

Zastosowanie kompozycji farmaceutycznej zawierającej kwas elagowy i/lub kwas galusowy

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji farmaceutycznej zawierającej kwas elagowy i/lub kwas galusowy w leczeniu chorób zwłóknieniowych.

Szacuje się, że choroby o podłożu zwłóknieniowym dotykają corocznie przeszło milion osób i są przyczyną ponad 40% naturalnych zgonów w Europie i Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej [1]. Patologiczne zwłóknienie to efekt przedłużającego się stanu zapalnego, który w wyniku złożonych wieloetapowych procesów związanych z rekrutacją miofibroblastów i reorganizacją macierzy zewnątrzkomórkowej prowadzi często w zmienionych chorobowo narządach do nieodwracalnych zmian, skutkując ich niewydolnością [2]. W skrajnych przypadkach jedyną metodą leczenia zwłóknienia jest przeszczep zaatakowanego narządu [3]. Kluczowym procesem molekularnym leżącym u podłoża chorób zwłóknieniowych jest przemiana komórek śródbłonka mikronaczyń do miofibroblastów, zwana przemianą śródbłonkowo-mezenchymalną (EndMT).

EndMT jest złożonym procesem biologicznym, w którym komórki śródbłonka tracą białka połączeń międzykomórkowych, jak kładyna czy okładyna, i zaczynają przejawiać fenotyp mezenchymalny charakteryzujący się zwiększoną ekspresją specyficznych markerów, N-kadheryny i wimentyny, oraz zapewniającej skurcz komórki α -aktyny mięśni gładkich (α -SMA) [4]. Utracie integralności śródbłonka towarzyszy zanik zdolności komórek do tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Jednocześnie dochodzi do silnego wydłużenia komórek i nabycia przez nie zdolności migracji, niezbędnych miofibroblastom do szybkiego przemieszczania się. Przejawem EndMT jest także przerwanie ciągłości błony podstawnej komórek śródbłonka [5]. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zajście EndMT są cytokiny należące do nadrodziny TGF- β (transformujący czynnik wzrostu-beta), które oddziałując z receptorem TGF- β R typu II powodują jego oddziaływanie z receptorem TGF- β R typu I. W efekcie dochodzi do internalizacji kompleksu receptora TGF- β i aktywacji ścieżek SMAD-zależnych i -niezależnych skutkujących zmianą kształtu i ruchliwości komórki a także ekspresji wymienionych uprzednio markerów białkowych [6].

Konsekwencją ostatniej pandemii koronawirusem SARS-CoV-2 jest znaczny wzrost zmian zwłóknieniowych u pacjentów z rozpoznaniem Covid-19 [7]. Ten osłonkowy RNA wirus, podobnie jak inne koronawirusy, ma cztery białka strukturalne: w tym białko S (ang. spike), odpowiedzialne za interakcję z receptorem na powierzchni komórek oraz białko nukleokapsydu

N (ang. nucleocapsid) pełniące funkcję ochronną dla cząsteczki RNA oraz uczestniczące w modyfikacji procesów komórkowych i replikacji wirusa [8]. Na podstawie analizy *post mortem* tkanki płuc od pacjentów z Covid-19, Huertas i współaut. zaobserwowali charakterystyczne dla EndMT zmiany w morfologii komórek śródbłonka, w tym utratę połączeń międzykomórkowych, zmianę kształtu komórek i przerwanie leżącej poniżej błony podstawnej [9].

W stanie techniki istnieją dowody na przeciwzwłóknieniowe działanie oleju z wyciągów wiesiołka (EPO), bogatego w niezbędne kwasy tłuszczowe z grupy omega-6, szczególnie w kwasy linolowy (LA) oraz gamma-linolenowy (γ -GLA). Wykazano, że EPO wspomaga regenerację serca u szczurów z hipercholesterolemią z zawałem mięśnia sercowego [10]. Leczenie EPO zapobiegło rozwojowi deficytów relaksacji zależnej od śródbłonka u szczurów z cukrzycą, której podstawą są procesy związane ze zwłóknieniem naczyń krwionośnych [11]. Zaproponowano, że preparat EPO może poprawić wyniki leczenia serca z zawałem mięśnia sercowego (MI) w obecności hiperagregacji wywołanej dietą. Podawanie EPO poprawiło obraz elektrokardiograficzny, profil lipidowy surowicy, biomarkery sercowe, a także procent agregacji płytek krwi. Ponadto badania histopatologiczne wykazały znaczne zmniejszenie obszarów zmienionych zwłóknieniowo w tkance serca szczurów. Publikacja ta dostarczyła, także dowodów, że EPO poprawia regenerację serca u szczurów z hipercholesterolemią z zawałem mięśnia sercowego. Opisane właściwości przypisano związkom frakcji olejowej.

