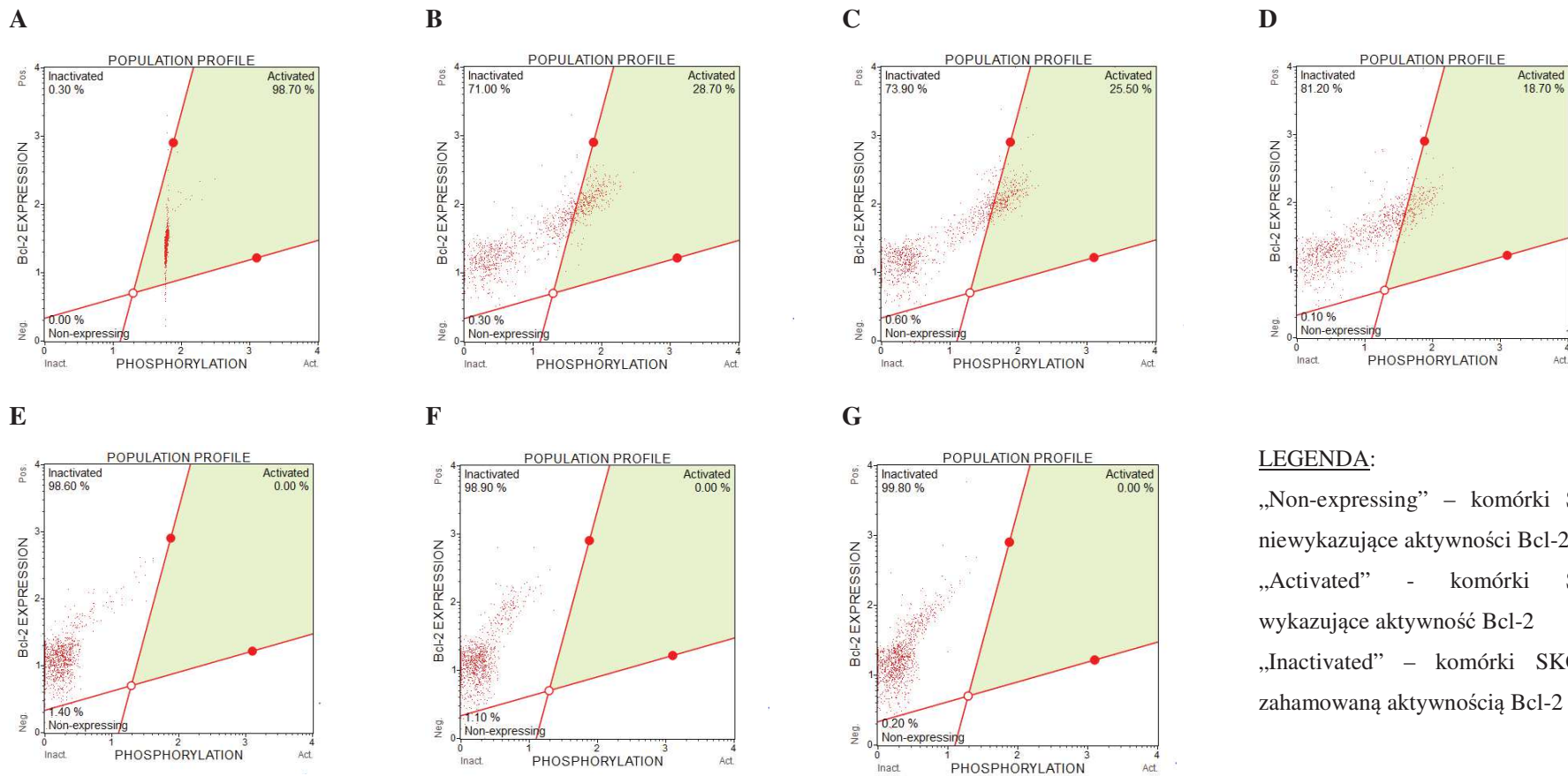
Komórki SKOV-3 zawierające Bcl-2		CTRL	Frakcja N [$\mu\text{g/ml}$]					
			30	60	80	120	160	320
Inaktywowane	%	0,10	81,87	81,17	78,73	98,60	98,87	98,10
	$\pm\text{SD}$	0,14	1,51	14,53	16,06	0,10	0,95	1,47
Aktywowane	%	95,70	17,77	17,83	19,93	0,13	0,00	0,00
	$\pm\text{SD}$	3,82	1,62	15,49	17,30	0,23	0,00	0,00
Nie	%	0,80	0,37	0,97	1,33	1,27	1,13	1,90

wykazujące ekspresji	±SD	1,13	0,23	1,00	1,31	0,95	0,95	1,47
----------------------	-----	------	------	------	------	------	------	------



Ryc. 23. Całkowity poziom aktywacji białka Bcl-2 [%] w hodowli komórkowej SKOV-3 pod wpływem działania roztworu frakcji N.

Do inaktywacji białka z rodziny Bcl-2 dochodzi już w przypadku pierwszych zastosowanych stężeń frakcji N, tj. 30 $\mu\text{g/ml}$. Widoczny jest blisko 80%-wy poziom zahamowania aktywności antyapoptotycznego białka w stosunku do użytej kontroli. Następnie poziom ten rośnie, osiągając niemalże 100%. Powyższe wyniki świadczą o zachodzącym procesie apoptozy w badanej populacji komórek SKOV-3 pod wpływem inkubacji z roztworem frakcji N. Pogląd na wszystkie uzyskane populacje komórek SKOV-3 w wyniku działania roztworu frakcji N w zakresie stężeń 30-320 $\mu\text{g/ml}$ prezentuje Ryc. 24.



LEGENDA:

- „Non-expressing” – komórki SKOV-3 niewykazujące aktywności Bcl-2
- „Activated” - komórki SKOV-3 wykazujące aktywność Bcl-2
- „Inactivated” – komórki SKOV-3 z zahamowaną aktywnością Bcl-2

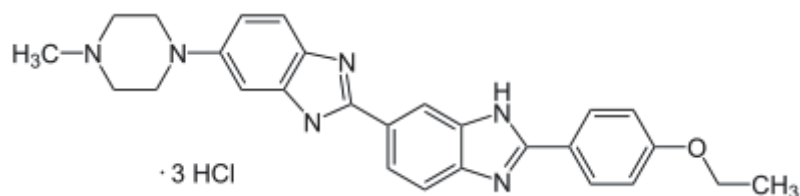
Ryc. 24. Diagramy przedstawiające zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu frakcji N; A - kontrola SKOV-3, B – frakcja N 30 µg/ml, C - frakcja N 60 µg/ml, D - frakcja N 80 µg/ml, E - frakcja N 120 µg/ml, F - frakcja N 160 µg/ml, G - frakcja N 320 µg/ml.

5. Wyniki badań mechanizmu działania α -hederyny w hodowli komórkowej raka jajnika, SKOV-3

Badania mechanizmu działania α -hederyny skupiono na linii SKOV-3, ponieważ brak jest jakichkolwiek doniesień literaturowych na ten temat. Ponadto, ważność problemów związanych z rakiem jajnika i jednocześnie wysoka, zbadana *in vitro* aktywność cytotoksyczna α -hederyny na komórkach raka jajnika w rozdziale 3 części wynikowej również stanowiły istotny czynnik w wyborze dalszych badań niniejszej pracy.

5.1. Określenie zmian w jądrze komórkowym badanych komórek (barwienie Hoechsta) pod wpływem działania α -hederyny

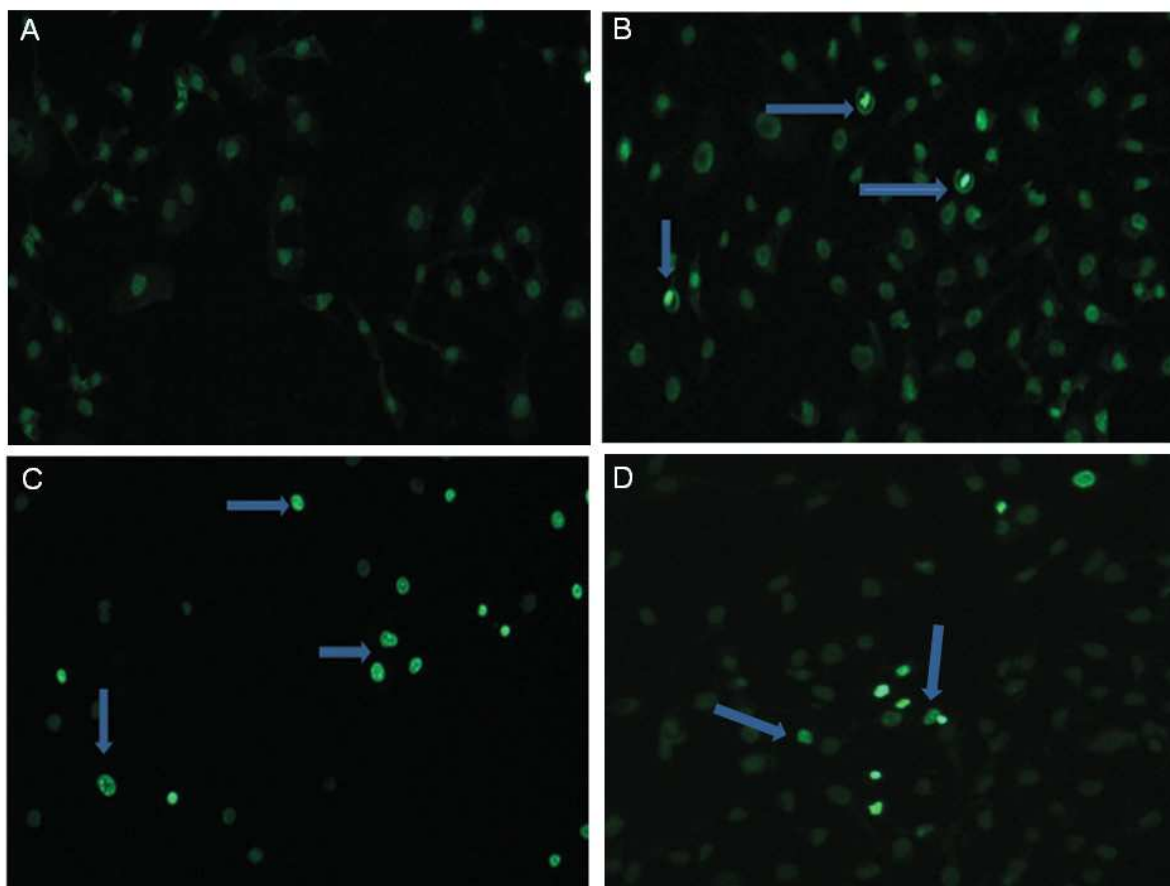
Barwnik Hoechst 33342 należy do grupy barwników fluorescencyjnych, które zawierają układ bis-benzimidazolowy (wzór chemiczny barwnika Hoechsta 33342 obrazuje (Ryc. 25).



Ryc. 25. Struktura barwnika Hoechsta 33342

Jego działanie oparte jest na zasadzie interkalacji do małego rowka helisy DNA po wzbudzeniu światłem ultrafioletowym (długość fali świetlnej ok 485 nm, barwa niebiesko-fioletowa), co umożliwia wizualizację materiału DNA w komórkach, również po zainicjowanym procesie apoptozy. Barwnik ten ma charakter lipofilowy, stąd posiada zdolność do przenikania przez błony biologiczne, również te o nienaruszonej strukturze, a zatem służy do wybarwienia komórek żywych, a także utrwalonych. Jest to substancja, która, poprzez swoją zdolność interkalacji, potrafi zaburzyć replikację DNA, stąd cechuje się mutagennością oraz toksycznością oraz wymaga szczególnej ostrożności podczas pracy (182).

Zmiany w dystrybucji chromatyny w komórkach SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu α -hederyny oceniano przez barwienie jąder komórkowych barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342, zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.1. Fragmentacja jądrowa i kondensacja chromatyny, jako zmiany charakterystyczne dla obrazu zachodzącej apoptozy, były widoczne w komórkach SKOV-3 po barwieniu (zdjęcie B-D), w przeciwieństwie do próbki kontrolnej z DMSO (zdjęcie A) (Ryc. 26).



Ryc. 26. Zmiany apoptotyczne indukowane w komórkach SKOV-3 przez α -hederynę. Strzałki wskazują komórki apoptotyczne.

Stan chromatyny jądrowej SKOV-3 po potraktowaniu 0,1% DMSO (A) lub α -hederyną w stężeniu 0,5, 2 i 10 $\mu\text{g/ml}$ (B-D) oceniony za pomocą barwienia Hoechst 33342 dowodzi obecności komórek apoptotycznych powstałych po inkubacji z badaną saponiną. Komórki pod wpływem działania α -hederyny przedstawiają skondensowaną chromatynę (w przeciwieństwie do komórek kontrolnych DMSO). Strzałki wskazują komórki apoptotyczne.

5.2. Wyniki badań *in vitro* mechanizmu działania cytotoksycznego α -hederyny w komórkach raka jajnika SKOV-3

5.2.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych

W celu oceny indukcji procesu apoptozy oraz populacji komórek nekrotycznych zastosowano test z aneksyną oraz markerem 7-AAD po inkubacji komórek z 0,5-30,0 $\mu\text{g/ml}$ roztworu α -hederyny przez 24 godziny, a następnie zbadano analizatorem do cytometrii przepływowej Muse, zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.2.1. Testy wykorzystujące cytometrię przepływową pozwalają na przeprowadzenie ilościowej analizy populacji komórek, klasyfikując je na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe. Komórki martwe wykazują odmienne właściwości rozproszenia światła w porównaniu do żywych po zastosowaniu testu Muse Annexin V & Dead Cell Assay.

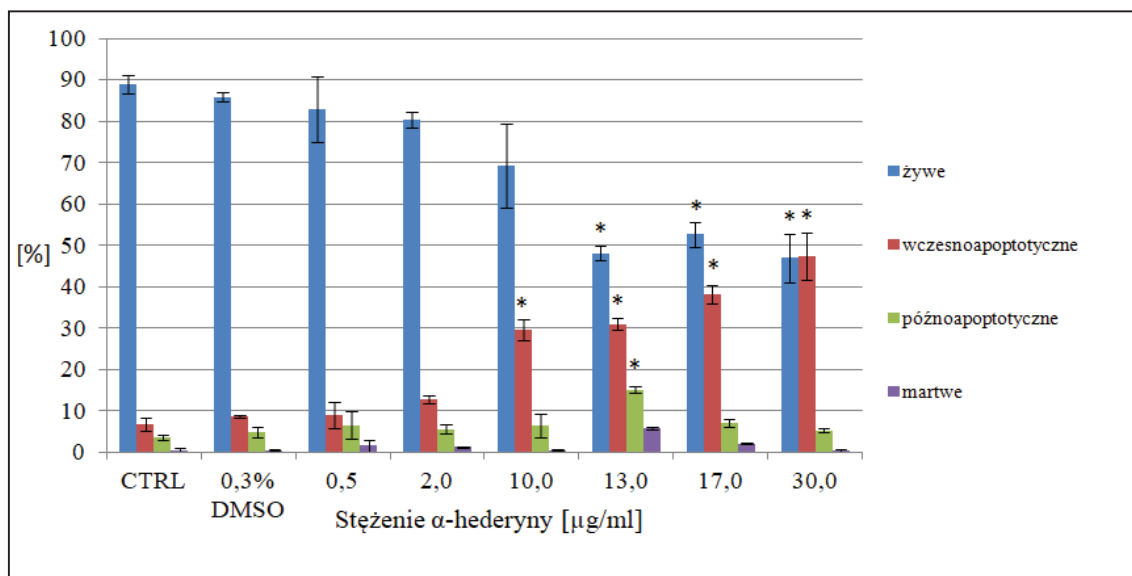
Błona komórkowa, plazmolemma, zbudowana jest z podwójnej warstwy fosfolipidów oraz białek. W warunkach fizjologicznych ujemnie naładowane cząsteczki fosfatydyloseryny (PS) znajdują się w wewnętrznej warstwie błony plazmatycznej, podczas gdy sfingomielina oraz fosfatydylocholina ułożone są w warstwie zewnętrznej. PS podczas procesu apoptozy zostaje redystrybuowana z wewnętrznej dwuwarstwy lipidowej na zewnątrz. Aneksyna, jako wysoce specyficzna wobec PS, wiąże się z jej cząsteczkami o ujemnym ładunku w sposób zależny od dodatnio naładowanych jonów wapnia Ca^{2+} . Natomiast marker 7-AAD (7-aminoaktynomycyna) służy do wykrywania martwych już komórek, ponieważ przenika wyłącznie przez uszkodzoną błonę komórkową, a także posiada wysoką zdolność wiązania DNA, tworząc z nim stabilne kompleksy (183, 184). 7-AAD jest specyficznym dla cytozyny i guaniny interkalatorem cząsteczek DNA (185) oraz umożliwia rozróżnienie populacji komórek martwych od żywych, bądź wczesnoapoptotycznych.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń z zastosowaniem metody barwienia aneksyną V / 7-AAD za pomocą cytometrii przepływowej zgromadzono ilościowe dane (Tabela 16, Ryc. 27) na temat czterech otrzymanych populacji komórek SKOV-3 uprzednio poddanych działaniu α -hederyny w zakresie stężeń 0,5 – 30 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny :

- komórki żywe, nieapoptotyczne: Aneksyna V (-) i 7-AAD (-); „Live”
- komórki wczesnoapoptotyczne: Aneksyna V (+) i 7-AAD (-); „Early apoptotic”
- komórki późnoapoptotyczne: Aneksyna V (+) i 7-AAD (+); „Late apoptotic”
- martwe komórki: Aneksyna V (-) i 7-AAD (+); „Dead”

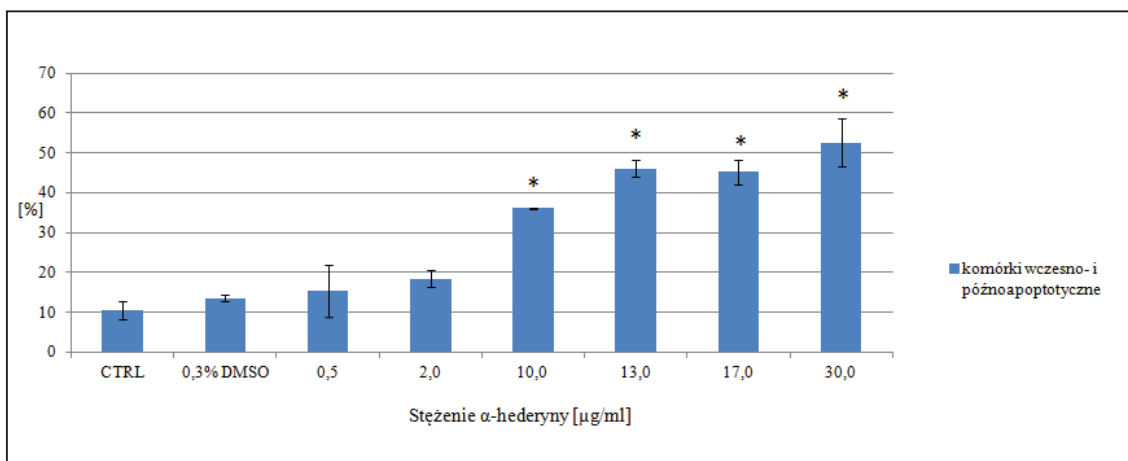
Tabela 16. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi α -HN w zakresie 0,5 - 30,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.