W stanie techniki ujawniono, że kilka leków syntetycznych wykazuje potencjalną zdolność do hamowania patologicznego zwłóknienia, będącego efektem EndMT. Wszystkie one, jak dotychczas pozostają obecnie w fazie testów klinicznych. *Nintedanib*, który został dopuszczony do leczenia zwłóknienia płuc, wykazał działanie przeciw przebudowie naczyń w nadciśnieniu płucnym [faza III] [12]. *Macitentan* został zatwierdzony do leczenia zwłóknienia płuc i hamował EndMT pośredniczone przez TGF- β i ET-1 w śródbłonku izolowanym od pacjentów z twardziną układową [faza II] [13]. *Wildagliptyna*, lek stosowany w leczeniu cukrzycy, reguluje EndMT zależne od DPP-4 i wykazuje działanie przeciwzwłóknieniowe w mysim modelu sepsy [faza IV] [14]. *Liraglutyd*, *linagliptyna* i *losartan*, które zostały zatwierdzone do leczenia cukrzycy i jej powikłań, hamowały EndMT u myszy z cukrzycą i powikłania cukrzycowe w modelach mysich [faza II]. Ponadto wykazano, że inhibitor kinazy syntazy glikogenu (GSK), CHIR99021, hamuje EndMT wywołane promieniowaniem w komórkach HUVEC [15-17]. *Imatinib*, antagonistą receptora PDGF, reguluje natomiast EndMT w przebudowie śródbłonka tętnicy płucnej w nadciśnieniu płucnym u szczurów [18].

Celem wynalazku jest więc opracowanie alternatywnego preparatu skutecznego w leczeniu chorób zwłóknieniowych, w tym chorób zwłóknieniowych spowodowanych infekcją koronawirusem SARS-CoV-2.

W stanie techniki istnieje kilka metod pozwalających uzyskać ekstrakt z wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*). Większość z nich bazuje na klasycznej ekstrakcji polegającej na kilkukrotnym zalaniu odpowiednim rozpuszczalnikiem materiału roślinnego i prowadzeniu ekstrakcji w temperaturze pokojowej [19]. Część z tych metod uzyskała patent (PL 215886 B1; PL 169082 B1).

W patencie PL 215886 B1 ujawniono warunki ekstrakcji etanolowej, prowadzonej w ekstraktorze, gdzie nasiona wiesiołka zalewa się 60% etanolem w temperaturze 25-30°C, w ilości 2-2,5 objętości nasion. Po 1 h z ekstraktora usuwa się ekstrakt alkoholowy a wlewa się 1 objętość wody o temperaturze 25-30°C. Po kolejnej godzinie usuwa się z ekstraktora ekstrakt wodny. Ekstrakcję wodną powtarza się czterokrotnie. Ekstrakty wodne łączy się (co daje razem ok. 4 objętości ekstraktów wodnych oraz 1 objętość ekstraktu alkoholowego) a następnie ekstrakty te zateżają się przy użyciu wyparki próżniowej, oddzielnie ekstrakt alkoholowy (poprzez dwukrotne zateżanie) i ekstrakt wodny (poprzez 3-4 krotne zateżanie). W celu przygotowania wyciągów i frakcji pozyskany surowy preparat polifenolowy ekstrahowano ponownie z wykorzystaniem a) wody (2x100 mL), b) 60% etanolu (v/v 2x100 mL), c) izopropanolu (2x100 mL) d) 30% izopropanolu (v/v 2x100 mL), a także przeprowadzono frakcjonowanie uzyskanego 30% izopropanolowego preparatu octanem etylu [20]. Przedmiotem wynalazku wspomnianego patentu jest zastosowanie ekstraktu z odtłuszczonych nasion wiesiołka do wytwarzania środka do zapobiegania uszkodzeniu lub ograniczenia uszkodzenia mięśnia sercowego i naczyń wieńcowych. Na podstawie opisanych w niniejszym patencie sposobów otrzymywania ekstraktów polifenolowych z odtłuszczonych nasion wiesiołka ukazały się jawne publikacje z ich wykorzystania w kontekście właściwości przeciwnowotworowych. Prace te dotyczą tylko czerniaka skóry [21, 22].

Do innych jawnych informacji należą prace naukowe, które omawiają klasyczny rodzaj ekstrakcji surowych wyciągów z wiesiołka dziwnego w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem 70% wodnego etanolu oraz sposób jego frakcjonowania octanem etylu (EPFP). Ekstrakcja polegała na zalewaniu wyciągów rozpuszczalnikiem i ekstrahowaniu ekstraktu w trzech transzach (dwie ekstrakcje po 30 minut w stosunku 1:10 (w/v) masy materiału do porcji objętościowej rozpuszczalnika, trzecia 15 minutowa w stosunku 1:5 (w/v)). Pełen ekstrakt EPE (70% etanolowy) był badany w raku jelita grubego [23] w kontekście

analizy cyklu komórkowego i apoptozy, natomiast jego właściwości przeciwinwazyjne analizowano tylko w raku piersi i raku prostaty [24].

W publikacji Katarzyna Owczarek et al. [25] ujawniono, że preparat flawanolowy (EPFP) z poprodukcyjnych wyłoków z nasion wiesiołka dziwnego otrzymany zgodnie ze sposobem według patentu PL 169082 B1, polegającym na dwukrotnej ekstrakcji 90% wodnym roztworem acetonu w temperaturze pokojowej, każda po 30 minut, wykazuje działanie cytotoksyczne oraz antymetastatyczne w stosunku do komórek ludzkiego raka jelita grubego.

W przedmiotowym zgłoszeniu przedstawiony został innowacyjny sposób pozyskiwania ekstraktu, różniący się od dotychczasowych. Opiera się on na wykorzystaniu aparatu Soxhleta, który składa się z kolby okrągłodennej, działającego na zasadzie przelewowego ekstraktora oraz kolumny chłodniczej, która zwrotnie skrapla parujący rozpuszczalnik. Metoda służy do ekstrakcji trudno rozpuszczalnych związków i z powodzeniem jest stosowana w przypadku materiału pochodzenia roślinnego [26]. Materiał roślinny pochodzi z firmy Agrofarm S.A w Tuszynie i jest odpadem poprodukcyjnym pozostającym po tłoczeniu oleju z nasion wiesiołka dziwnego.

Zastosowanie EPE pozwala na wykorzystanie naturalnego ekstraktu roślinnego stanowiącego odpad przemysłowy otrzymywany w procesie tłoczenia oleju jadalnego. Proces ekstrakcyjny umożliwia wtórne wykorzystanie bio-odpadu, a obecne w nim związki (szczególnie z grupy polifenoli) odpowiadają za jego cenne właściwości czyniąc go niezwykle atrakcyjnym z terapeutycznego punktu widzenia.

Warunkiem pozyskania ekstraktu roślinnego zawierającego pojedynczy składnik - kwas galusowy (GA) lub kwas elagowy (EA), jest naturalna zawartość w przeważającej ilości pochodnych tych kwasów, odpowiednio galotanin i elagotanin. Galotaniny to estryfikowane kwasem galusowych reszty glukozy. Z kolei najprostsze elagotaniny to estry polioliu i kwasu heksahydroksydifenowego, który w warunkach wodnych ulega laktonizacji właśnie do kwasu elagowego. Podczas hydrolizy elagotanin dochodzi do uwolnienia glukozy i kwasu elagowego.

Dotychczasowe metody pozyskiwania kwasu galusowego (GA) z materiału roślinnego bogatego w pochodne galusowe tanin opierały się na zastosowaniu tanazy, enzymu odpowiedzialnego za enzymatyczną hydrolizę galotanin. Materiał roślinny poddawany jest fermentacji ze szczepami drobnoustrojów, które produkują enzym tanazy [27]. Współczesne metody izolowania kwasów fenolowych (zarówno GA jak i EA) opierają się na zastosowaniu odpowiednich procesów ekstrakcyjnych z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych, których działanie wspomagane jest m.in. ultradźwiękami bądź falami mikro o częstotliwości

30-300 MHz [28,29]. Procedura ekstrakcyjna obejmuje ekstrakcję z materiału roślinnego w odpowiednio dobranych warunkach temperaturowych, z zastosowaniem odpowiedniego rozpuszczalnika oraz jego ilości w stosunku do masy wyjściowej materiału [30]. Optymalne warunki ekstrakcyjne kwasu elagowego przedstawiono na przykład dla łusek z owocu granatu (odpad poprodukcyjny pozyskiwany podczas produkcji soku) to 2-godzinna ekstrakcja 60% etanolem. Kolejnym etapem jest kwaśna hydroliza przeprowadzona z zastosowaniem kwasu siarkowego (H_2SO_4), w stałych warunkach temperaturowych w łaźni olejowej w temperaturze $105^\circ C$. Warunkiem krytycznym procesu hydrolizy jest odpowiednie stężenie H_2SO_4 (5% v/v) oraz czas prowadzonej hydrolizy (5 godzin). Uzyskany preparat poddaje się następnie rekrytalizacji w metanolu (30 mL/g), przez 2 godziny w temperaturze $45^\circ C$ co wpływa na skuteczne oczyszczenie preparatu kwasu elagowego (czystość substancji na poziomie 90%). Wydajność procesu ekstrakcyjnego to uzyskanie 3,5 g kwasu elagowego ze 100 g masy wyjściowej łusek [31].

Przykładem pozyskania kwasu elagowego jest ekstrakcja przeprowadzona m.in. z łusek z owocu granatu [31] zaś kwasu galusowego z liści drzewa eukaliptusowego [32], czy sodówki (*Suaeda gauca* Bge) [33].

Jedną z metod oczyszczania preparatu ekstrakcyjnego jest stosowanie 95% wodnego etanolu, w celu wymycia nierozpuszczalnych w alkoholu związków. Wykazano, że zastosowanie kolumnienek adsorpcyjnych typu Sephadex LH-20, sprzyja procesowi frakcjonowania i skutecznie rozdziela taniny od niskocząsteczkowych fenoli. Złoże Sephadex LH-20 wiąże taniny rozpuszczone w alkoholu i uwalnia je w momencie przemywania wodnym roztworem acetonu (50-70% v/v) (metoda Hagermana, 2002) [32,34]. W procesie wyżej opisanego frakcjonowania uzyskuje się frakcję kwasów fenolowych oraz kolejne elucje związków taninowych.