Komórki SKOV-3		CTRL		α -HN [$\mu\text{g/ml}$]					
		SKOV-3	0,3% DMSO	0,5	2	10	13	17	30
żywe	[%]	88,98	85,90	82,83	80,25	69,23	48,13	52,65	46,98
	\pm SD	2,25	1,06	7,95	1,92	10,15	1,80	3,04	5,90
wczesno-apoptotyczne	[%]	6,83	8,70	9,03	12,85	29,55	30,95	38,25	47,38
	\pm SD	1,69	0,42	3,15	0,91	2,62	1,41	2,19	5,62
późno-apoptotyczne	[%]	3,59	4,90	6,52	5,65	6,55	15,18	6,98	5,25
	\pm SD	0,71	1,34	3,35	1,13	2,83	0,67	0,95	0,49
martwe	[%]	0,60	0,50	1,62	1,26	0,53	5,75	2,13	0,40
	\pm SD	0,34	0,14	1,44	0,13	0,18	0,28	0,11	0,21



Ryc. 27. Zawartość [%] populacji komórek SKOV-3 żywych, wczesnoapoptotycznych, późnoapoptotycznych oraz martwych uzyskanych w wyniku działania roztworu α -hederyny w zakresie stężeń 0,5 – 30 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.

Wyniki zgromadzone w przeprowadzonych doświadczeniach świadczą o cytotoksycznych właściwościach α -hederyny względem linii komórkowej SKOV-3. Procent komórek apoptotycznych oszacowano w próbce kontrolnej nietraktowanych komórek (CTRL), po inkubacji komórek z DMSO (ctrl z DMSO) w stężeniu 0,3% oraz z roztworem α -hederyny w zakresie stężeń 0,5–30 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny. Zaobserwowano, że procent żywych komórek SKOV-3 maleje wraz ze wzrostem stężenie zastosowanej saponiny. Ponadto, zaobserwowano wzrost zależnego od dawki odsetka komórek apoptotycznych. Zauważalny jest gwałtowny wzrost populacji wczesnoapoptotycznej począwszy od stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$ względem komórek kontrolnych. W przypadku procentu komórek późnoapoptotycznych, nie zaobserwowano, aby wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia α -hederyny znacząco rosła także procentowa zawartość tej populacji komórek. Jedynie w stężeniu 13 $\mu\text{g/ml}$ zanotowano istotnie większą populację komórek późnoapoptotycznych względem kontroli.

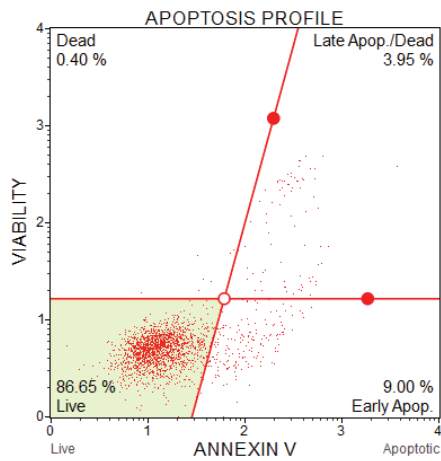


Ryc. 28. Zawartość [%] populacji komórek wczesno- i późnoapoptotycznych obliczona w porównaniu z grupą komórek kontrolnych 0.3% DMSO

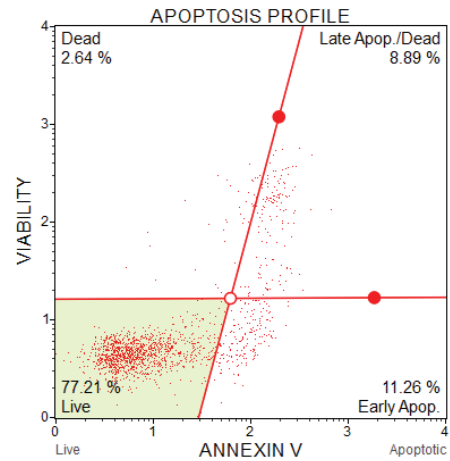
Całkowity procent komórek apoptotycznych (wczesno- i późnoapoptotycznych), jako średnia z trzech niezależnych doświadczeń, wynosił: $15,55 \pm 6,51\%$, $18,50 \pm 2,04\%$, $36,1 \pm 0,21\%$, $46,13 \pm 2,09\%$, $45,23 \pm 3,15\%$, $52,63 \pm 6,12\%$ dla stężeń roztworu α -hederyny: odpowiednio 0,5, 2, 10, 13, 17 oraz 30 $\mu\text{g/ml}$ w porównaniu z nietraktowanymi, kontrolnymi komórkami SKOV-3 i komórkami kontrolnymi traktowanymi 0,3% DMSO odpowiednio: $10,42 \pm 2,26\%$ i $13,6 \pm 0,92\%$ (Ryc. 28). Analizę każdej próbki powtórzono trzy razy. Odchylenie standardowe jest reprezentowane przez słupki błędów. Na podstawie zgromadzonych danych w wyniku zastosowania wzrastających stężeń roztworu α -hederyny inkubowanych z komórkami SKOV-3 można zauważyć, że zawartość populacji komórek apoptotycznych (wczesna i późna apoptoza) znacząco rośnie wraz ze wzrostem stężenia zastosowanej saponiny, a różnice te są istotne statystycznie począwszy od stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$.

Procentową zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 uzyskanych w wyniku działania roztworu α -hederyny w zakresie stężeń 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ prezentuje Ryc. 29.

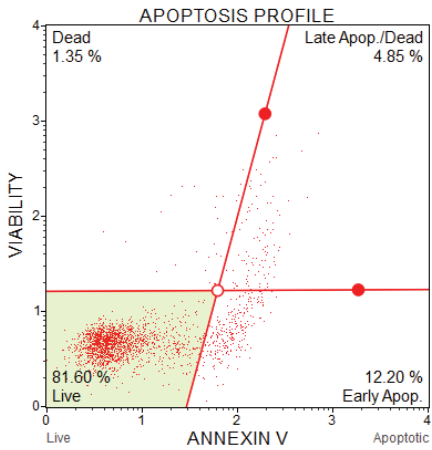
A.



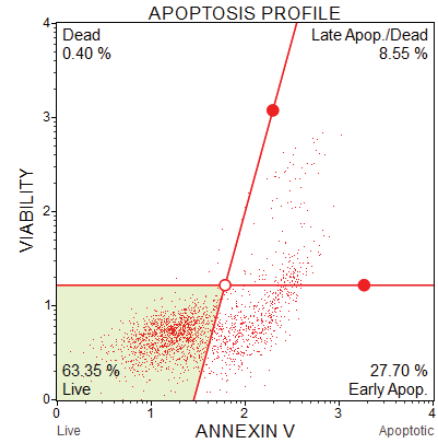
B.



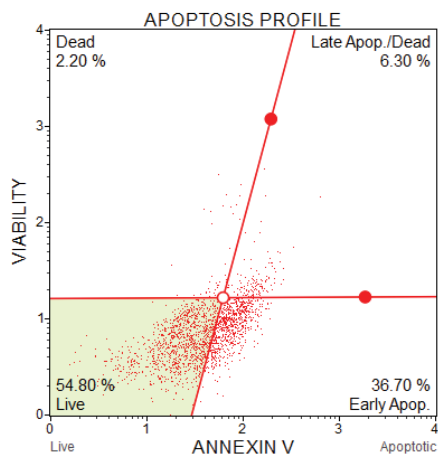
C.



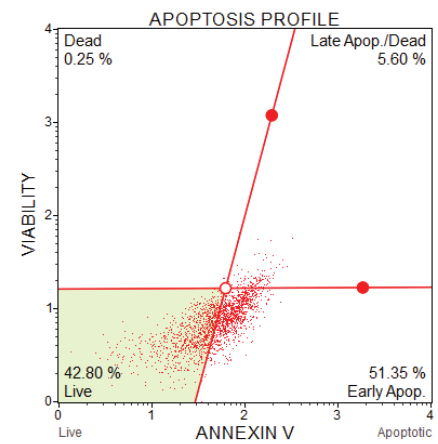
D.



E.



F.



Ryc. 29. Diagramy przedstawiające procentową zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu α -hederyny; A - kontrola 0,3% DMSO, B - 0,5, C - 2, D - 10, E - 17, F - 30 μ g / ml

5.2.2. Oszacowanie zmian potencjału mitochondrialnego w komórkach SKOV-3

Mitochondria, o czym mowa była już w rozdz. 4.2 części wynikowej, to ważne organella komórkowe, które utrzymują podstawowy bilans energii komórkowej, ponadto stanowią główne miejsce wytwarzania wolnych rodników, a także zawierają podstawowe regulatory procesów prowadzących do śmierci komórki, np. apoptozy. Zmiany zachodzące w obrębie mitochondriów są więc bardzo czułymi wskaźnikami zdrowia komórek oraz stresu. Energia komórkowa, która jest wytwarzana w trakcie oddychania mitochondrialnego, zostaje zmagazynowana jako gradient elektrochemiczny przez błonę mitochondrialną, zaś ta kumulacja energii w zdrowo funkcjonujących komórkach tworzy transbłonowy potencjał mitochondrialny ($\Delta\Psi_m$), dzięki któremu komórka kieruje syntezą ATP. Utrata wewnętrznego potencjału mitochondrialnego transbłonowego często wiązana jest z początkowymi stadiami apoptozy. Uważa się, że spadek tego potencjału jest zbieżny z otwarciem porów w błonie mitochondrialnej i z jej przepuszczalnością, co skutkuje uwolnieniem cytochromu C do cytozolu, co następnie wyzwała następujące po sobie zdarzenia w kaskadzie apoptotycznej. Depolaryzacja transbłonowego potencjału mitochondrialnego jest zatem wiarygodnym wskaźnikiem dysfunkcji mitochondriów i zdrowia komórkowego, będąc istotnym elementem badań dotyczących apoptozy, toksyczności leków oraz wielu chorób (186-191).

Stan błon mitochondrialnych komórek SKOV-3 po traktowaniu roztworem α -hederyny oceniono za pomocą cytometrii przepływowej zgodnie z opisem metody w punkcie 4.4.2.2. W tym celu posłużono się odczynnikami MitoPotential Dye, który jest kationowym, lipofilowym barwnikiem do wykrywania zmian potencjału błony mitochondrialnej oraz posłużono się barwnikiem 7-AAD, który jest wskaźnikiem śmierci komórkowej. Na tej podstawie otrzymano 4 grupy populacji komórek:

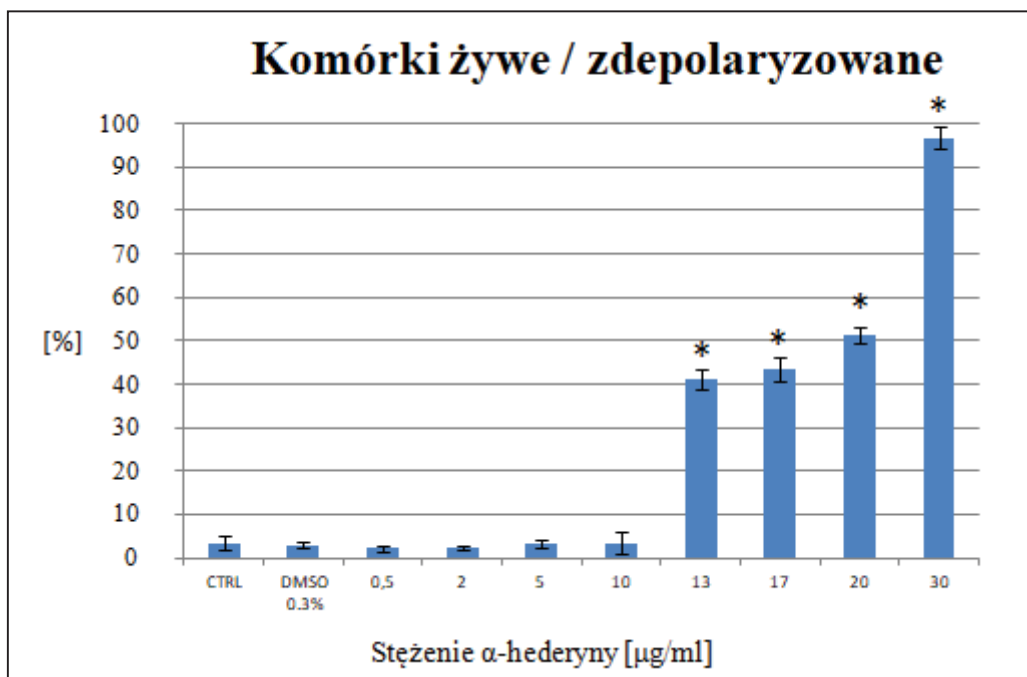
- żywe komórki z nienaruszonym potencjałem mitochondrialnym:
MitoPotential (-) i 7-AAD (-); „Live”
- żywe komórki ze depolaryzowaną błoną mitochondrialną:
MitoPotential (+) i 7-AAD (-); „Depolarized/Live”
- martwe komórki ze depolaryzowaną błoną mitochondrialną:
MitoPotential (+) i 7-AAD (+); „Depolarized/Dead”

- martwe komórki z nienaruszonym potencjałem mitochondrialnym:
MitoPotential (-) i 7-AAD (+); „Dead”

Wewnętrzna błona nienaruszonych mitochondriów zgromadziła barwnik fluorescencyjny, który był widoczny w próbkach kontrolnych. Komórki inkubowane przez 3 godziny ze wzrastającymi stężeniami roztworu α – hederyny przedstawiały zmniejszającą się fluorescencję. Średnie wartości zdepolaryzowanych/żywych komórek po potraktowaniu roztworem α -hederyny prezentuje Tabela 17 oraz Ryc. 30. Natomiast procentowa zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 uzyskanych w wyniku działania roztworu α -hederyny w zakresie stężeń 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ prezentuje Ryc. 31.

Tabela 17. Zawartość populacji komórek zdepolaryzowanych/żywych po inkubacji z roztworem α -hederyny.

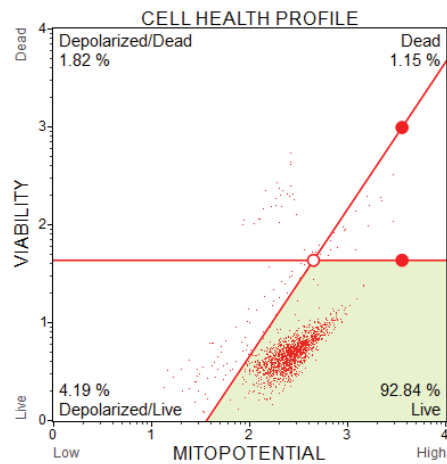
Komórki SKOV-3	CTRL		α -HN [$\mu\text{g/ml}$]							
	SKOV-3	DMSO 0.3%	0,5	2,0	5,0	10,0	13,0	17,0	20,0	30, 0
średnia [%]	3,40	2,85	2,24	2,35	3,11	3,37	41,15	43,51	51,25	96,79
\pm SD	0,87	1,54	0,73	0,74	0,40	0,93	2,57	2,25	2,84	1,83



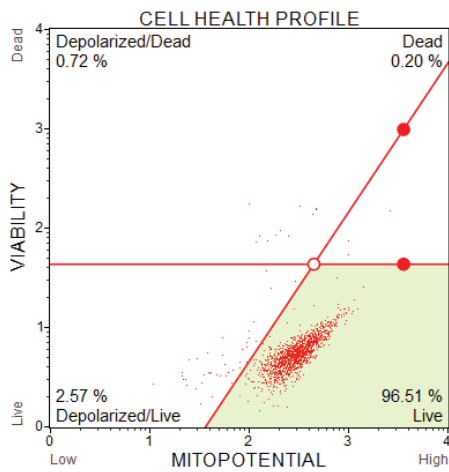
Ryc. 30. Zawartość populacji komórek zdepolaryzowanych/żywych po inkubacji z roztworem α -hederyny.