Otrzymywanie ekstraktu z poprodukcyjnych wyłoczyn z wiesiołka dziwnego metodą Soxhleta korzystnie wpływa na izolację prostych kwasów fenolowych (w tym mieszaniny kwasu galusowego i elagowego) ze związków taninowych. Wysokocząsteczkowe taniny (zarówno galotaniny jak i elagotaniny) uznawane są za związki antyżywniowe ze względu na zdolność tworzenia makrokompleksów z białkami, które nie są łatwostrawne i nie nadają się do spożycia. Ponadto, taniny wpływają na kompleksowanie witamin m.in. witaminy A i B12 oraz soli mineralnych, wpływając na ich przyswajalność w organizmie. W związku z powyższym, ekstrakcja fenoli niskocząsteczkowych jako produktów hydrolizy (rozpadu) tanin korzystnie wpływa na skład mieszaniny ekstrakcyjnej, która ze względu na obecność

wartościowych kwasów fenolowych (GA i EA) z powodzeniem może być stosowana jako suplement diety.

W stanie techniki ujawniono sposoby wytwarzania kompozycji farmaceutycznych zawierających związki polifenolowe. Przykładowo w publikacji Belščak-Cvitanović A, Stojanović R, Manojlović V, et al.: „Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion”; Food Research International (Ottawa, Ont.); 2011 May; 44(4):1094-1101; DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.030, ujawniono sposób enkapsulacji ekstraktu z liści maliny właściwej, głogu dwuszyjkowego, bluszczu kurdybanka, krwawnika pospolitego, pokrzywy zwyczajnej i oliwki europejskiej.

Dotychczas nie pojawiły się doniesienia wskazujące, że ekstrakty z odtłuszczonych nasion wiesiołka dziwnego wykazują działanie przeciwzwłóknieniowe. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* pozwoliły zaobserwować potencjalne właściwości polifenolowego ekstraktu z wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*) w zwrotnej transformacji efektów EndMT.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna zawierająca kwas elagowy i/lub kwas galusowy do zastosowania w leczeniu chorób zwłóknieniowych.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna jest w postaci proszku, granulatu, tabletki, pastylki, kapsułki, roztworu, zawiesiny, emulsji lub ekstraktu.

Korzystnie ekstraktem jest polifenolowy ekstrakt z poprodukcyjnych wyłoków z nasion wiesiołka.

Korzystnie ekstrakt pozyskuje się z wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*).

Korzystnie ekstrakt jest ekstraktem płynnym, gęstym lub suchym.

Korzystnie zawartość kwasu elagowego w ekstrakcie suchym wynosi co najmniej 7% wag.

Korzystnie zawartość kwasu galusowego w ekstrakcie suchym wynosi co najmniej 5% wag.

Korzystnie ekstrakt suchy zawiera co najmniej 20% wag. związków polifenolowych, w przeliczeniu na kwas galusowy.

Korzystnie chorobą zwłóknieniową jest choroba wybrana z grupy obejmującej przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, zwłóknienie płuc, zwłóknienie nerek, zwłóknienie serca, nadciśnienie wrotne, twardzina układowa, cukrzycowe śródmiąższowe zwłóknienie nerek i miażdżycę tętnic.

Korzystnie choroba zwłóknieniowa jest spowodowana infekcją koronawirusem SARS-CoV-2.

Krótki opis figur

Fig. 1 przedstawia chromatogram profilu wybranych polifenoli w badanym ekstrakcie EPE oznaczonych metodą LC-TripleTOF 5600+ MS w jonizacji pozytywnej (A) i w jonizacji negatywnej (B). 1. kwas kawowy, 2. katechina, 3. kwercetyna, 4. kwas elagowy, 5. galusan epikatechiny 6. procjanidyna B2, 7. kwas galusowy, 8. penta-*O*-galoilo- β -D-glukoza.

Fig. 2 przedstawia stymulujący wpływ EPE na tworzenie kapilar przez linie komórkowe śródbłónka (A. HUVEC, B. HMEC-1) oraz hamujący wpływ EPE na zdolności migracyjne linii śródbłónka (C. HUVEC, D. HMEC-1) indukowanych do przemiany EndMT.

Istotność statystyczna pomiędzy grupami została potwierdzona w oparciu o analizę Anova z testowaniem post hoc Tukeya, gdzie *** $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Fig. 3 przedstawia stymulujący wpływ kwasu galusowego (GA) na tworzenie kapilar przez linie komórkowe śródbłónka (A. HUVEC, B. HMEC-1) oraz hamujący wpływ EPE na zdolności migracyjne linii śródbłónka (C. HUVEC, D. HMEC-1) indukowanych do przemiany EndMT.

Istotność statystyczna pomiędzy grupami została potwierdzona w oparciu o analizę Anova z testowaniem post hoc Tukeya, gdzie *** $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Fig. 4 przedstawia stymulujący wpływ kwasu elagowego (EA) na tworzenie kapilar przez linie komórkowe śródbłónka (A. HUVEC, B. HMEC-1) oraz hamujący wpływ EPE na zdolności migracyjne linii śródbłónka (C. HUVEC, D. HMEC-1) indukowanych do przemiany EndMT.

Istotność statystyczna pomiędzy grupami została potwierdzona w oparciu o analizę Anova z testowaniem post hoc Tukeya, gdzie *** $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Wynalazek został dokładniej wyjaśniony na przykładach, które jednak nie ograniczają jego zakresu.

Przykłady wykonania

Przykład 1

Sposób otrzymywania ekstraktu polifenolowego

Warunki ekstrakcji zostały zoptymalizowane pod kątem temperatury, w której prowadzony jest proces, użytego rozpuszczalnika (60% wodny roztwór izopropanolu) oraz czasu ekstrakcji. Wytloki przed ekstrakcją poddawane były dwukrotnemu mieleniu, odważane w ilości 50 g i wsypywane do specjalnej gilzy, którą następnie umieszczano w aparacie Soxhleta. Tak przygotowane wytloki ekstrahowano 60% izopropanolem (stosunek wytlóków do rozpuszczalnika 1:6 w/v) wprowadzanym do kolby, którą następnie podgrzewano do

temperatury wrzenia rozpuszczalnika (105°C). Zasada działania tego typu ekstrakcji polega na tym, że opary wrzącego w kolbie rozpuszczalnika są schładzane w aparacie Soxhleta dzięki kolumnie chłodniczej i przechodząc przez gilzę ekstrahują materiał zawarty w gilzie. Ekstrahowany odpowiednią objętością rozpuszczalnika ekstrakt zawracany jest do kolby i ponownie podgrzewany celem ciągłej ekstrakcji. W przypadku ekstraktu badanego pod kątem właściwości przeciwinwazyjnych ekstrakcja prowadzona była przez 24 godziny. Tak uzyskany ekstrakt zatężony był porcjami w rotacyjnej wyparce próżniowej w temperaturze 65°C, w celu pozbycia się rozpuszczalnika. Tak zatężony preparat był rozpuszczany w wodzie miliQ (150 mL), poddawany wymrażaniu na szalkach Petriego przez 24 godziny w temperaturze -80°C i przeprowadzany dwustopniowo do formy liofilizatu pod zmniejszonym ciśnieniem w ciągu kolejnych 24 godzin. Otrzymana forma sucha i sypka, zamknięta szczelnie w postaci proszku, umożliwia jego przechowywanie w warunkach chłodniczych tj. w temperaturze 4°C. Całkowita ilość polifenoli w badanym ekstrakcie wyniosła $208,24 \pm 8,92$ mg/g suchego ekstraktu, w przeliczeniu na kwas galusowy (wg. metody Folin-Ciocalteu opisanej poniżej), co odpowiada zawartości polifenoli wynoszącej 20,82 %.

Przykład 2

Sposób oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli w badanym ekstrakcie

Oznaczenia związków polifenolowych w analizowanym ekstrakcie wykonano metodą Folina-Ciocalteu wg Maurya S. [18] z drobnymi modyfikacjami [19]. 2,5 mL odczynnika Folina-Ciocalteu (10-ciokrotnie rozcieńczonego w wodzie destylowanej) dodano do 0,5 mL badanego ekstraktu o stężeniach 100 i 50 $\mu\text{g/mL}$ w dwóch powtórzeniach. Następnie dodano 2 mL 7,5% roztworu węgla sodu (w/v) i całość inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Krzywą wzorcową przygotowano na podstawie szeregu stężeń kwasu galusowego (12,5-200 $\mu\text{g/mL}$) używanego jako standardu i przeprowadzono analogiczne oznaczenie z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu. Kolorymetryczny pomiar produktu reakcji został wykonany spektrofotometrycznie przy długości fali 765 nm. Następnie na podstawie absorbancji wyznaczono krzywą wzorcową kwasu galusowego w zależności od stężeń ($A=f(C)$, gdzie A-absorbancja, C-stężenie $\mu\text{g/mL}$) i odczytano wartości stężenia polifenoli w badanych próbach ekstraktu. W wyniku przeliczeń stężeń na 1 g suchego ekstraktu uzyskano stosowne wyniki ilościowe polifenoli w badanych próbach.

Przykład 3

Sposób analizy jakościowej i ilościowej ekstraktu polifenolowego

Otrzymany ekstrakt został poddany analizie jakościowej oraz ilościowej z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS; microLC-200, Eksigent, USA; TripleTOF 4600 oraz 5600+, AB SCIEX, USA) wg. metody [20] z modyfikacjami. Ekstrakt do oznaczenia odważono w ilości 1 mg i rozpuszczono w 1 mL 20% metanolu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego. Rozcieńczony i przefiltrowany przez filtr membranowy (0,2 μm) ekstrakt nastrzyknięto w ilości 2 μL na kolumnę HALO C18 (2,7 μm średnica cząstek; 0,5 x 50 mm Eksigent, USA).

Rozdziału związków na poszczególne polifenole wykonano w systemie gradientowym wykorzystując fazy mobilne A i B, odpowiednio wodę i acetonitryl, zawierające 0,9% kwasu mrówkowego. Przepływ ustawiono na 15 mL/min przez 5 minut w następującym gradiencie: 5% B przez 0,5 min, 5-90% B w 2,5 min, 90% B przez 0,8 min, 90-5% B w 0,2 min oraz 5% B przez 1,0 min. Do detekcji wykorzystano spektrometr masowy wyposażony w detektor kwadropolowy czasu przelotu (QTOF) zjonizowanych cząstek zarówno w jonizacji negatywnej jak i pozytywnej elektrospreju (ESI). Napięcie na jonizatorze wynosiło +/-4.5 kV, temperatura źródła jonów i kolumny wynosiły odpowiednio 350 i 45°C. Dokładność mas została ustalona do czwartego miejsca po przecinku i weryfikowana z wykorzystaniem wewnętrznego systemu kalibracji (CDS) wykorzystującego standardowe związki kalibracyjne do systemu MS APCI, Bioanalytic.