Uzyskane dane potwierdzają udział mitochondriów w indukcji apoptozy w komórkach SKOV-3 po potraktowaniu roztworem α -hederyny. Widoczny jest gwałtowny wzrost populacji komórek zdepolaryzowanych/żywych począwszy od użytego stężenia $13\mu\text{g/ml}$ α – hederyny i efekt ten rośnie wraz ze wzrostem stężenia α -hederyny. Pomiar depolaryzacji mitochondrialnej SKOV-3 oceniano w odniesieniu do kontroli 0,3% DMSO. Eksperyment prowadzono trzy razy, niezależnie. Odchylenie standardowe jest reprezentowane przez słupki błędów.

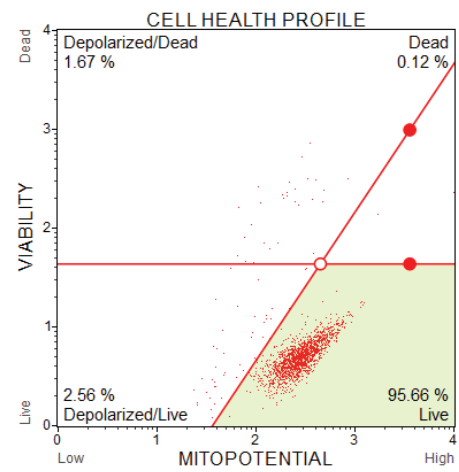
A.



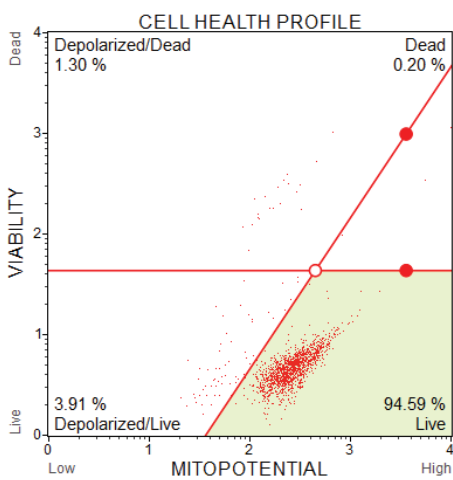
B.



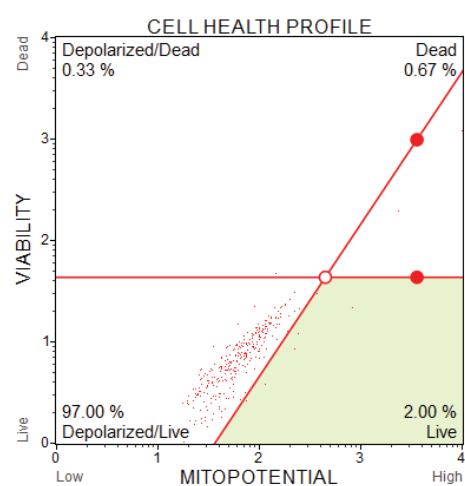
C.



D.



E.



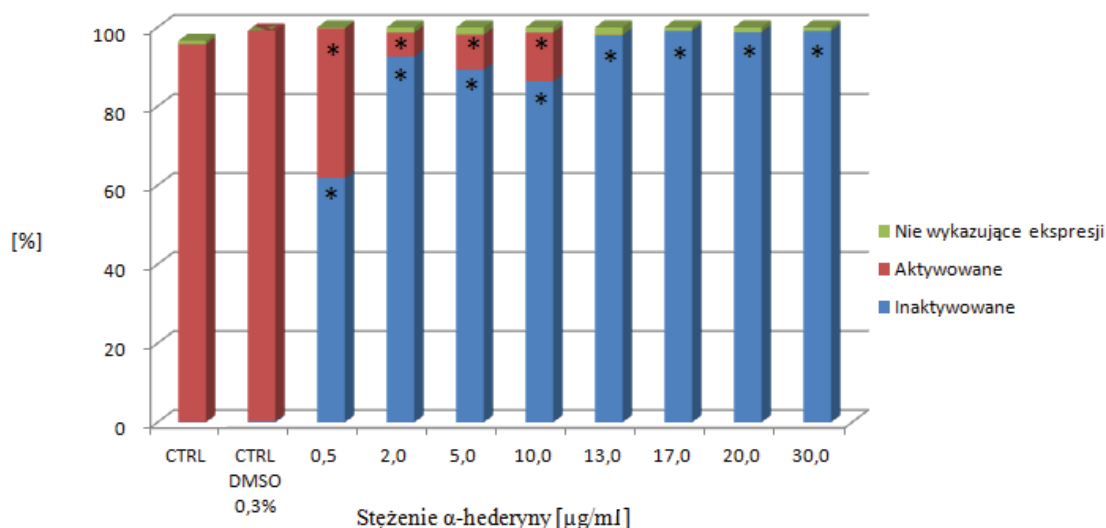
Ryc. 31. Diagramy przedstawiające procentową zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu α -hederyny; A - kontrola 0,3% DMSO, B - 0,5 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, C - 2 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, D - 10 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, E - 30 $\mu\text{g/ml}$ α -HN.

5.2.3. Określenie aktywacji białka antyapoptotycznego Bcl-2 w hodowli SKOV-3

Całkowity poziom ekspresji białka Bcl-2, z rodziny białek antyapoptotycznych, mierzono, stosując zestaw Muse Activation Dual Detection, zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.2.3 oraz w rozdziale 4.3 części wynikowej. Komórki SKOV-3 eksponowano na wzrastające stężenia roztworu α -hederyny (0,5-30 μ g/ml) przez 24 godziny, aby wywołać śmierć komórki i zahamować odpowiedź kaskady sygnałowej Bcl-2. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń uzyskano trzy rodzaje populacji komórek zawierających białko Bcl-2: inaktywowane, aktywowane i niewykazujące ekspresji, uzyskane z trzech niezależnych powtórzeń. W niniejszym badaniu zaobserwowano znaczącą, zależną od dawki inaktywację białka przeciwapoptotycznego, w przeciwieństwie do próbek kontrolnych z prawie 100% poziomem aktywacji Bcl-2. Procent inaktywacji białka Bcl-2 w komórkach SKOV-3 prezentuje Tabela 18 oraz Ryc. 32.

Tabela 18. Całkowity poziom [%] aktywacji białka Bcl-2 w hodowli komórkowej SKOV-3 pod wpływem działania roztworu α -hederyny.

Komórki SKOV-3 zawierające Bcl-2		CTRL		α -HN [μ g/ml]						
		SKOV-3	DMSO 0.3%	0,5	2,0	5,0	10,0	13,0	17,0	20,0
Inaktywowane	[%]	0,10	0,30	61,87	92,65	89,30	86,37	98,03	99,07	98,80
	\pm SD	0,14	0,30	3,35	8,56	11,88	10,26	0,70	0,51	0,84
Aktywowane	[%]	95,70	98,87	37,90	6,05	8,90	12,37	0,03	0,03	0,05
	\pm SD	3,82	0,47	3,56	8,56	12,59	10,79	0,06	0,06	0,06
Nie wykazujące ekspresji	[%]	0,80	0,00	0,23	1,30	1,80	1,27	1,93	0,90	1,15
	\pm SD	1,13	0,00	0,21	0,00	0,71	0,55	0,75	0,53	0,86

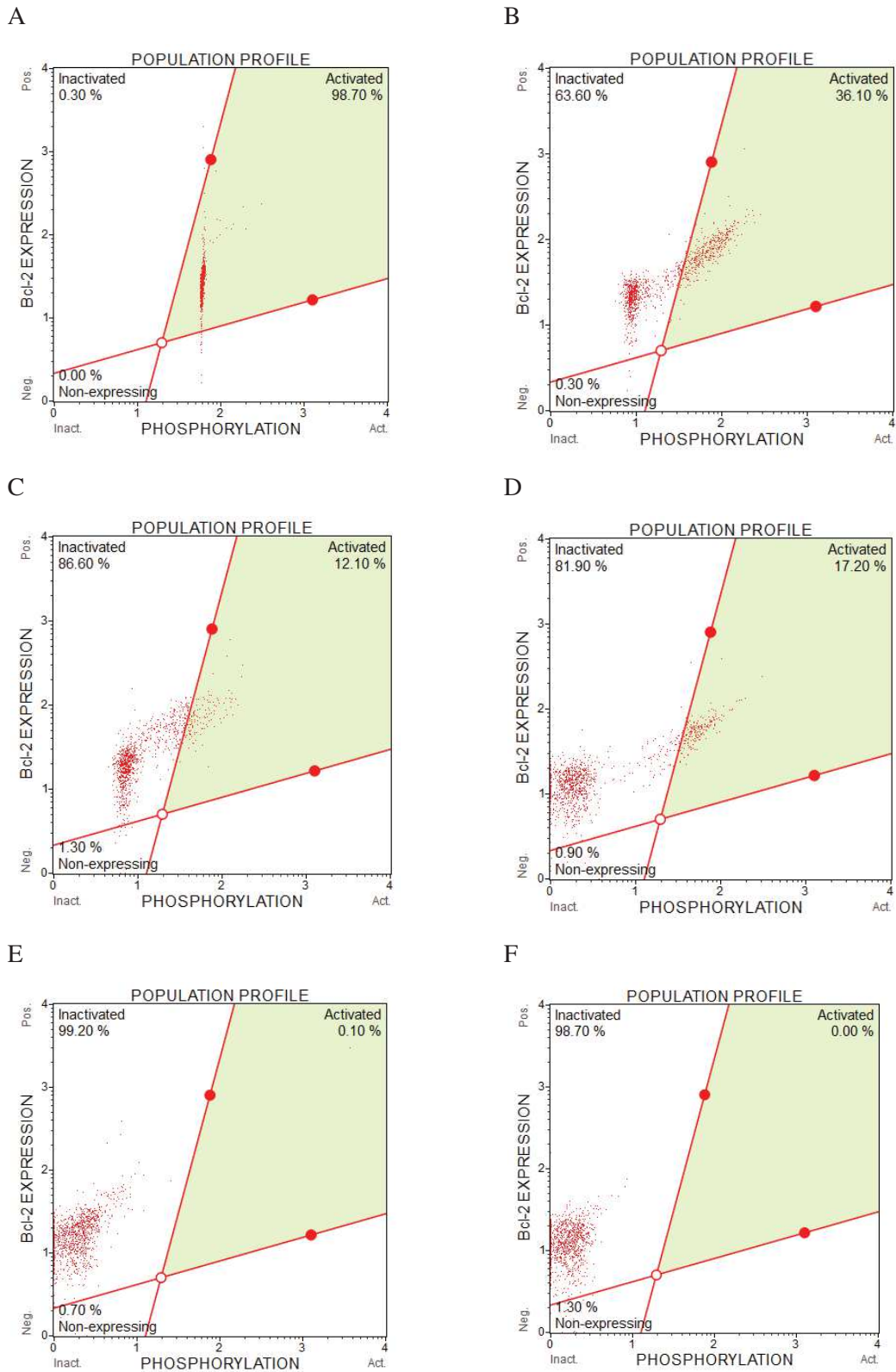


Ryc. 32. Całkowity poziom [%] aktywacji białka Bcl-2 w hodowli komórkowej SKOV-3 pod wpływem działania roztworu α -hederyny.

Widoczny jest gwałtowny wzrost populacji komórek SKOV-3, u których doszło do inaktywacji białka z rodziny Bcl-2 już w zastosowanym stężeniu α -hederyny 2 $\mu\text{g/ml}$ w stosunku do komórek kontrolnych. Procent komórek SKOV-3 z aktywną postacią tego antyapoptotycznego białka drastycznie spadł i jest wykrywalny jedynie w stężeniach α -hederyny 0,5; 2,0; 5,0 oraz 10 $\mu\text{g/ml}$.

Wyniki powyższych badań potwierdzają indukcję apoptozy w hodowli komórkowej SKOV-3 pod wpływem roztworu α -hederyny i dowodzą, że jednym z czynników biorących udział w przeprowadzeniu procesu apoptozy jest inaktywacja białka z rodziny Bcl-2 o charakterze antyapoptotycznym.

Procentową zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 uzyskanych w wyniku działania roztworu α -hederyny w zakresie stężeń 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ prezentuje Ryc. 33.



Ryc. 33. Diagramy przedstawiające poziom aktywacji białka Bcl-2 w hodowli komórek SKOV-3 pod wpływem działania roztworu α -hederyny przez 24 godziny wyrażony procentowo; A – kontrola 0,3% DMSO, B – 0,5 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-HN}$, C – 2,0 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-HN}$, D – 10,0 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-HN}$, E - 17 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-HN}$, F – 30 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-HN}$

5.2.4. Określenie aktywności kaspaz-3/7 w badanych komórkach SKOV-3

Śmierć komórki na drodze apoptozy może zachodzić dwoma szlakami (zewnętrznym – receptorowym oraz wewnętrznym – „mitochondrialnym”), podczas których aktywacja kaspaz stanowi istotny etap prowadzący do zniszczenia struktur białkowych, degradacji kodu DNA, a w efekcie do dezintegracji komórki.

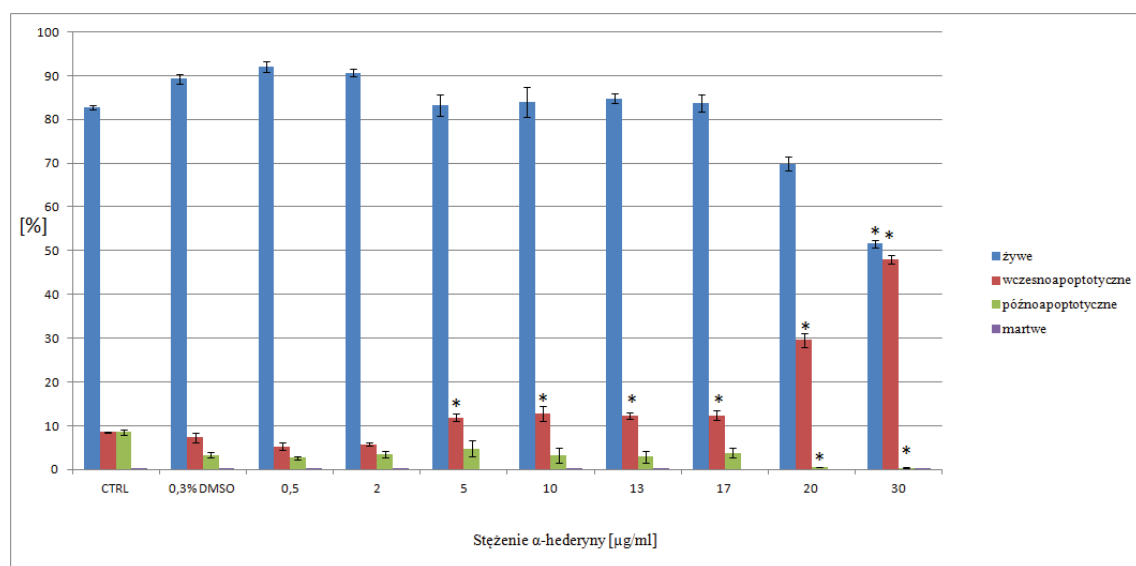
Kaspazy to enzymy z rodziny proteaz cysteinowych, występujące w komórkach pod postacią nieczynnych zymogenów – prokaspaz, które w konkretnych warunkach ulegają kaskadowej aktywacji, prowadząc do zaprogramowanej śmierci komórki. Kaspaza-3 oraz kaspaza-7 należą do kaspaz wykonawczych, które, jako prokaspazy, aktywowane są przez kaspazy inicjujące -2, -8, -9, -10 (111, 192, 193). Kaspaza-3 jest prawdopodobnie najlepiej poznana wśród ssaczych kaspaz ze względu na jej swoistość oraz rolę w procesie apoptozy. Jest aktywna podczas wielu złożonych ścieżek śmierci apoptotycznej, które finalnie prowadzą do kurczenia komórek, kondensacji chromatyny oraz powstawania ciał apoptotycznych (194).

W celu oszacowania aktywności kaspazy-3 oraz kaspazy-7 komórki SKOV-3 poddano działaniu wzrastających stężeń roztworu α -hederyny przez 24 godziny, a następnie barwiono zestawem Muse Caspase-3/7 i analizowano za pomocą Muse Cell Analyzer, zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.2.4. W wyniku prowadzonych doświadczeń zgromadzono ilościowe dane wyrażone w procentach na temat czterech uzyskanych populacji komórek w różnych stadiach apoptozy (Tabela 19, Ryc. 34, Ryc. 36). Zarejestrowane populacje komórek są następujące:

- żywe, nieapoptotyczne: barwnik Muse Caspase-3/7 (-) i 7-AAD (-)
- wczesnoapoptotyczne: barwnik Muse Caspase-3/7 (+) i 7-AAD (-)
- późnoapoptotyczne: barwnik Muse Caspase-3/7 (+) i 7-AAD (+)
- martwe: barwnik Muse Caspase-3/7 (-) i 7-AAD (+)

Tabela 19. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi α -HN w zakresie 0,5 - 30,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.