Skanowanie MS oraz zbieranie danych zostało ustalone w zakresie 100-1250 m/z, natomiast fragmentacji jonów MS/MS dokonano z wykorzystaniem energii kolizyjnej +/-30 eV. Do oznaczenia jakościowego i ilościowego wykorzystano związki wzorcowe, a na podstawie wyznaczonych krzywych kalibracyjnych oznaczono stężenie wybranych polifenoli. Dane zebrano w programie Analyst® TF 1.6 Software (AB SCIEX). Analizę danych przeprowadzono z zastosowaniem programu PeakView 2.0 (AB SCIEX), a analizę ilościową przeprowadzono w programie MultiQuant 3.0. Przykładowy chromatogram obrazujący rozdział badanego ekstraktu jak również jakościowy i ilościowy jego skład przedstawiono odpowiednio na Fig. 1 oraz w Tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Analiza jakościowa EPE z zastosowaniem metody LC-TripleTOF 4600+ MS. [oznaczenia: a Liczba porządkowa; b Czas retencji; c Przypisana nazwa; d Masa cząsteczkowa; e Dokładność masy detekcji zjonizowanych cząstek; f Przypisanie do grupy chemicznej polifenoli; g Jony fragmentacyjne uzyskane w widmach skanowania MS/MS].

| Np. a | tr (min) b | Nazwa związku ^c | MW ^d | [M-H] ⁻ (m/z) ^e | Grupa chemiczna | Jony fragmentacyjn e MS/MS (m/z) ^g |
|----------|------------------|--|-------------------|--|---------------------------|---|
| 1. | 0,52 | Kwas galusowy | 170,12 | 169,0134 | Kwas fenolowy | 125,0235; 107,0136 |
| 2. | 0,52 | Kwas kawowy | 180,16 | 179,0546 | Kwas fenolowy | 161,0432; 89,0238 |
| 3. | 0,53 | Digaloiilglukoza | 484,37 | 483,0782 | Hydrolizowaln e taniny | 331,0660; 313,0562; 169,0136 |
| 4. | 0,58 | Dimer procyjanidyny | 578,52 | 577,1369 | Flawan-3-ol | 451,1028; 425,0867; 289,0706 |
| 5. | 0,91 | Katechina | 290,26 | 289,0708 | Flawan-3-ol | 245,0805; 109,0292 |
| 6. | 0,98 | Pentozyd kwercetyny | 434,09 | 433,1120 | Flawonole | 343,0803; 181,0496 |
| 7. | 1,06 | Kwas protokatechowy | 154,12 | 152,9175 | Kwas fenolowy | 135,9133; 122,0367; 109,0291 |
| 8 | 1,10 | Tetramer procyjanidyny | 1154,36 | 1153,269 2 | Flawon-3-ol | 863,1865; 575,1145; 287,0532 |
| 9 | 1,16 | Trimer procyjanidyny | 866,21 | 865,1989 | Flawan-3-ol | 695,1420; 577,1371; 287,0514 |
| 10 | 1,20 | Galusan trimeru procyjanidyny | 1018,34 | 1017,218 4 | Flawan-3-ol | 865,2041; 287,0569 |
| 11. | 1,21 | Kwercetyna/kwas elagowy | 302,24/302,2 0 | 300,9980 | Kwas fenolowy | 286,0818; 257,0354 |
| 12. | 1,28 | Penta-O-galloilo-β-D-glukoz a | 940,68 | 939,1179 | Hydrolizowaln e taniny | 787,1009; 769,0939; 617,0820 |
| 13. | 1,32 | Galusan dimeru procyjanidyny | 730,15 | 729,1476 | Flawan-3-ol | 577,1382; 559,1232; 407,0792; 287,0707 |
| 14. | 1,64 | Tetragalloilglukoza | 788,60 | 787,1025 | Hydrolizowaln e taniny | 617,0801; 465,0645; 295,0421 |

Tabela 2. Analiza ilościowa EPE. Oznaczenie TPC metodą kolorymetryczną Folin-Ciocalteua^a oraz ilościowe oznaczenie poszczególnych polifenoli metodą LC-TripleTOF 5600+ MS^b.

| Analiza spektrofotometryczna (n=3)^a | | | |
|---|----------------------|-------------|-------------|
| Całkowita zawartość polifenoli [mg/g] | | 208,24±8,92 | |
| Analiza mikroLC-QTOF-MS (n=3)^b | | | |
| Związek | t_R | m/z | mg/g |
| kwasy galusowy | 0,97 | 169,0250 | 51,40±0,13 |
| Katechina | 2,03 | 289,0898 | 23,23±0,09 |
| procjanidyna B2 | 2,05 | 577,1700 | 0,98±0,28 |
| kwasy kawowy | 2,19 | 179,0675 | 1,31±0,02 |
| penta-O-galloylo-β-D-glukoza | 2,23 | 939,1704 | 3,70±0,06 |
| galusan epigalokatechiny | 2,29 | 441,1094 | 3,96±0,01 |
| kwasy elagowy | 2,3 | 301,0181 | 77,67±0,48 |

W poniższych przykładach przeprowadzono analizę w oparciu o zastosowanie komórek śródbłonna indukowanych do przemiany EndMT.

Użyto komórek HUVEC izolowanych z żyły pępowinowej i HMEC-1 – komercyjnie dostępnej linii komórek izolowanych ze śródbłonna mikronaczyń. W komórkach tych indukowano przemianę EndMT za pomocą stymulowania ich czynnikiem TGF-β (inkubacja z 5μM przez 48h) lub za pomocą białka wirusa SARS-CoV-2 (białka otoczki (białka S) lub nukleokapsydu (białko N), inkubacja z 1 μg/mL przez 48 h). Następnie komórki z wyindukowaną przemianą EndMT hodowano przez 48 godzin w obecności EPE i przeprowadzono szereg testów określających zdolność EPE (jak i jego pojedynczych składników) do odwrócenia przemiany EndMT.

W pierwszym etapie badań oznaczono poziom markerów śródbłonkowych (klaudyna, okludyna) i mezenchymalnych (N-kadheryna, wimentyna) oraz charakterystycznego dla miofibroblastów białka kurczliwego α-SMA (α-aktyny mięśni gładkich). W tym celu zebrane komórki poddano lizie buforem M-PER (Thermo Scientific, USA), uzyskując mieszaninę białek, którą analizowano metodą Western blot, wykorzystując system Bolt Bis-Tris Plus system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Uszczegółowiając, białka rozdzielono w gradientowym żelu poliakrylamidowym (4-20%), po czym transferowano na membranę nitrocelulozową (Amersham™ Protran™ 0,45 μm, GE Healthcare, Niemcy). Następnie

membranę inkubowano w buforze blokującym zawierającym 2% albuminę wołową zawieszoną w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (2% BSA w PBS) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie membranę przeniesiono do roztworu zawierającego specyficzne przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające odpowiednio badane białka (rozcieńczone według danych producenta w 2% BSA w PBS) i pozostawiono na noc w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał w buforze 2% BSA w PBS z 0,05% Tween-20, membrany umieszczono w roztworze przeciwciał drugorzędowych związanych z peroksydazą chrzanową (Dako, Wielka Brytania) w 2% BSA w PBS i pozostawiono na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Detekcję białek prowadzono z zastosowaniem zestawu do chemiluminescencji SuperSignal West Pico Plus (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Sygnał rejestrowano na kliszy fotograficznej (Agfa HealthCare, Belgia), którą następnie skanowano w skanerze HP Scanjet G4050 scanner (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Intensywność zaciernienia powstałych na kliszach prążków analizowano w programie ImageJ (wersja 1.53). Uzyskane wyniki normalizowano względem białka referencyjnego – dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH).

W kolejnej części badań określono zdolność tworzenia kapilar przez hodowane w obecności EPE komórki śródbłonna linii HMEC-1 lub HUVEC indukowane do przemiany EndMT w warunkach jak wyżej. Zebrane komórki wysiano na Matrigel (Corning, NY, USA, komercyjnie dostępną mieszaninę białek macierzy zewnątrzkomórkowych) i inkubowano przez 6 godzin w inkubatorze o stałych parametrach stężenia CO₂ (5%) oraz temperatury (37°C). Analizę wykonano w oparciu o pomiar całkowitej długości tworzonych kapilar komórek w programie ImageJ (wersja 1.53), na zdjęciach uzyskanych w trakcie przyżyciowej obserwacji komórek za pomocą systemu EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA, USA). Jednocześnie oznaczono szybkość migracji tychże komórek. W tym celu komórki śródbłonna linii HMEC-1 lub HUVEC indukowane do przemiany EndMT hodowano w obecności EPE do uzyskania 90-100% konfluencji po czym za pomocą końcówki (20-200 µL) do pipety wykonano rysę i odmyto oderwane komórki świeżym medium hodowlanym. Zmiany szerokości rysy obserwowano w mikroskopie EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA, USA) co 2 godziny w czasie 12 godzin, a obserwowane obrazy utrwalano na zdjęciach. Stopień zarastania rysy analizowano za pomocą programu ImageJ wyliczając szybkość migracji frontu rysy (wersja 1.53).

Przykład 4

Testowanie wpływu ekstraktu EPE na poziom markerów śródbłonkowych i mezenchymalnych w analizowanych komórkach śródbłonka poddanych przemianie EndMT.