Komórki SKOV-3		CTRL		α -HN [$\mu\text{g/ml}$]							
		SKOV-3	0,3% DMSO	0,5	2	5	10	13	17	20	30
żywe	[%]	82,83	89,25	92,03	90,68	83,30	83,97	84,75	83,73	69,88	51,57
	\pm SD	0,46	1,05	1,19	0,89	2,41	3,43	1,11	1,93	1,53	0,95
wczesnoapoptotyczne	[%]	8,60	7,35	5,28	5,75	11,90	12,73	12,35	12,42	29,58	48,03
	\pm SD	0,14	1,09	0,81	0,35	0,91	1,75	0,68	0,99	1,54	0,96
późnoapoptotyczne	[%]	8,53	3,37	2,65	3,55	4,80	3,27	2,88	3,85	0,53	0,38
	\pm SD	0,60	0,52	0,39	0,69	1,78	1,70	1,24	0,98	0,03	0,12
martwe	[%]	0,05	0,03	0,03	0,02	0,00	0,03	0,02	0,00	0,00	0,02
	\pm SD	0,00	0,03	0,03	0,03	0,00	0,06	0,03	0,00	0,00	0,03



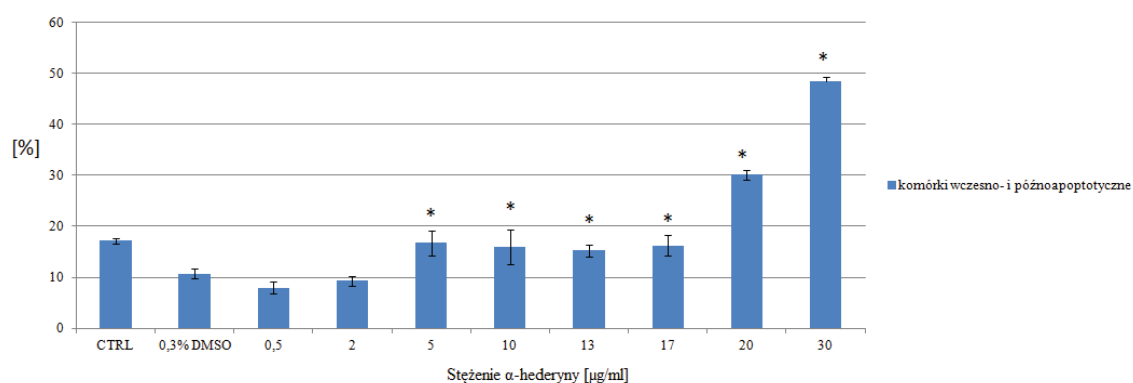
Ryc. 34. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi α -HN w zakresie 0,5 - 30,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.

Wzrastające stężenia roztworu α – hederyny, którym zostały poddane komórki SKOV-3, spowodowały wzrost populacji komórek wczesnoapoptotycznych, począwszy od stężenia α – hederyny 5,0 $\mu\text{g/ml}$. Populacja komórek późnoapoptotycznych nie zwiększyła się, wręcz zauważalny jest jej spadek w stężeniach 20,0 oraz 30,0 $\mu\text{g/ml}$ na rzecz bardzo wyraźnego wzrostu populacji komórek wczesnoapoptotycznych. W tych też stężeniach, inkubacja komórek SKOV-3 z roztworem α – hederyny spowodowała wyraźny spadek populacji komórek żywych.

Całkowity procent komórek apoptotycznych (wczesna i późna apoptoza), jako średnia z trzech niezależnych doświadczeń w porównaniu do komórek kontrolnych oraz komórek kontrolnych poddanych działaniu 0.3% DMSO prezentuje Tabela 20 oraz Ryc. 35.

Tabela 20. Zawartość populacji komórek SKOV-3 wczesno- i późnoapoptotycznych, które poddano działaniu roztworowi α -HN w zakresie 0,5 - 30,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.

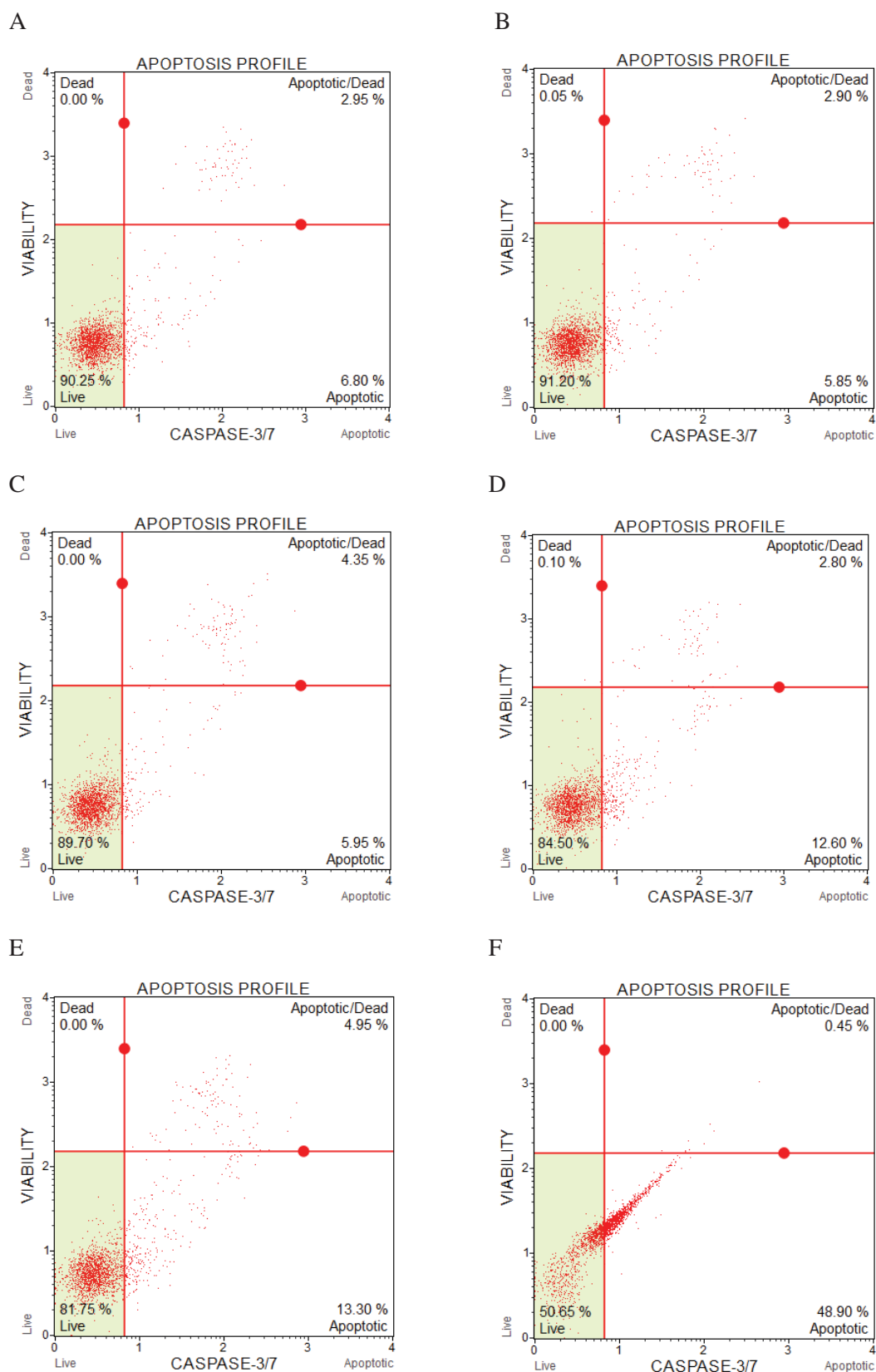
Komórki SKOV-3		CTRL		α -HN [$\mu\text{g/ml}$]							
		SKOV-3	0,3% DMSO	0,5	2	5	10	13	17	20	30
Komórki wczesno- i późnoapoptotyczne	[%]	17,13	10,72	7,93	9,30	16,70	16,00	15,23	16,27	30,12	48,42
	\pm SD	0,46	1,03	1,20	0,92	2,41	3,44	1,13	1,93	0,95	0,95



Ryc. 35. Zawartość [%] populacji komórek SKOV-3 wczesno- i późnoapoptotycznych, które poddano działaniu roztworowi α -HN w zakresie 0,5 - 30,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.

Aktywna kaspaza -3/-7 w populacji komórek apoptotycznych (wczesnej i późnej apoptozy) powoduje odcięcie peptydowego substratu DEVD od odczynnika Muse Caspase-3/7, co skutkuje uwolnieniem barwnika, następnie wniknięciem do jądra komórek z nieuszkodzoną błoną komórkową oraz emisją fluorescencji. Efekt ten był zauważalny w sposób istotny statystycznie przy stężeniu 5 µg/ml oraz przy wyższych badanej saponiny.

Procentową zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 uzyskanych w wyniku działania roztworu α -hederyny w zakresie stężeń 0,5-30 µg/ml prezentuje Ryc. 36.



Ryc. 36. Diagramy przedstawiające procentowy udział poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń alfa-hederyny; A – kontrola 0,3% DMSO, B – 0,5 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, C - 2,0 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, D - 10,0 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, E - 17 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, F - 30 $\mu\text{g/ml}$ α -HN.

5.2.5. Badanie zahamowania fazy cyklu komórkowego w hodowli SKOV-3

Cykl komórkowy, jako cykl życiowy komórki, to jeden z najważniejszych i fundamentalnych procesów w komórkach eukariotycznych, który prowadzi do utworzenia dwóch nowych, potomnych komórek będących idealnymi kopiami macierzystej komórki. Regulacja cyklu komórkowego ma istotne znaczenie dla przeżycia komórek, ponieważ wpływa na regulacje napraw uszkodzeń genetycznych, a także zapobiega niekontrolowanemu podziałowi komórkowemu. Wady cyklu komórkowego są cechą charakterystyczną populacji komórek nowotworowych, a mutacje w obrębie genów zaangażowanych w kontrolowanie cyklu komórkowego są bardzo powszechne w przypadku raka. Analiza cyklu komórkowego staje się coraz ważniejsza w kontekście działania związków przeciwnowotworowych oraz badania mechanizmów podziału komórek (195, 196).

Cykl komórkowy dzieli się na dwie fazy – M (mitoza lub mejoza) oraz interfaza, która stanowi okres pomiędzy jednym podziałem komórki, a kolejnym. Interfaza dzieli się na cztery fazy: G₀, G₁, S oraz G₂. W fazie G₀ znajdują się komórki, które w najbliższym czasie nie ulegną podziałowi. Rozpoczęcie fazy G₁ nakazuje komórce do przejścia przez następujące po sobie fazy cyklu i w efekcie skutkuje jej podziałem.

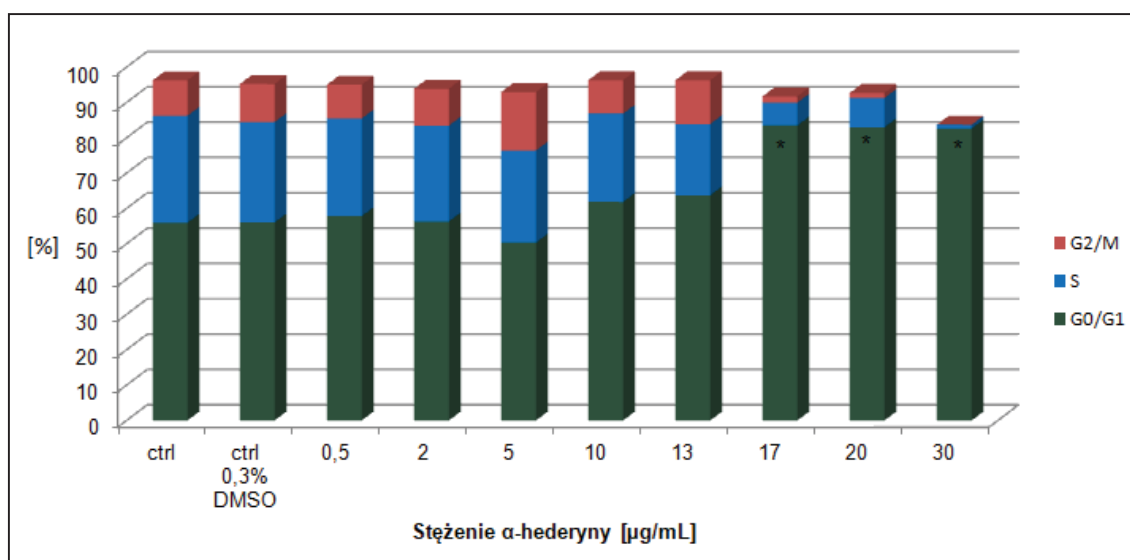
Dane uzyskane z analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.2.5 za pomocą cytometru przepływowego Muse Cell Analyzer przedstawiają istotny, zależny od dawki wzrost populacji komórek SKOV-3 w fazie G₀/G₁ (

Tabela 21, Ryc. 37).

Po 24-godzinnej inkubacji komórek SKOV-3 z roztworem α -hederyny w zakresie 0,5 – 30,0 $\mu\text{g/ml}$ zauważalna była znaczna akumulacja komórek w fazie G0/G1 w wyniku zatrzymania cyklu komórkowego w tej fazie. Efekt ten jest widoczny dla dawki 13 $\mu\text{g/ml}$ α -hederyny, zaś najistotniejszy w zakresie 17-30 $\mu\text{g/ml}$ w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Tabela 21. Populacja [%] komórek SKOV-3 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Stężenie α -HN [$\mu\text{g/ml}$]	G0/G1		S		G2/M	
	[%]	$\pm\text{SD}$	[%]	$\pm\text{SD}$	[%]	$\pm\text{SD}$
ctrl	55,98	2,24	30,23	5,35	10,05	4,78
ctrl 0,3% DMSO	56,05	2,17	28,39	3,13	10,80	3,72
0,5	57,83	4,75	27,64	1,49	9,55	3,72
2,0	56,35	5,94	27,09	1,38	10,45	4,85
5,0	50,35	0,07	26,05	0,78	16,55	0,21
10,0	61,86	8,63	24,98	1,54	9,48	5,42
13,0	63,75	0,35	20,15	0,35	12,40	1,13
17,0	83,50	2,26	6,45	1,77	1,80	0,42
20,0	83,00	1,13	8,27	6,54	1,43	0,38
30,0	82,65	2,19	1,05	1,48	0,00	0,00



Ryc. 37. Analiza cyklu komórkowego komórek SKOV-3 traktowanych przez 24 godziny wzrastającymi stężeniami roztworu α – hederyny.

5.3. Określenie aktywacji kaspaz-8/9 w hodowli SKOV-3 za pomocą luminometru

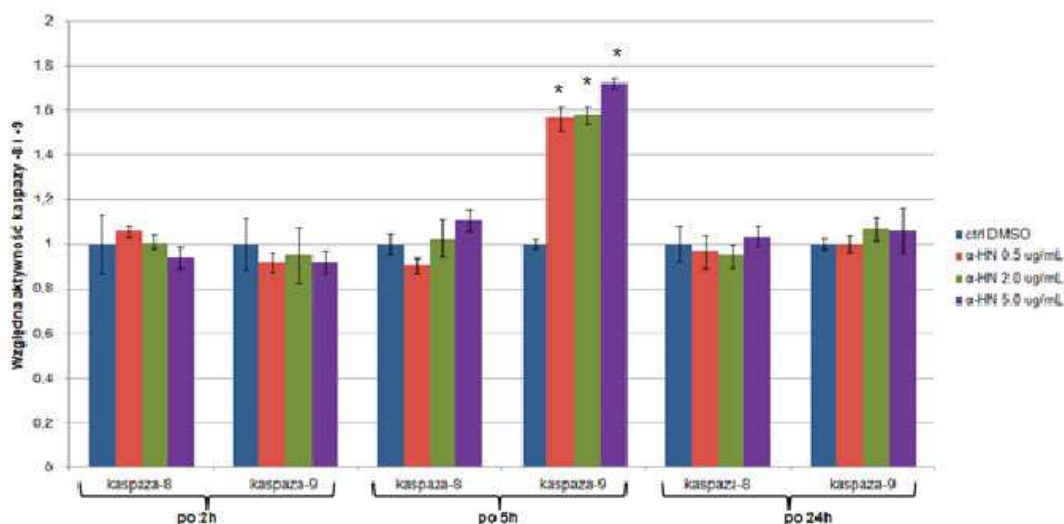
Kaspaza -8 oraz kaspaza -9 należą do kaspaz inicjujących, które aktywują wykonawcze. Kaspaza -8 odpowiedzialna jest za aktywację prokaspaz -3, -6, -7, natomiast kaspaza -9 aktywuje prokaspazy -3 i -7 (111, 192, 193). Kaspaza -8 może

zostać zaktywowana na skutek pobudzenia receptora śmierci, który znajduje się na błonie komórkowej i w efekcie dochodzi do uruchomienia tzw. „zewnętrznego szlaku apoptozy”. Natomiast, kaspaza -9 związana jest z tzw. „wewnętrznym szlakiem apoptozy”. W określonych momentach z międzybłonowej przestrzeni mitochondrialnej uwalniane są do cytoplazmy liczne białka, m.in. cytochrom c oraz czynnik aktywacji proteaz apoptotycznych (Apaf-1), który razem z ATP tworzy strukturę nazwaną apoptosomem. Następnie, Apaf-1 ulega oligomeryzacji, przyłącza się szereg cząsteczek prokaspazy -9, które to ulegają samoaktywacji. Dalej, dochodzi do aktywacji kaspaz wykonawczych, które ostatecznie doprowadzają komórkę do programowanej śmierci poprzez proteolizę białka PARP, histonów, topoisomeras, a także innych białek (111, 197, 198).

W celu oszacowania aktywności kaspazy-8 i kaspazy-9 komórki SKOV-3 poddano działaniu wzrastających stężeń roztworu α -hederyny (0,5–30 μ g/ml) przez 2, 5 i 24 godziny zgodnie z opisem metody w rozdziale 4.4.3.

W przypadku kaspazy-8 w porównaniu z kontrolą (komórki traktowane 0,3% roztworem DMSO), nie zaobserwowano znaczącej jej aktywacji. Aktywność kaspazy-8 dla stężeń 0,5; 2; 5 μ g/ml α -hederyny była podobna do kontroli (Ryc. 38); jednak dla wyższych stężeń α -hederyny (w zakresie 10–30 μ g/ml) i we wszystkich punktach pomiaru czasu aktywność ta była zbliżona do wartości 0 (dane nie pokazane).

W przypadku kaspazy - 9, nastąpił znaczący wzrost jej aktywacji po 5 godzinach inkubowania komórek SKOV-3 z roztworem α -hederyny dla stężeń 0,5, 2 i 5 μ g/ml. Aktywność kaspazy - 9 była odpowiednio 1,56-, 1,58- i 1,71-krotnie wyższa w porównaniu z aktywnością kaspazy w komórkach kontrolnych DMSO (Ryc. 38). Podobnie do wyników luminometrycznych kaspazy-8, aktywność kaspazy-9 była zbliżona do wartości 0 dla wyższych stężeń roztworu α -hederyny (w zakresie 10–30 μ g/ml) dla każdego punktu pomiarowego (danych nie pokazano). Powyższe dane potwierdzają indukcję procesu apoptozy na linii komórkowej SKOV-3 pod wpływem α -hederyny oraz wskazują na znaczącą rolę w tym procesie wewnętrznego szlaku mitochondrialnego.



Ryc. 38. Aktywność kaspazy-8 i kaspazy-9 po traktowaniu komórek SKOV-3 roztworem α -hederyny.

Zgromadzone w niniejszej pracy powyższe wyniki dostarczają wielu nowych informacji, bądź konfrontacji z danymi literaturowymi pochodzącymi głównie z Dalekiego Wschodu, gdzie czarnuszka siewna posiada status cudownej rośliny, panaceum na wszystkie choroby.

Nasiona *N. sativa* były używane już od czasów starożytnych do leczenia wielu chorób, ponieważ przypisywano im wiele leczniczych właściwości, m.in. stymulujące, żółciopędne, żółciotwórcze, wiatropędne, moczopędne i napotne. W medycynie ludowej nasiona miały stanowić leczenie i zapobieganie m. in. dyslipidemii, astmie i egzemie. Mówiono, że nasiona czarnego kminku są w stanie uchronić przed każdym schorzeniem, prócz śmierci (29).

W dzisiejszych czasach prowadzone są na szeroką skalę badania w kierunku poszukiwania skutecznie działających przeciwnowotworowo związków naturalnego pochodzenia. Wśród substancji o wysokiej aktywności i znacznym potencjale działania znajdują się saponiny triterpenowe. Wiele rodzajów nowotworów, szczególnie rak jajnika, jest słabo uleczalnych oraz ma niewystarczające możliwości terapeutyczne. Rak jajnika jest uważany za jeden z najgroźniejszych ginekologicznych nowotworów, plasowany jest na czwartym miejscu wśród zgonów spowodowanych kobiecymi nowotworami (142). Dostępne metody terapii wciąż są mało skuteczne, a jak wskazują

wyniki badań stwierdzana jest szybko rosnąca oporność komórek nowotworowych na dostępne terapie i stosowaną chemioterapię (145). Dlatego istnieje duże zapotrzebowanie na nowe substancje, również pochodzenia naturalnego.

Nasiona czarnuszki siewnej, które były stosowane od wieków, niezaprzeczalnie cechuje bardzo różnorodna i szeroka aktywność biologiczna, przykładowo - przeciwutleniająca, przeciwzapalna, przeciwcukrzycowa, przeciwbakteryjna, przeciwwirusowa, przeciwpasożytnicza i przeciwnowotworowa (5). Wiele z tych działań przypisano głównemu składnikowi olejku eterycznego czarnego kminku - tymochinonowi. W badaniach tymochinonu wykazano również jego aktywność przeciwnowotworową (199-203). Występująca w *Nigella sativa* α -hederyna - aktywna saponina triterpenoidowa – także posiada właściwości przeciwnowotworowe, chociaż dane na temat cytotoksyczności saponin zawartych w nasionach czarnuszki są nadal niewystarczające. Dlatego prowadzenie badań nad aktywnością saponin w czarnuszcze powinno być rozwijane i kontynuowane.

Aktywność cytotoksyczna pięciu badanych ekstraktów pierwotnych otrzymanych z nasion czarnuszki siewnej była bardzo zróżnicowana. Najwyższą aktywność wykazał 50% etanolowy ekstrakt wspomagany ultradźwiękami (Es50). Po podziale na frakcje stwierdzono, że substancje czynne przechodzą do rozpuszczalnika organicznego, co jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań (47, 80).

Wyniki badań cytotoksyczności IC_{50} ekstraktów i frakcji otrzymanych z nasion *Nigella sativa* w stosunku do badanych linii komórkowych, wykazały wyższą aktywność w porównaniu z aktywnością ekstraktów otrzymanych z surowców pochodzących z krajów Dalekiego Wschodu (47, 82, 174).

Zastosowaną metodę RTCA do oznaczania cytotoksyczności cechuje częste zawyżanie wyników względem metod klasycznych, szczególnie dla związków o niewyraźnie zaznaczonej aktywności cytotoksycznej z uwagi na analizę całego profilu działania związków, jednak różnice otrzymanych wyników względem danych literaturowych potwierdza także wykorzystany klasyczny test MTT. Możliwość analizy całości przebiegu eksperymentu daje szeroki pogląd na profil badanej substancji oraz przybliża proces projektowania nowych terapeutyków, a także ułatwia prowadzenie „screeningu” potencjalnych substancji o charakterze nowych leków. Ponadto, opracowana metoda regeneracji E-płytek stosowanych w systemie RTCA dodatkowo

zmniejsza istotnie koszty eksploatacji urządzenia wyposażonego w płytki z elektrodami pokrytymi złotem, jak i przyczynia się do ochrony środowiska.

Nasiona i główny składnik lotnego olejku, tymochinon, były również szeroko badane w licznych badaniach naukowych, także pod kątem ich właściwości cytotoksycznych (65, 204-207). Jednakże, do tej pory, zwrócono niewielką uwagę na aktywną saponinę z nasion *N. sativa*, α – HN (triterpenoid z aglikonem hederageniny), szczególnie, jeśli chodzi o właściwości przeciwnowotworowe i mechanizmy tej aktywności. Wyniki badań fitochemicznych wybranych frakcji prowadzone w niniejszej pracy wskazują, że za wywarcie efektu cytotoksycznego odpowiedzialna jest ta właśnie saponina. Frakcje, które w największym stopniu hamowały proliferację komórek posiadały najwyższą zawartość α -hederyny. Ponadto, udowodniono, że frakcja N o najwyższej zawartości α -hederyny posiada właściwości proapoptotyczne na linii komórkowej SKOV-3. W piśmiennictwie brak jest informacji na temat wpływu α -hederyny na linię komórek jajnika SKOV-3. Dostępne są wyniki badań aktywności cytotoksycznej syntetycznych pochodnych α -hederyny, na trzech rodzajach linii komórkowych, m.in. na komórkach raka jajnika, SK-OV-3 (208). Badania aktywności cytotoksycznej saponin triterpenoidowych w stosunku do linii komórkowej SKOV-3 obejmowały saponiny typu lupanu i oleanu izolowane z korzeni *Pulsatilla koreana* (209, 210). Niewiele jest danych o aktywności cytotoksycznej saponin z aglikonem hederageniny, obecnym w α -hederynie. Pochodne te badano pod kątem ich cytotoksyczności, chociaż nie na linii komórkowej SKOV-3, a α -hederyna okazała się najsilniejszą spośród innych pokrewnych diglikozydów hederageniny. W piśmiennictwie dostępne są wyniki badań wskazujące, że saponiny z aglikonem hederageniny oddziałują z cholesterolem błonowym i powodują destabilizację błony (211). Lorent i in. stwierdzili, że α -hederyna wnika do komórki prawdopodobnie przez szlak zależny od sterolu (101, 102).

W niniejszej pracy zbadano wpływ α -hederyny na linię komórek raka jajnika SKOV-3 i określono mechanizm jej aktywności przeciwnowotworowej. Wyniki wskazują, że ta triterpenowa saponina wykazuje kluczową aktywność cytotoksyczną wobec komórek SKOV-3. Proliferaacja badanych komórek oceniana za pomocą systemu Real-Time xCELLigence i testu MTT była silnie hamowana w sposób zależny od dawki i czasu. Badania te wskazują również, że typem śmierci komórkowej indukowanej przez α -hederynę w hodowli SKOV-3 jest apoptoza. Ta zaprogramowana śmierć komórkowa

wyróżnia się specyficznymi cechami biochemicznymi i morfologicznymi, takimi jak kurczenie się komórki, tworzenie skondensowanych jąder komórkowych, a następnie jego fragmentacja i pęcherzykowanie błony (212). W powyższych badaniach wszystkie te zmiany jądrowe zaobserwowano, stosując barwienia komórek SKOV-3 barwnikiem fluorescencyjnym, Hoechst 33342, po inkubacji komórek z roztworem α – HN.

Również, cechą charakterystyczną wczesnej apoptozy jest utrata asymetrii błony komórkowej z translokacją fosfatydyloseryny z wewnętrznej części błony komórkowej do zewnętrznej jej powierzchni. W rezultacie zależne białko, wiążące fosfolipidy, zwane aneksyną V, może wiązać się z fosfatydyloseryną (184, 213, 214). Dane uzyskane z eksperymentu przedstawiają istotny wzrost populacji apoptotycznych komórek SKOV-3 po traktowaniu roztworem α -hederyny w sposób zależny od dawki.

Główne szlaki apoptozy to: zewnętrzne szlaki receptorów śmierci i wewnętrzne poprzez ścieżkę mitochondrialną (215-217). W szlaku zewnątrzpo pochodnym ligand jest przyłączony do błonowego receptora śmierci, co powoduje zmiany w domenie śmierci receptora, skutkiem czego aktywowana jest również kaspaza-8. Daje to sygnał do rozpoczęcia apoptozy. Jeśli chodzi o wewnętrzny szlak zależny od mitochondriów, w wyniku bodźca chemicznego liczne białka są uwalniane z mitochondriów do cytoplazmy. Stąd można zaobserwować utratę mitochondrialnego wewnętrznego potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$) (218), który jest również związany z wczesnymi stadiami apoptozy (188, 189, 219). Proces ten jest ściśle związany z rolą zarówno anty-jak i proapoptotycznych białek Bcl-2, które znajdują się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i / lub w cytozolu.

Zdolność białka Bcl-2 do hamowania apoptozy jest regulowana przez proces fosforylacji. Jego postać fosforylowana ma funkcję antyapoptotyczną i defosforylacja jest wymagana dla aktywności proapoptotycznej (220, 221). Proces ten prowadzi do powstawania porów w błonie mitochondrialnej i uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytozolu. Uwolniony cytochrom c wraz z apoptotycznym czynnikiem aktywacji proteazy Apaf-1 i ATP tworzą strukturę zwaną apoptosomem. W następnym etapie zachodzi oligomeryzacja białka Apaf-1 i przyłącza się szereg cząsteczek prokaspazy-9. Cząsteczki prokaspazy-9 ulegają samoaktywacji, a ta nowa struktura jest aktywna katalitycznie przez dłuższy czas. Podstawową rolą apoptosomu jest aktywacja kaspaz wykonawczych, w tym kaspazy-3 - podstawowego enzymu

wykonawczego procesu apoptozy (222-230). W niniejszej pracy wykryto istotną, zależną od dawki depolaryzację błony mitochondrialnej w linii komórkowej SKOV-3 w ciągu kilku godzin po potraktowaniu komórek badaną saponiną wraz z inaktywacją antyapoptotycznego białka Bcl-2. Ponadto zaobserwowano znaczny wzrost aktywności kaspazy-9, co doprowadziło do aktywacji kaspazy 3/7 w komórkach, potwierdzając zainicjowanie wewnętrznego szlaku mitochondrialnego w śmierci komórkowej linii SKOV-3. Jednocześnie nie zaobserwowano aktywacji kaspazy-8, zaangażowanej głównie w zewnętrzny szlak apoptozy. Zaobserwowano również, że w przeprowadzonych badaniach zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach SKOV-3 następuje w fazie G0 / G1 po traktowaniu przez 24 godziny roztworem α – HN o wzrastającym zakresie stężeń.

Wyniki powyższych badań mechanizmu działania α – hederyny potwierdzają indukcję procesu programowanej śmierci komórkowej pod wpływem inkubacji komórek SKOV-3 z roztworem badanej saponiny, wskazując, że wewnętrzny, mitochondrialny szlak odgrywa znaczącą rolę w tym procesie.

V. PODSUMOWANIE

Przeprowadzone w niniejszej pracy liczne doświadczenia i analizy pozwoliły na zrealizowanie założonych celów głównych oraz pośrednich dotyczących tematu „Aktywność cytotoksyczna ekstraktów i głównych metabolitów wtórnych nasion czarnuszki siewnej *Nigella sativa*”.

Na podstawie badań aktywności cytotoksycznej za pomocą systemu Real-Time xCELLigence oraz testu MTT oszacowano zahamowanie proliferacji badanych linii komórek nowotworowych (SKOV-3 – linia komórkowa raka jajnika; HeLa – linia komórkowa raka szyjki macicy) i nienowotworowej linii komórek ludzkich keratynocytów (linia komórkowa HaCaT) pod wpływem działania ekstraktów oraz metabolitów wtórnych uzyskanych z nasion czarnuszki siewnej. Jak dotąd nie odnotowano badań cytotoksyczności ekstraktów, czy frakcji na komórkach linii SKOV-3. Efekt ten jest zauważalny dla poszczególnych frakcji, czy ekstraktów, jednak uzyskane wyniki IC_{50} nie klasyfikują ich jako cytotoksyczne według US National Cancer Institute, gdyż wartość ta przekracza 20 $\mu\text{g/ml}$.

W wyniku przeprowadzonych analiz dokonano oceny wpływu sposobów ekstrakcji *Nigella sativa*. Zauważono, że ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE) zwiększa siłę działania ekstraktów wykorzystujących mieszaninę wody i alkoholu (ekstrakt 50% etanolowy), prawdopodobnie przez efekt kawitacji, dzięki któremu dochodzi do sprawniejszego uwalniania zawartości komórki do środowiska. Zauważono także niekorzystny wpływ UAE przy zastosowaniu ekstrakcji wodnej, spowodowany prawdopodobnie zachodzącą sonolizą.

Uzyskane wyniki wskazują również, że związki cytotoksyczne czarnuszki odznaczają się różną polarnością. Potwierdza to stwierdzona zróżnicowana aktywność cytotoksyczna ekstraktów. Wyższą aktywność wykazują ekstrakty wodno-etanolowe (E50 i Es50) w stosunku do nieaktywnego ekstraktu etanolowego 95% (E95), jak również ekstraktu wodnego o niskiej aktywności (Aq).

Analiza aktywności cytotoksycznej badanych frakcji wskazuje, że najwyższymi aktywnościami odznaczają się frakcje z octanem etylu, otrzymane z ekstraktów 50 % etanolowych (frakcje **N** i **S**). Dla wymienionych frakcji, oznaczone IC_{50} na linii SKOV-3 mają wartości poniżej 100 $\mu\text{g/ml}$, w zakresie od 65,8 $\mu\text{g/ml}$ do 97,83 $\mu\text{g/ml}$, niezależnie od metody oznaczania.

Analiza metabolitów z grupy saponin triterpenowych pozwoliła na identyfikację pochodnej hederageniny w nasionach czarnuszki w surowcu polskiego pochodzenia. Uprzednio, związek ten został wydzielony i zidentyfikowany w badaniach saponin nasion *Nigella sativa* w surowcach pochodzących z Indii oraz z Turcji.

W wyniku oznaczenia zawartości α -hederyny w wybranych frakcjach oraz ekstraktach z nasion *Nigella sativa* metodą HPLC zaobserwowano, że ekstrakcja tej saponiny z najwyższą efektywnością ma miejsce przy zastosowaniu octanu etylu, co potwierdziły badania chromatograficzne. Zidentyfikowano najwyższą zawartość α -hederyny dla frakcji N spośród badanych frakcji, a także zaobserwowano, że już w najniższych zastosowanych stężeniach (od około 30 $\mu\text{g/ml}$) powoduje ona zmiany apoptotyczne w hodowli SKOV-3.

Analiza właściwości cytotoksycznych badanej saponiny triterpenowej wykazała jej bardzo wysoką aktywność wobec komórek raka jajnika SKOV-3, bez względu na zastosowaną metodę pomiaru. Ponadto, ustalono także mechanizm aktywności cytotoksycznej α -hederyny na linii komórkowej SKOV-3. Dowiedziono, że w komórkach linii raka jajnika, SKOV-3, w wyniku inkubacji z roztworem α -hederyny, dochodzi do indukcji procesu apoptozy oraz że wewnętrzny szlak mitochondrialny odgrywa znaczącą rolę w tym procesie, z jednoczesną inaktywacją antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz aktywacją kaspaz -3, -7, -9.

Dokonano porównania obu zastosowanych metod do badania cytotoksyczności (MTT oraz RTCA). Analizy prowadzone za pomocą systemu RTCA, pozwalają na śledzenie działania związku w czasie rzeczywistym, nie punktowym, oraz dostarczają kompletnych informacji na temat profilu badanego związku, dając możliwość oszacowania jego aktywności cytotoksycznej. Klasyczny test MTT nie dostarcza takich możliwości. Jeśli analizowany związek nie charakteryzuje się bardzo wysokimi właściwościami cytotoksycznymi, pozwalając komórkom na względnie długie przeżycie w czasie trwania eksperymentu zanim dojdzie do spadku ich przeżywalności, to wówczas system odnotowuje także te pierwsze, względnie wysokie wartości IC_{50} , które podnoszą ostateczny wynik. Przeciwnie dzieje się w przypadku zastosowania klasycznego testu MTT, który nie umożliwia prześledzenia wpływu badanych związków podczas trwania danej analizy.

Ponadto, opracowano metodę regeneracji E-płytek używanych w systemie RTCA, co znacznie obniża koszty analiz. Ustalono, że regeneracja nie wpływa na powtarzalność wyników.

VI. WNIOSKI

W podsumowaniu wykonanych badań i przeprowadzonej analizy uzyskanych wyników oraz przeprowadzonej dyskusji można stwierdzić, że zrealizowano wszystkie cele pracy i postawić następujące wnioski:

1. Badania aktywności cytotoksycznej ekstraktów *Nigella sativa* w stosunku do linii komórek nowotworowych (SKOV-3 - linia komórkowa raka jajnika; HeLa – linia komórkowa raka szyjki macicy), a także nienowotworowej linii komórek ludzkich keratynocytów (linia komórkowa HaCaT) wykazały, że najwyższą aktywność wykazuje ekstrakt wodno-etanolowy (50% v/v) otrzymany metodą wspomaganą ultradźwiękami oraz frakcje z octanem etylu. Uzyskane wartości IC_{50} przekraczają wartość 20 $\mu\text{g/ml}$ i zgodnie z klasyfikacją National Cancer Institute nie wykazują aktywności cytotoksycznej.
2. We frakcjach o najwyższej aktywności cytotoksycznej stwierdzono występowanie saponiny triterpenoidowej, α -hederyny.
3. W nasionach *Nigella sativa* potwierdzona została obecność wcześniej wyodrębnionej i opisaniej w literaturze, pochodnej hederageniny: 3-O-[β -D-ksylopiranozylo-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozylo]-28-O-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozyd]-hederageniny.
4. Badania wpływu aktywnej frakcji N, zawierającej α -hederynę, na komórki linii SKOV-3 wykazały, że frakcja ta powoduje zmiany apoptotyczne.
5. α -Hederyna, monodesmozydowa saponina triterpenoidowa, wykazuje bardzo silne właściwości cytotoksyczne w hodowli komórkowej raka jajnika, SKOV-3 z wartościami IC_{50} wynoszącymi 2.62 ± 0.04 oraz 2.48 ± 0.32 odpowiednio dla metod RTCA i MTT.
6. Określono mechanizm aktywności α -hederyny w stosunku do komórek linii SKOV-3. α -Hederyna wywołuje apoptozę. Wykazano, że jest to szlak wewnętrzny, mitochondrialny programowanej śmierci komórkowej, z jednoczesną inaktywacją

antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz aktywacją kaspaz -3, -7, -9; zaś cykl komórkowy został zatrzymany w fazie G0/G1.

7. Stosowane do pomiaru cytotoksyczności metody: test MTT oraz system Real-Time xCELLigence dostarczają porównywalnych i uzupełniających się wyników.
8. Opracowano metodę regeneracji E-płytek stosowanych w systemie Real-Time xCELLigence (RTCA). Wykazano, że E-płytki mogą być kilkakrotnie regenerowane oraz ponownie wykorzystywane z dobrą odtwarzalnością wyników w eksperymentach.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. PLANTSdatabase. <http://plants.usda.gov>
2. Mowszowicz J. Pospolite rośliny naczyniowe Polski. Wydanie VII. Warszawa PWN.1986, p. 85.
3. Pałczyński A, Podbielkowski Z, Polakowski B. Botanika. Warszawa, PWN1991.
4. Szweykowska A, Szweykowski J. Botanika - Systematyka, tom II. Warszawa, PWN1993, p. 369.
5. Adamska A, Ochocka JR. *Nigella sativa* źródłem związków bioaktywnych. Post. Fitoter.2016. p. 97-105.
6. Świejkowski L. Rośliny lecznicze i przemysłowe -klucz do oznaczania. Warszawa: Wydawnictwo Rynku Wewnętrznego "Libra"; 1990.
7. Kokdil G, Yilmaz H. Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2005;33(12):1203-9.
8. Botnick I, Xue WT, Bar E, Ibdah M, Schwartz A, Joel DM, et al. Distribution of Primary and Specialized Metabolites in *Nigella sativa* Seeds, a Spice with Vast Traditional and Historical Uses. *Molecules*. 2012;17(9):10159-77.
9. Mańkowska D. *Nigella sativa* L. - związki czynne, aktywność biologiczna. In: Bylka W, editor. *Herba Polonica*2009. p. 109-25.
10. Szafer W, Kulczyński S, Pawłowski B. Rośliny polskie, część I, Warszawa, PWN1988. p.165.
11. Ansari AA, Hassan S, Kenne L, Attaurrahman, Wehler T. STRUCTURAL STUDIES ON A SAPONIN ISOLATED FROM NIGELLA-SATIVA. *Phytochemistry*. 1988;27(12):3977-9.
12. Taskin MK, Caliskan OA, Anil H, Abou-Gazar H, Khan IA, Bedir E. Triterpene saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry*. 2005;29(5):561-9.
13. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999;19(5):757-62.
14. Houghton PJ, Zarka R, Delasheras B, Hoult JRS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid-peroxidation. *Planta Medica*. 1995;61(1):33-6.
15. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*. 2005;5(13-14):1749-70.
16. Sultan MT, Butt MS, Karim R, Zia-UI-Haq M, Batool R, Ahmad S, et al. *Nigella sativa* Fixed and Essential Oil Supplementation Modulates Hyperglycemia and Allied Complications in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014:8.
17. Al-Jasass FM, Al-Jasser MS. Chemical Composition and Fatty Acid Content of Some Spices and Herbs under Saudi Arabia Conditions. *Scientific World Journal*. 2012:5.
18. Xue WT, Batushansky A, Toubiana D, Botnick I, Szymanski J, Khozin-Goldberg I, et al. The Investment in Scent: Time-Resolved Metabolic Processes in Developing Volatile-Producing *Nigella sativa* L. Seeds. *Plos One*. 2013;8(9):12.
19. Venkatachallam SKT, Pattekhan H, Divakar S, Kadimi US. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seed extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 2010;47(6):598-605.

20. Wajs A, Bonikowski R, Kalembe D. Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*. 2008;23(2):126-32.
21. Morikawa T, Xu FM, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M. Nigellamines A(3), A(4), A(5), and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2004;52(4):494-7.
22. Attaurrahman, Malik S, Zaman K. NIGELLIMINE - A NEW ISOQUINOLINE ALKALOID FROM THE SEEDS OF NIGELLA-SATIVA. *Journal of Natural Products*. 1992;55(5):676-8.
23. Attaurrahman, Malik S, Ahmad S, Chaudhary I, Habiburrahman. NIGELLIMINE N-OXIDE - A NEW ISOQUINOLINE ALKALOID FROM THE SEEDS OF NIGELLA-SATIVA. *Heterocycles*. 1985;23(4):953-5.
24. Attaurrahman, Malik S, He CH, Clardy J. ISOLATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF NIGELLICINE, A NOVEL ALKALOID FROM THE SEEDS OF NIGELLA-SATIVA. *Tetrahedron Letters*. 1985;26(23):2759-62.
25. Attaurrahman, Malik S, Hasan SS, Choudhary MI, Ni CZ, Clardy J. NIGELLIDINE - A NEW INDAZOLE ALKALOID FROM THE SEEDS OF NIGELLA-SATIVA. *Tetrahedron Letters*. 1995;36(12):1993-6.
26. Kumara SSM, Huat BTK. Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, alpha-hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Medica*. 2001;67(1):29-32.
27. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Research*. 1998;18(3A):1527-32.
28. Hassanien MFR, Assiri AMA, Alzohairy AM, Oraby HF. Health-promoting value and food applications of black cumin essential oil: an overview. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 2015;52(10):6136-42.
29. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research*. 2003;17(4):299-305.
30. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;94(3):223-53.
31. Maraghehpour B, Khayamzadeh M, Najafi S, Kharazifard M. Traditionally used herbal medicines with antibacterial effect on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: *Boswellia serrata* and *Nigella sativa*. *J Indian Soc Periodontol*. 2016:603-7.
32. Dubey PN, Singh B, Mishra BK, Kant K, Solanki RK. *Nigella* (*Nigella sativa*): a high value seed spice with immense medicinal potential. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2016;86(8):967-79.
33. Sayed MD. TRADITIONAL MEDICINE IN HEALTH-CARE. *Journal of Ethnopharmacology*. 1980;2(1):19-22.
34. Benkaci-Ali F, Baaliouamer A, Meklati BY, Chemat F. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*. 2007;22(2):148-53.
35. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan S, Najmi A, Siddique N, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013:337-52.
36. <http://www.czarnuszka-siewna.pl/>
37. Czajkowska A, Gornowicz A, Pawlowska N, Czarnomys R, Nazaruk J, Szymanowski W, et al. Anticancer Effect of a Novel Octahydropyrazino 2,1-a:5,4-a' diisoquinoline Derivative and Its

Synergistic Action with *Nigella sativa* in Human Gastric Cancer Cells. *Biomed Research International*. 2017;13.

38. Wielgosz T. **Wielka księga ziół polskich**. Poznań: Publicat S.A.2008.

39. Khan MA, Afzal M. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: Part 2 Recent advances. *Inflammopharmacology*. 2016;24(2-3):67-79.

40. Topozada H, Mazloum H, el-Dakhakhny M. The antibacterial properties of the *Nigella sativa* L. seeds. Active principle with some clinical applications. *J Egypt Med Assoc*. 1965:187-202.

41. el-Dakhakhny M. Studies on the Egyptian *Nigella sativa* L. IV. Some pharmacological properties of the seeds' active principle in comparison to its dihydro compound and its polymer. *Arzneimittelforschung*. 1965:1227-9.

42. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 2000;14(5):323-8.

43. Mouwakeh A, Kincses A, Nove M, Mosolygo T, Mohacsi-Farkas C, Kisko G, et al. *Nigella sativa* essential oil and its bioactive compounds as resistance modifiers against *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*. 2019;33(4):1010-8.

44. Heshmati J, Namazi N, Memarzadeh MR, Taghizadeh M, Kolandooz F. *Nigella sativa* oil affects glucose metabolism and lipid concentrations in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Food Research International*. 2015;70:87-93.

45. Manjegowda SB, Rajagopal HM, Dharmesh SM. Polysaccharide of Black cumin (*Nigella sativa*) modulates molecular signaling cascade of gastric ulcer pathogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;101:823-36.

46. Tabassum H, Ahmad IZ. Evaluation of the anticancer activity of sprout extract-loaded nanoemulsion of N-sativa against hepatocellular carcinoma. *Journal of Microencapsulation*. 2018;35(7-8):643-56.

47. Mbarek LA, Mouse HA, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007;40(6):839-47.

48. Atasever M, Bakacak Z. *Nigella Sativa* Oil Protects the Rat Ovary from Oxidative Injury Due to Ischemia-Reperfusion. *Medical Science Monitor*. 2017;23:5027-33.

49. Piras A, Rosa A, Marongiu B, Porcedda S, Falconieri D, Dessi MA, et al. Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. *INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS*. 2013;46:317-23.

50. Darakhshan S, Pour AB, Colagar AH, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*. 2015;95-96:138-58.

51. El-Mahdy MA, Zhu QZ, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International Journal of Cancer*. 2005;117(3):409-17.

52. Effenberger K, Breyer S, Schobert R. Terpene Conjugates of the *Nigella sativa* Seed-Oil Constituent Thymoquinone with Enhanced Efficacy in Cancer Cells. *Chemistry & Biodiversity*. 2010;7(1):129-39.

53. Lei XF, Lv XG, Liu M, Yang ZR, Ji MY, Guo XF, et al. Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;417(2):864-8.
54. Sakalar C, Izgi K, Iskender B, Sezen S, Aksu H, Cakir M, et al. The combination of thymoquinone and paclitaxel shows anti-tumor activity through the interplay with apoptosis network in triple-negative breast cancer. *Tumor Biology*. 2016;37(4):4467-77.
55. Khalife R, Hodroj MH, Fakhoury R, Rizk S. Thymoquinone from *Nigella sativa* Seeds Promotes the Antitumor Activity of Noncytotoxic Doses of Topotecan in Human Colorectal Cancer Cells in Vitro. *Planta Medica*. 2016;82(4):312-21.
56. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, et al. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International Journal of Oncology*. 2004;25(4):857-66.
57. Norwood AA, Tucci M, Benghuzzi H. A comparison of 5-fluorouracil and natural chemotherapeutic agents, EGCG and thymoquinone, delivered by sustained drug delivery on colon cancer cells. *Biomedical Sciences Instrumentation*, Vol 43. 2007;43:272-7.
58. Salim EI, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cummin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 2003;45(2):195-202.
59. Kaseb AO, Mohammad RM, Banerjee S, Wang Z, Mohammad M, Sarkar FH, et al. RETRACTION: Antitumor Activity of Gemcitabine and Oxaliplatin Is Augmented by Thymoquinone in Pancreatic Cancer (Retraction of Vol 69, Pg 5575, 2009). *Cancer Research*. 2018;78(18):5468-.
60. Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone Supplementation Induces Quinone Reductase and Glutathione Transferase in Mice Liver: Possible Role in Protection against Chemical Carcinogenesis and Toxicity. *Phytotherapy Research*. 2009;23(9):1295-8.
61. Badary OA, El-Din AMG. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detection and Prevention*. 2001;25(4):362-8.
62. Khan N, Sultana S. Inhibition of two stage renal carcinogenesis, oxidative damage and hyperproliferative response by *Nigella sativa*. *European Journal of Cancer Prevention*. 2005;14(2):159-68.
63. Dirican A, Atmaca H, Bozkurt E, Erten C, Karaca B, Uslu R. Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K-AKT pathway. *Clinical & Translational Oncology*. 2015;17(2):145-51.
64. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, et al. Androgen receptor- and E2F-1-targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*. 2007;67(16):7782-8.
65. Khan MA, Tania M, Fu SY, Fu JJ. Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. *Oncotarget*. 2017;8(31):51907-19.
66. Imran M, Rauf A, Khan IA, Shahbaz M, Qaisrani TB, Fatmawati S, et al. Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;106:390-402.

67. Taha MME, Sheikh BY, Salim LZA, Mohan S, Khan A, Kamalidehghan B, et al. Thymoquinone induces apoptosis and increase ROS in ovarian cancer cell line. *Cellular and Molecular Biology*. 2016;62(6):97-101.
68. Wilson-Simpson F, Vance S, Benghuzzi H. Physiological responses of ES-2 ovarian cell line following administration of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), thymoquinone (TQ) and selenium (SE). *Biomedical Sciences Instrumentation*, Vol 43. 2007;43:378-83.
69. Johnson-Ajinwo OR, Ullah I, Mbye H, Richardson A, Horrocks P, Li WW. The synthesis and evaluation of thymoquinone analogues as anti-ovarian cancer and antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018;28(7):1219-22.
70. Saadia M, Sher M, Bashir S, Murtaza MA, Shah A, Khan MA. Comparative hepatoprotective effect of *Nigella sativa* pre- and post-treatment to rabbits. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;32(1):205-12.
71. Kilinc E, Dagistan Y, Kotan B, Cetinkaya A. Effects of *Nigella sativa* seeds and certain species of fungi extracts on number and activation of dural mast cells in rats. *Physiology International*. 2017;104(1):15-24.
72. Sari Y, Purnawan I, Kurniawan DW, Sutrisna E. A Comparative Study of the Effects of *Nigella sativa* Oil Gel and Aloe Vera Gel on Wound Healing in Diabetic Rats. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*. 2018;23:6.
73. Salomi MJ, Nair SC, Panikkar KR. INHIBITORY EFFECTS OF NIGELLA-SATIVA AND SAFFRON (CROCUS-SATIVUS) ON CHEMICAL CARCINOGENESIS IN MICE. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 1991;16(1):67-72.
74. Abdel-Moneim AM, Essawy AE, Hamed SS, Abou-Gabal AA, Alzergy AA. Protective effect of *Nigella sativa* seeds against spermatocyte chromosomal aberrations and genotoxicity induced by carbon tetrachloride in mice. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017;24(12):11677-82.
75. Ezirganli S, Kazancioglu HO, Ozdemir H, Inan DS, Tek M. The Effects of *Nigella Sativa* Seed Extract on Bone Healing in an Experimental Model. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2016;27(7):1905-9.
76. Iqbal MS, Ahmad A, Pandey B. Solvent based optimization for extraction and stability of thymoquinone from *Nigella sativa* Linn. and its quantification using RP-HPLC. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2018;24(6):1209-19.
77. Ashraf S, Anjum AA, Ahmad A, Firyal S, Sana S, Latif AA. In vitro activity of *Nigella sativa* against antibiotic resistant *Salmonella enterica*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;58:54-8.
78. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. ANTIOXIDANT, ANTI-INFLAMMATORY, ANTICANCER AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM NIGELLA SATIVA (BLACK CUMIN) PLANT PARTS. *Journal of Food Biochemistry*. 2012;36(5):539-46.
79. Mukhtar I, Nurul H, Kazutaka M, Fariz N. *Nigella sativa* as an anti-inflammatory agent in asthma. *BioMed Central Research Notes*. 2018.
80. Swamy SMK, Tan BKH. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;70(1):1-7.
81. Farah IO, Begum RA. Effect of *Nigella sativa* (*N. Sativa* L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. *Biomedical Sciences Instrumentation*, Vol 39. 2003;39:359-64.

82. Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA. Cytotoxicity of *Nigella Sativa* Seed Oil and Extract Against Human Lung Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(2):983-7.
83. Raval B, Shah T, Patel J, Patel B, Patel R, Suthar M. Potent anticancer activity of *Nigella sativa* seeds. *Archives of Applied Science Research*. 2010;2(1):52-6.
84. Arslan BA, Isik FB, Gur H, Ozen F, Catal T. Apoptotic Effect of *Nigella sativa* on Human Lymphoma U937 Cells. *Pharmacognosy Magazine*. 2017;13(51):S628-S32.
85. Zaher KS, Ahmed WM, Zerizer SN, Cumin OotBEoB, sinensis). SNSaGTC. Observation on the Biological Effects of Black Cumin (*Nigella sativa*) and Green Tea (*Camellia sinensis*). *Global Veterinaria*. 2008;2(4):198-204.
86. Galhena BP, Samarakoon SSR, Thabrew MI, Paul SFD, Perumal V, Mani C. Protective Effect of a Polyherbal Aqueous Extract Comprised of *Nigella sativa* (Seeds), *Hemidesmus indicus* (Roots), and *Smilax glabra* (Rhizome) on Bleomycin Induced Cytogenetic Damage in Human Lymphocytes. *Biomed Research International*. 2017:7.
87. Rajani M, Mukesh T. Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic actions qualify *Nigella sativa* as taxane therapy adjuvant in ovarian cancer. *Molecular Cancer Research* 2016. p. A53-A.
88. Abdullah AR. Anticancer Effects of *Eurycoma longifolia*, *Nigella sativa* and *Hibiscus sabdariffa* on Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Allied Health Sciences*. 2017;1(1).
89. Muhammad TI. A Pharmacological Emphasized Revision on Alpha-Hederin. *J Complement Med Alt Healthcare* 2017.
90. Gulcin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchicide F. *Planta Med*. 2004;70(6):561-3.
91. Keyhanmanesh R, Saadat S, Mohammadi M, Shahbazfar A, Fallahi M. The Protective Effect of α -hederin, the Active Constituent of *Nigella sativa*, on Lung Inflammation and Blood Cytokines in Ovalbumin Sensitized Guinea Pigs. *Phytother Res*. 2015;29(11):1761-7.
92. Ridoux O, Di Giorgio C, Delmas F, Elias R, Mshvildadze V, Dekanosidze G, et al. In vitro antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A(1), in association with pentamidine and amphotericin B. *Phytotherapy Research*. 2001;15(4):298-301.
93. Delmas F, Di Giorgio C, Elias R, Gasquet M, Azas N, Mshvildadze V, et al. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A(1), as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta Medica*. 2000;66(4):343-7.
94. Shi JZ, Liu GT. Effect of alpha-hederin and sapindoside B on hepatic microsomal cytochrome P-450 in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*. 1996;17(3):264-6.
95. Jeong HG. Suppression of constitutive and inducible cytochrome P450 gene expression by alpha-Hederin in mice. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1998;46(5):1019-26.
96. Liu J, Choudhuri S, Liu YP, Kreppel H, Andrews GK, Klaassen CD. INDUCTION OF METALLOTHIONEIN BY ALPHA-HEDERIN. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1993;121(1):144-51.
97. Kim JY, Choi CY, Jeong HG. Involvement of cytokines in the hepatic metallothionein expression by alpha-hederin. *Planta Medica*. 2005;71(8):743-7.

98. Gepdiremen A, Mshvildadze V, Suleyman H, Elias R. Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*. 2005;12(6-7):440-4.
99. Danloy S, Quetinleclercq J, Coucke P, Depauwillet MC, Elias R, Balansard G, et al. Effects of alpha-hederin, a saponin extracted from *Hedera helix*, on cells cultured in vitro. *Planta Medica*. 1994;60(1):45-9.
100. Rooney S, Ryan MF. Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer Research*. 2005;25(3B):2199-204.
101. Lorent J, Lins L, Domenech O, Quetin-Leclercq J, Brasseur R, Mingeot-Leclercq MP. Domain Formation and Permeabilization Induced by the Saponin alpha-Hederin and Its Aglycone Hederagenin in a Cholesterol-Containing Bilayer. *Langmuir*. 2014;30(16):4556-69.
102. Lorent J, Le Duff CS, Quetin-Leclercq J, Mingeot-Leclercq MP. Induction of Highly Curved Structures in Relation to Membrane Permeabilization and Budding by the Triterpenoid Saponins, alpha- and delta-Hederin. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(20):14000-17.
103. Jeong HG, Choi CY. Expression of inducible nitric oxide synthase by alpha-hederin in macrophages. *Planta Medica*. 2002;68(5):392-6.
104. Swamy S, Huat B. Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in alpha-hederin-induced apoptosis of P388 cells. *Mol Cell Biochem*. 2003;245:127-39.
105. Cheng L, Xia TS, Wang YF, Zhou WB, Liang XQ, Xue JQ, et al. The anticancer effect and mechanism of alpha-hederin on breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2014;45(2):757-63.
106. Sieben A, Prenner L, Sorkalla T, Wolf A, Jakobs D, et al. Alpha-hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of beta 2-adrenergic receptors. *Biochem*. 2009;48(15):3477-82.
107. Bang S, Seo H, Shin H, Lee K, Anh Hoang L, Jung S. A Convenient Preparation of a Disaccharide Motif and its Role in the Cytotoxicity of the Triterpenoid Saponin, α -Hederin. *Arch Pharm Res Arch Pharm Res Vol 31, No 5*, 555-561, 2008. 2008;31(5):555-61.
108. Bun SS, Elias R, Baghdikian B, Ciccolini J, Ollivier E, Balansard G. alpha-Hederin Potentiates 5-FU Antitumor Activity in Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Phytotherapy Research*. 2008;22(10):1299-302.
109. Zhu R, Zhang CG, Liu Y, Yuan ZQ, Chen WL, Yang SD, et al. CD147 monoclonal antibody mediated by chitosan nanoparticles loaded with alpha-hederin enhances antineoplastic activity and cellular uptake in liver cancer cells. *Scientific Reports*. 2015;5:13.
110. AmaraMokrane YA, LehucherMichel MP, Balansard G, Dumenil G, Botta A. Protective effects of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*. 1996;11(2):161-7.
111. Skierski J. Badanie działania cytotoksycznego substancji chemicznych. *Postępy biologii komórki*. 2008;35:147-63.
112. Cytotoksyczność – Wikipedia, wolna encyklopedia 2014 [Available from: <http://pl.wikipedia.org/wiki/Cytotoksyczno%C5%9B%C4%87>].
113. Anuszevska E. Badanie aktywności cytotoksycznej produktów leczniczych i wyrobów medycznych. *Gazeta Farmaceutyczna*. 2010:36-8.

- 114.Krzysztoń-Russjan J, Książek I, Anuszevska E. Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. *Farmacja Polska*. 2009;65:395-402.
- 115.Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. TETRAZOLIUM-BASED ASSAYS FOR CELLULAR VIABILITY - A CRITICAL-EXAMINATION OF SELECTED PARAMETERS AFFECTING FORMAZAN PRODUCTION. *Cancer Research*. 1991;51(10):2515-20.
- 116.Niu QX, Zhao CY, Jing ZA. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*. 2001;251(1-2):11-9.
- 117.Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. AN IMPROVED COLORIMETRIC ASSAY FOR CELL-PROLIFERATION AND VIABILITY UTILIZING THE TETRAZOLIUM SALT XTT. *Journal of Immunological Methods*. 1991;142(2):257-65.
- 118.Chen J, Cheng GH, Chen LP, Pang TY, Wang XL. Prediction of Chemotherapeutic Response in Unresectable Non-small-cell Lung Cancer (NSCLC) Patients by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) Assay. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(5):3057-62.
- 119.Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. USE OF AN AQUEOUS SOLUBLE TETRAZOLIUM FORMAZAN ASSAY FOR CELL-GROWTH ASSAYS IN CULTURE. *Cancer Communications*. 1991;3(7):207-12.
- 120.Tsukatani T, Suenaga H, Higuchi T, Akao T, Ishiyama M, Ezoe K, et al. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;75(1):109-16.
- 121.Tsukatani T, Suenaga H, Higuchi T, Shiga M, Noguchi K, Matsumoto K. Distinction of Gram-positive and -negative bacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts with a selection medium. *Journal of General and Applied Microbiology*. 2011;57(6):331-9.
- 122.Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008;3(7):1125-31.
- 123.Stokłosowa S. Hodowla komórek i tkanek.: Wydawnictwo Naukowe PWN.; 2011.
- 124.Caltová K, Cervinka M. Antiproliferative effects of selected chemotherapeutics in human ovarian cancer cell line A2780. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2012;55:116-24.
- 125.Erskine CL, Henle AM, Knutson KL. Determining Optimal Cytotoxic Activity of Human Her2neu Specific CD8 T cells by Comparing the Cr51 Release Assay to the xCELLigence System. *Jove-Journal of Visualized Experiments*. 2012(66):6.
- 126.Asphahani F, Zhang M. Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection. *Analyst*. 2007;132(9):835-41.
- 127.Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*. 2010;26(1):51-8.
- 128.Arias LR, Perry CA, Yang LJ. Real-time electrical impedance detection of cellular activities of oral cancer cells. *Biosensors & Bioelectronics*. 2010;25(10):2225-31.
- 129.Stefanowicz-Hajduk J, Adamska A, Bartoszewski R, Ochocka JR. Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. *Biotechniques*. 2016;61(3):117-22.

- 130.Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, du Mez E, et al. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors*. 2015;5(2):199-222.
- 131.Moudi M, Go R, Yien CY, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med. Int J Prev Med*. 2013;4:1231-5.
- 132.Spielmann H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. *ILAR journal*. 2002;43 Suppl:S11-7.
- 133.Morimoto H, Yonehara S, Bonavida B. Overcoming tumor-necrosis-factor and drug-resistance of human tumor-cell lines by combination treatment with anti-fas antibody and drugs or toxins. *Cancer Research*. 1993;53(11):2591-6.
- 134.<http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/htb-77.aspx>
- 135.Hernandez L, Kim MK, Lyle LT, Bunch KP, House CD, Ning F, et al. Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecologic Oncology*. 2016;142(2):332-40.
- 136.Abd Rahman M, Ramli F, Karimian H, Dehghan F, Nordin N, Ali HM, et al. Artonin E Induces Apoptosis via Mitochondrial Dysregulation in SKOV-3 Ovarian Cancer Cells. *Plos One*. 2016;11(3):23.
- 137.Ren MX, Deng XH, Ai F, Yuan GY, Song HY. Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015;10(2):579-83.
- 138.Maciejczyk A, Surowiak P. Quercetin inhibits proliferation and increases sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Ginekologia Polska*. 2013;84(7):590-5.
- 139.Peng B, Chang Q, Wang LW, Hu Q, Wang YQ, Tang JT, et al. Suppression of human ovarian SKOV-3 cancer cell growth by Duchesnea phenolic fraction is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Gynecologic Oncology*. 2008;108(1):173-81.
- 140.Adamska A, Stefanowicz-Hajduk J, Ochocka J. Alpha-Hederin, the Active Saponin of *Nigella sativa*, as an Anticancer Agent Inducing Apoptosis in the SKOV-3 Cell Line. *Molecules*. 2019;24(16).
- 141.Li CZ, Liu B, Wen ZQ, Wang CX, Li HY. Inhibition of CD44 Expression by Small Interfering RNA to Suppress the Growth and Metastasis of Ovarian Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Folia Biologica*. 2008;54(6):180-6.
- 142.<https://gco.iarc.fr/>
- 143.Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce - wskaźnik 5-letnich przeżyć według województw. Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa2010.
- 144.Rosenthal AN, Fraser L, Philpott S, Manchanda R, Badman P, Hadwin R, et al. Final results of 4-monthly screening in the UK Familial Ovarian Cancer Screening Study (UKFOCSS Phase 2). *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(15):1.
- 145.Pankowska M, Stachurska A, Woźniak M, MałECKI M. siRNA preparations in gene therapy of ovarian cancer. *Curr Gynecol Oncol*. 2014;12 (3):p. 197-205.
- 146.Schorge JO, Modesitt SC, Coleman RL, Cohn DE, Kauff ND, Duska LR, et al. SGO White Paper on Ovarian Cancer: Etiology, Screening and Surveillance. *Gynecologic Oncology*. 2010;119(1):7-17.

147. Goff BA, Mandel LS, Drescher CW, Urban N, Gough S, Schurman KM, et al. Development of an ovarian cancer symptom index - Possibilities for earlier detection. *Cancer*. 2007;109(2):221-7.
148. Geomini P, Kruitwagen R, Bremer GL, Cnossen J, Mol BWJ. The Accuracy of Risk Scores in Predicting Ovarian Malignancy A Systematic Review. *Obstetrics and Gynecology*. 2009;113(2):384-94.
149. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(17):3194-200.
150. Suidan RS, Clair CMS, Lee SJ, Barlin JN, Roche KCL, Tanner EJ, et al. A comparison of primary intraperitoneal chemotherapy to consolidation intraperitoneal chemotherapy in optimally resected advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2014;134(3):468-72.
151. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, et al. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(26):2484-96.
152. Manganaro L, Gigli S, Antonelli A, Saldari M, Tomao F, Marchetti C, et al. Imaging strategy in recurrent ovarian cancer: a practical review. *Abdominal Radiology*. 2019;44(3):1091-102.
153. Pizzoli SFM, Renzi C, Arnaboldi P, Russell-Edu W, Pravettoni G. From life-threatening to chronic disease: Is this the case of cancers? A systematic review. *Cogent Psychology*. 2019;6(1):17.
154. Basta A, Bidziński M, Bieńkiewicz A, Blecharz P, Bodnar L, Jach R, et al. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka jajnika. Medical Art Group 2015.
155. Tanasiewicz M, Skucha-Nowak M, Gibas M, Pawlak J, Wieckiewicz W, Mertas A, et al. The analysis of cytotoxicity of an experimental preparation used for the reduction of dentin hypersensitivity. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2017;26(1):15-22.
156. Litwin Jan A, Gajda M. Podstawy technik mikroskopowych. 978-83-233-3059-2, editor.
157. Shapiro HM, Ulrich H. Cytometry in Malaria: From Research Tool to Practical Diagnostic Approach? *Cytometry Part A*. 2010;77A(6):500-1.
158. Kim H, Moon JY, Mosaddik A, Cho SK. Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich Citrus grandis Osbeck (Dangyuja) leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(8-9):2435-42.
159. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*. 2000;243(1-2):167-90.
160. Jaroszewski M, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*. 1999;11:37-53.
161. Kantorski J. Podstawy cytometrii przepływowej. *Central European Journal of Immunology*. 1996;21:87-93.
162. Nolan JP, Condello D, Duggan E, Naivar M, Novo D. Visible and near infrared fluorescence spectral flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2013;83A(3):253-64.
163. Schmidt I, al. e. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(204-208).

- 164.Kustermann S, Boess F, Bunes A, Schmitz M, Watzele M, Weiser T, et al. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicology in Vitro*. 2013;27(5):1589-95.
- 165.Pan TH, Huang B, Zhang WP, Gabos S, Huang DY, Devendran V. Cytotoxicity assessment based on the AUC(50) using multi-concentration time-dependent cellular response curves. *Analytica Chimica Acta*. 2013;764:44-52.
- 166.Limame R, Wouters A, Pauwels B, Franssen E, Peeters M, Lardon F, et al. Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *Plos One*. 2012;7(10):12.
- 167.Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2001;8(3):303-13.
- 168.Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(2):161-9.
- 169.Knorr D, Zenker M, Heinz V, Lee DU. Applications and ultrasonics in food potential of processing. *Trends in Food Science & Technology*. 2004;15(5):261-6.
- 170.Rocha JDG, Procopio FR, Mendonca AC, Vieira LM, Perrone IT, de Barros FAR, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. *Food Science and Technology*. 2018;38(1):45-53.
- 171.Ishtiaq F, Farooq R, Farooq U, Farooq A, Siddiqu e MS, H., Hassan M, et al. Application of Ultrasound in Pharmaceuticals. *World Applied Science s Journal*. 2009;6 (7)(886-893).
- 172.Da Porto C, Decorti D, Natolino A. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from industrial *Cannabis sativa* L. Inflorescences. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 2014;7 (1):1-14.
- 173.Vijayarathna S, Sasisdharan S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asia Pac J Trop Biomed*. 2012;2 (10):826-9.
- 174.Mahmoud SS, Torchilin VP. Hormetic/Cytotoxic Effects of Nigella sativa Seed Alcoholic and Aqueous Extracts on MCF-7 Breast Cancer Cells Alone or in Combination with Doxorubicin. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013;66(3):451-60.
- 175.Mayer LD. Future developments in the selectivity of anticancer agents: Drug delivery and molecular target strategies. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1998;17(2):211-8.
- 176.Alhazmi MI, Hasan TN, Shafi G, Al-Assaf AH, Alfawaz MA, Alshatwi AA. Roles of p53 and Caspases in Induction of Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells Treated with a Methanolic Extract of Nigella Sativa Seeds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(22):9655-60.
- 177.Tripathi YB, Chaturvedi AP, Pandey N. Effect of Nigella sativa seeds extracts on iNOS through antioxidant potential only: Crude/total extract as molecular therapy drug. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2012;50(6):413-8.
- 178.Costero I, Pomerat CM. CULTIVATION OF NEURONS FROM THE ADULT HUMAN CEREBRAL AND CEREBELLAR CORTEX. *American Journal of Anatomy*. 1951;89(3):405-&.
- 179.Godman GC, Miranda AF, Deitch AD, Tanenbaum SW. ACTION OF CYTOCHALASIN-D ON CELLS OF ESTABLISHED LINES .3. ZEIOSIS AND MOVEMENTS AT CELL-SURFACE. *Journal of Cell Biology*. 1975;64(3):644-67.

- 180.Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26:239-57.
- 181.Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. PHAGOCYTOSIS OF APOPTOTIC NEUTROPHILS DOES NOT INDUCE MACROPHAGE RELEASE OF THROMBOXANE-B2. *Journal of Leukocyte Biology*. 1992;52(3):269-73.
- 182.Ligasova A, Koberna K. Quantification of fixed adherent cells using a strong enhancer of the fluorescence of DNA dyes. *Scientific Reports*. 2019;9:12.
- 183.Zelenin AV, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, Kolesnikov VA, Nikitin SM, et al. 7-AMINO-ACTINOMYCIN D AS A SPECIFIC FLUOROPHORE FOR DNA CONTENT-ANALYSIS BY LASER FLOW-CYTOMETRY. *Cytometry*. 1984;5(4):348-54.
- 184.Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Vanoers MHJ. ANNEXIN-V FOR FLOW CYTOMETRIC DETECTION OF PHOSPHATIDYLSERINE EXPRESSION ON B-CELLS UNDERGOING APOPTOSIS. *Blood*. 1994;84(5):1415-20.
- 185.Cowden R, Curtis S. Microfluorometric investigations of chromatin structure. I. Evaluation of nine DNA-specific fluorochromes as probes of chromatin organization. *Histochemistry*. 1981;72 (1):11-23.
- 186.Finkel E. The mitochondrion: Is it central to apoptosis? *Science*. 2001;292(5517):624-6.
- 187.Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(1):67-71.
- 188.Wang XD. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 2001;15(22):2922-33.
- 189.Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-28.
- 190.Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, GomezMonterrey I, Castedo M, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183(4):1533-44.
- 191.Hearps AC, Burrows J, Connor CE, Woods GM, Lowenthal RM, Ragg SJ. Mitochondrial cytochrome c release precedes transmembrane depolarisation and caspase-3 activation during ceramide-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Apoptosis*. 2002;7(5):387-94.
- 192.Korzeniewska-Dyl I. Kaspazy - struktura i funkcja. *Pol Merk Lek*. 2007;138:403-7.
- 193.Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. FLICE induced apoptosis in a cell-free system - Cleavage of caspase zymogens. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(5):2952-6.
- 194.Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 1999;6(2):99-104.
- 195.Behbehani GK, Bendall SC, Clutter MR, Fantl WJ, Nolan GP. Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle. *Cytometry Part A*. 2012;81A(7):552-66.
- 196.Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. 2003;36(3):131-49.
- 197.Grzelakowska-Sztaber B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem*. 1998;44:8-21.
- 198.Kiliańska Z, Miśkiewicz A. Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom*. 2003;30:129-52.

199. Ng WK, Yazan LS, Ismail M. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. *Toxicology in Vitro*. 2011;25(7):1392-8.
200. Racoma IO, Meisen WH, Wang QE, Kaur B, Wani AA. Thymoquinone Inhibits Autophagy and Induces Cathepsin-Mediated, Caspase-Independent Cell Death in Glioblastoma Cells. *Plos One*. 2013;8(9):10.
201. Salim LZA, Mohan S, Othman R, Abdelwahab SI, Kamalidehghan B, Sheikh BY, et al. Thymoquinone Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukaemia in Vitro. *Molecules*. 2013;18(9):11219-40.
202. Ahmad I, Muneer KM, Tamimi IA, Chang ME, Ata MO, Yusuf N. Thymoquinone suppresses metastasis of melanoma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013;270(1):70-6.
203. Ahmad S, Beg ZH. Elucidation of mechanisms of actions of thymoquinone-enriched methanolic and volatile oil extracts from *Nigella sativa* against cardiovascular risk parameters in experimental hyperlipidemia. *Lipids in Health and Disease*. 2013;12:12.
204. Soltani A, Pourgheysari B, Shirzad H, Sourani Z. Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Activities of Thymoquinone in Lymphoblastic Leukemia Cell Line. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2017;33(4):516-24.
205. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International Journal of Oncology*. 2003;22(1):107-13.
206. Dastjerdi MN, Mehdiabady EM, Iranpour FG, Bahramian H. Effect of Thymoquinone on P53 Gene Expression and Consequence Apoptosis in Breast Cancer Cell Line. *International Journal of Preventive Medicine*. 2016;7:6.
207. Odeh LH, Talib WH, Basheti IA. Synergistic effect of thymoquinone and melatonin against breast cancer implanted in mice. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2018;14:S324-S30.
208. Bang SC, Seo HH, Shin HR, Lee KC, Hoang LTA, Jung SH. A convenient preparation of a disaccharide motif and its role in the cytotoxicity of the triterpenoid saponin, alpha-hederin. *Archives of Pharmacal Research*. 2008;31(5):555-61.
209. Bang SC, Kim Y, Lee JH, Ahn BZ. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana*. *Journal of Natural Products*. 2005;68(2):268-72.
210. Kim Y, Bang SC, Lee JH, Ahn BZ. *Pulsatilla* saponin D: the antitumor principle from *Pulsatilla koreana*. *Archives of Pharmacal Research*. 2004;27(9):915-8.
211. Chwalek M, Lalun N, Bobichon H, Ple K, Voutquenne-Nazabadioko L. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2006;1760(9):1418-27.
212. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
213. Vermes I, Haanen C, Steffensnacken H, Reutelingsperger C. A NOVEL ASSAY FOR APOPTOSIS - FLOW CYTOMETRIC DETECTION OF PHOSPHATIDYLSERINE EXPRESSION ON EARLY APOPTOTIC CELLS USING FLUORESCIEIN-LABELED ANNEXIN-V. *Journal of Immunological Methods*. 1995;184(1):39-51.
214. vanEngeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*. 1996;24(2):131-9.

215. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-811.
216. MacKenzie SH, Clark AC. Targeting cell death in tumors by activating Caspases. *Current Cancer Drug Targets*. 2008;8(2):98-109.
217. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell*. 2004;116(2):205-19.
218. Kroemer G, Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000;6:513-9.
219. Krysko DV, Roels F, Leybaert L, D'Herde K. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001;49(10):1277-84.
220. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*. 2001;26(1):61-6.
221. Verma S, Zhao LJ, Chinnadurai G. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK - Mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(7):4671-6.
222. Lemeshko VV. Theoretical evaluation of a possible nature of the outer membrane potential of mitochondria. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 2006;36(1):57-66.
223. Haridas V, Li X, Mizumachi T, Higuchi M, Lemeshko VV, Colombini M, et al. Avicins, a novel plant-derived metabolite lowers energy metabolism in tumor cells by targeting the outer mitochondrial membrane. *Mitochondrion*. 2007;7(3):234-40.
224. Zou H, Henzel WJ, Liu XS, Lutschg A, Wang XD. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90(3):405-13.
225. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues (vol 264, pg 687, 1999). *European Journal of Biochemistry*. 1999;265(2):847-.
226. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.
227. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. BCL-2 IS AN INNER MITOCHONDRIAL-MEMBRANE PROTEIN THAT BLOCKS PROGRAMMED CELL-DEATH. *Nature*. 1990;348(6299):334-6.
228. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 2011;1813(1):238-59.
229. Khwaja TA, Wajahat T, Ahmad I, Hoessli DC, Walker-Nasir E, Kaleem A, et al. In silico modulation of apoptotic Bcl-2 proteins by mistletoe lectin-1: Functional consequences of protein modifications. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;103(2):479-91.
230. Van Cruchten S, Van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia Histologia Embryologia*. 2002;31(4):214-23.

VIII. WYKAZ ILUSTRACJI I TABEL

Wykaz ilustracji:

Ryc. 1. <i>Nigella sativa</i> , Fot. Anna Adamska.....	17
Ryc. 2. Nasiona <i>Nigella sativa</i> , Fot. Anna Adamska	18
Ryc. 3. Komórki SKOV3 w hodowli, pasaż 38. Powiększenie 100x. Zdjęcie wykonane w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej. Fot. Anna Adamska.....	30
Ryc. 4. Od lewej: płytki E-16, dna studzienek pokryte elektrodami, rozwój komórek na dnie studzienki. (www.roche-applied-sience.com).....	45
Ryc. 5. Profile impedancji RTCA E-płytok zawierających komórki HeLa traktowane siarczanem winblastyny przez 24 godziny w zakresie stężeń 1 – 20 nM.....	48
Ryc. 6. Wartości IC ₅₀ otrzymane dla siarczanu winblastyny po 24- godzinnym traktowaniu komórek HeLa na 6-ciu różnych grupach E-płytok.....	49
Ryc. 7. Minicytometr przepływowy firmy Merck Milli Pore.....	52
Ryc. 8. Schemat działania testu Caspase-Glo 8 and 9 Assay Kits (Promega, USA) wykorzystujący pomiar luminometryczny; źródło: Promega, technical bulletin.	56
Ryc. 9. Średnie wyniki IC ₅₀ dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą systemu RTCA (n=12).	60
Ryc. 10. Średnie wyniki IC ₅₀ dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą testu MTT (n=18).	61
Ryc. 11. Porównanie IC ₅₀ frakcji butanolowej (B) oraz octanu etylu (I) otrzymanych z wodnego ekstraktu pierwotnego metodą RTCA i MTT.	64
Ryc. 12. Porównanie IC ₅₀ frakcji butanolowej (L) oraz octanu etylu (N) z ekstraktu pierwotnego etanolowego 50% (E50) metodą RTCA i MTT.....	66
Ryc. 13. Porównanie IC ₅₀ frakcji butanolowej oraz octanu etylu z ekstraktu pierwotnego etanolowego 50% wspomaganego ultradźwiękami (Es50) metodą RTCA i MTT.	67

Ryc. 14. Chromatogramy HPLC α -hederyny (A) i frakcji N (B) <i>Nigella sativa</i>	71
Ryc. 15. Krzywa kalibracji α -hederyny.....	72
Ryc. 16. Przykładowy diagram przeżywalności komórek linii raka jajnika SKOV-3 po 24-godzinnej inkubacji ze wzrastającymi stężeniami α -HN pozyskany za pomocą analizy systemem RTCA; kontrola – komórki inkubowane z 0,7% DMSO.....	77
Ryc. 17. Krzywe zależności efektu od stężenia uzyskane za pomocą systemu RTCA i testu MTT po traktowaniu komórek SKOV-3 roztworem α -HN stosowanym, odpowiednio, w stężeniach 1-70 i 0,5-50 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Wartości IC_{50} α -HN mierzono na podstawie krzywych zależności efektu od dawki za pomocą systemu Real-Time xCELLigence (A) i testu MTT (B). Odchylenia standardowe są reprezentowane przez słupki błędów.....	78
Ryc. 18. Zawartość [%] populacji komórek SKOV-3 żywych, wczesnoapoptotycznych, późnoapoptotycznych oraz martwych uzyskanych w wyniku działania roztworu frakcji N w zakresie stężeń 30 – 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ przez 24 godziny, kontrola – komórki SKOV-3. .	82
Ryc. 19. Komórki SKOV-3 [%] wczesno- oraz późnoapoptotyczne uzyskane w wyniku działania roztworu frakcji N.	84
Ryc. 20. Diagramy przedstawiające zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu frakcji N; A - kontrola SKOV-3, B – frakcja N 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C - frakcja N 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, D - frakcja N 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, E - frakcja N 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$, F - 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$	85
Ryc. 21. Średnia zawartości [%] komórek depolaryzowanych/żywych w populacji komórek SKOV-3 po inkubacji z roztworem frakcji N.....	87
Ryc. 22. Diagramy przedstawiające zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu frakcji N; A - kontrola SKOV-3, B – frakcja N 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C - frakcja N 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, D - frakcja N 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, E - frakcja N 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, F - frakcja N 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$, G - frakcja N 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$	88
Ryc. 23. Całkowity poziom aktywacji białka Bcl-2 [%] w hodowli komórkowej SKOV-3 pod wpływem działania roztworu frakcji N.	90

Ryc. 24. Diagramy przedstawiające zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu frakcji N; A - kontrola SKOV-3, B – frakcja N 30 µg/ml, C - frakcja N 60 µg/ml, D - frakcja N 80 µg/ml, E - frakcja N 120 µg/ml, F - frakcja N 160 µg/ml, G - frakcja N 320 µg/ml.	91
Ryc. 25. Struktura barwnika Hoechst 33342	92
Ryc. 26. Zmiany apoptotyczne indukowane w komórkach SKOV-3 przez α -hederynę. Strzałki wskazują komórki apoptotyczne.	93
Ryc. 27. Zawartość [%] populacji komórek SKOV-3 żywych, wczesnoapoptotycznych, późnoapoptotycznych oraz martwych uzyskanych w wyniku działania roztworu α -hederyny w zakresie stężeń 0,5 – 30 µg/ml przez 24 godziny.....	96
Ryc. 28. Zawartość [%] populacji komórek wczesno- i późnoapoptotycznych obliczona w porównaniu z grupą komórek kontrolnych 0.3% DMSO	97
Ryc. 29. Diagramy przedstawiające procentową zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu α -hederyny; A - kontrola 0,3% DMSO, B - 0,5, C - 2, D - 10, E - 17, F - 30 µg / ml	98
Ryc. 30. Zawartość populacji komórek zdepolaryzowanych/żywych po inkubacji z roztworem α -hederyny.....	101
Ryc. 31. Diagramy przedstawiające procentową zawartość poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń roztworu α -hederyny; A - kontrola 0,3% DMSO, B - 0,5 µg/ml α -HN, C - 2 µg/ml α -HN, D - 10 µg/ml α -HN, E - 30 µg/ml α -HN.....	102
Ryc. 32. Całkowity poziom [%] aktywacji białka Bcl-2 w hodowli komórkowej SKOV-3 pod wpływem działania roztworu α -hederyny.	104
Ryc. 33. Diagramy przedstawiające poziom aktywacji białka Bcl-2 w hodowli komórek SKOV-3 pod wpływem działania roztworu α -hederyny przez 24 godziny wyrażony procentowo; A – kontrola 0,3% DMSO, B – 0,5 µg/ml α -HN, C – 2,0 µg/ml α -HN, D – 10,0 µg/ml α -HN, E - 17 µg/ml α -HN, F – 30 µg/ml α -HN.....	105

Ryc. 34. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi α -HN w zakresie 0,5 - 30,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.	107
Ryc. 35. Zawartość [%] populacji komórek SKOV-3 wczesno- i późnoapoptotycznych, które poddano działaniu roztworowi α -HN w zakresie 0,5 - 30,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.....	108
Ryc. 36. Diagramy przedstawiające procentowy udział poszczególnych populacji komórek SKOV-3 poddanych działaniu różnych stężeń alfa-hederyny; A – kontrola 0,3% DMSO, B – 0,5 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, C - 2,0 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, D - 10,0 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, E - 17 $\mu\text{g/ml}$ α -HN, F - 30 $\mu\text{g/ml}$ α -HN.	110
Ryc. 37. Analiza cyklu komórkowego komórek SKOV-3 traktowanych przez 24 godziny wzrastającymi stężeniami roztworu α – hederyny.	113
Ryc. 38. Aktywność kaspazy-8 i kaspazy-9 po traktowaniu komórek SKOV-3 roztworem α -hederyny.	115

Spis tabel:

Tabela 1. Wartości IC ₅₀ (nM) siarczanu winblastyny w oparciu o RTCA uzyskane w eksperymentach z komórkami HeLa i E-płytkami użytymi do trzech razy.	47
Tabela 2. Średnie wyniki IC ₅₀ dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą systemu Real-Time xCELLigence (n=12).....	60
Tabela 3. Średnie wyniki IC ₅₀ dla 5-ciu pierwotnych ekstraktów z nasion czarnuszki siewnej uzyskane za pomocą testu MTT (n=18)	61
Tabela 4. Wyniki IC ₅₀ otrzymane metodą RTCA dla frakcji butanolowej – B, octanu etylu – I, przygotowanych z pierwotnego ekstraktu wodnego Aq, (n=12).....	63
Tabela 5. Wyniki IC ₅₀ otrzymane metodą MTT dla frakcji butanolowej – B, octanu etylu – I, przygotowanych z pierwotnego ekstraktu wodnego Aq, (n=12).....	63
Tabela 6. Wyniki IC ₅₀ otrzymane metodą RTCA dla frakcji butanolowej – L, octanu etylu – N, wodnej po octanie etylu – O przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% (E50).....	65
Tabela 7. Wyniki IC ₅₀ otrzymane metodą MTT dla frakcji butanolowej –L, octanu etylu – N, wodnej po octanie etylu – O przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% (E50).	65
Tabela 8. Wyniki IC ₅₀ otrzymane metodą RTCA dla frakcji (butanolowej – T, octanu etylu – S) przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% wspomaganego ultradźwiękami (Es50).	66
Tabela 9. Wyniki IC ₅₀ otrzymane metodą MTT dla frakcji (butanolowej – T, octanu etylu – S) przygotowanych z pierwotnego ekstraktu etanolowego 50% wspomaganego ultradźwiękami (Es50).	67
Tabela 10. Przesunięcia chemiczne ¹ H i ¹³ C NMR w aglikonie.....	73
Tabela 11. Wartości IC ₅₀ dla α-hederyny uzyskane za pomocą systemu RTCA oraz testu MTT dla linii SKOV-3, HeLa i HaCaT.	78

Tabela 12. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi frakcji N w zakresie 30 - 320 µg/ml przez 24 godziny.	82
Tabela 13. Komórki SKOV-3 [%] wczesno- oraz późnoapoptotyczne uzyskane w wyniku działania roztworu frakcji N.	83
Tabela 14. Średnie wartości procentu komórek zdepolaryzowanych/żywych po inkubacji z roztworem frakcji N.	87
Tabela 15. Całkowity poziom aktywacji białka Bcl-2 [%] w hodowli komórkowej SKOV-3.	89
Tabela 16. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi α-HN w zakresie 0,5 - 30,0 µg/ml przez 24 godziny.	95
Tabela 17. Zawartość populacji komórek zdepolaryzowanych/żywych po inkubacji z roztworem α-hederyny.	100
Tabela 18. Całkowity poziom [%] aktywacji białka Bcl-2 w hodowli komórkowej SKOV-3 pod wpływem działania roztworu α-hederyny.	103
Tabela 19. Zawartość [%] poszczególnych populacji komórek SKOV-3 (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne oraz martwe), które poddano działaniu roztworowi α-HN w zakresie 0,5 - 30,0 µg/ml przez 24 godziny.	107
Tabela 20. Zawartość populacji komórek SKOV-3 wczesno- i późnoapoptotycznych, które poddano działaniu roztworowi α-HN w zakresie 0,5 - 30,0 µg/ml przez 24 godziny.	108
Tabela 21. Populacja [%] komórek SKOV-3 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.	113