Komórki HUVEC lub HMEC-1 zostały wysiane na płytce 6-dołkową i po indukcji EndMT (5 μ M TGF- β lub 1 μ g/mL białka S lub 1 μ g/mL białka N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności 20 μ g/mL EPE przez 48 godzin. Po tym czasie z komórek przygotowano lizaty, które poddano analizie metodą Western blot. Zaobserwowano, że inkubacja komórek śródbłonka w obecności EPE (2 mL w stężeniu końcowym 20 μ g/mL) skutkuje spadkiem poziomu markerów mezenchymalnych. W komórkach HUVEC najsilniej zaznaczone zmiany obserwowano dla N-kadheryny - 3,5-krotny spadek poziomu białka w każdym badanym modelu. Natomiast spadki poziomu wimentyny wyniosły od 1,8-krotnego dla modelu stymulacji EndMT za pomocą białka S lub N wirusa SARS-CoV-2 do 2,5-krotnego w przypadku stymulacji TGF- β . Spadek poziomu markera miofibroblastów α -SMA był około 3,0-krotny we wszystkich analizowanych modelach badawczych EndMT. W komórkach linii HMEC-1 wpływ EPE był nieznacznie słabszy. W przypadku N-kadheryny wahał się od 2,8-krotnego spadku poziomu białka dla modelu indukowanego TGF- β przez 2,5-krotny spadek poziomu dla modelu indukowanym białkiem S po 1,9 spadku poziomu dla modelu indukowanym białkiem N. Największy 2,3-krotny spadek poziomu wimentyny zanotowano w modelu stymulacji za pomocą TGF- β . Natomiast w przypadku modeli indukowanych białkami wirusa SARS-CoV-2 spadek poziomu wimentyny był około 1,5-krotny. Zmiany poziomu α -SMA kształtował od 2,6-krotnego spadku dla modelu indukowanego TGF- β , przez około 2,0-krotny spadek w modelu indukowanym białkiem S do 1,5-krotnego spadku w modelu indukowanym białkiem N (Tabela 3). W przypadku markerów śródbłonka zaobserwowano znaczący wzrost wybranych biomarkerów w hodowlach komórek w obecności EPE, a zmiany były podobne w obu modelach komórkowych HUVEC i linii HMEC-1. Uszczegółowiając, w przypadku kładyny obserwowaliśmy przeszło 1,8-krotny wzrost poziomu białka w komórkach w których EndMT indukowano za pomocą TGF- β i około 1,5-krotny wzrost poziomu białka, gdy EndMT indukowała obecność w medium białko wirusa N lub w przypadku okładyny wzrosty dla obu typów komórek wynosiły około 1,6 przy stymulacji EndMT TGF- β lub białkiem S i około 1,3 przy stymulacji EndMT białkiem N (Tabela 3).

Tabela 3 przedstawia modulujący wpływ EPE na poziom markerów śródbłonkowych i mezenchymalnych w komórkach HUVEC i HMEC-1 indukowanych do przemiany EndMT. Istotność statystyczna pomiędzy grupami została potwierdzona w oparciu o analizę Anova z testowaniem post hoc Tukeya, gdzie *** $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

| Markery śródbłonkowe | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|--------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| Linia komórkowa | HUVEC | | | | | | HMEC-1 | | | | | |
| Stymulacja EndMT | TGF-β | | Białko N | | Białko S | | TGF-β | | Białko N | | Białko S | |
| Traktowanie | - | EPE | - | EPE | - | EPE | - | EPE | - | EPE | - | EPE |
| <i>N-kadheryna</i> | 3,21 | 0,91 *** | 3,03 | 0,85 *** | 2,85 | 0,82 *** | 2,99 | 1,06 *** | 2,35 | 1,24 ** | 2,69 | 1,08 *** |
| <i>wimentyna</i> | 2,43 | 0,97 *** | 2,26 | 1,28 *** | 2,15 | 1,23 *** | 2,79 | 1,24 *** | 2,29 | 0,84 *** | 2,03 | 1,37 ** |
| <i>α-SMA</i> | 2,71 | 0,90 *** | 1,86 | 0,61 *** | 2,84 | 0,92 *** | 2,84 | 1,08 *** | 2,37 | 1,59 ** | 2,91 | 1,48 ** |
| Markery mezenchymalne | | | | | | | | | | | | |
| Linia komórkowa | HUVEC | | | | | | HMEC-1 | | | | | |
| Stymulacja EndMT | TGF-β | | Białko N | | Białko S | | TGF-β | | Białko N | | Białko S | |
| Traktowanie | - | EPE | - | EPE | - | EPE | - | EPE | - | EPE | - | EPE |
| <i>Kludyna</i> | 0,51 | 0,91 *** | 0,61 | 0,92 ** | 0,77 | 1,16 *** | 0,21 | 0,36 * | 0,47 | 0,62 ** | 0,37 | 0,56 ** |
| <i>Okludyna</i> | 0,81 | 1,29 ** | 1,08 | 1,40 ** | 0,98 | 1,23 * | 0,86 | 1,37 ** | 1,21 | 1,54 ** | 0,99 | 1,27 ** |

Przykład 5

Testowanie wpływu ekstraktu EPE na zdolność tworzenia kapilar przez komórki śródbłonka poddanych przemianie EndMT.

Sprawdzono czy ekstrakt EPE będzie regulował zdolność komórek do tworzenia kapilar – cechy charakterystycznej dla komórek śródbłonka, którą ztracają w procesie przejścia EndMT. Tworzenie kapilar oznaczono w oparciu o pomiar całkowitej długości tworzonych połączeń międzykomórkowych, tzw. kapilar. Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytkę 6-dołkową i po indukcji przemiany EndMT (5 μM TGF-β, 1 μg/mL białka S lub 1 μg/mL N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności EPE (2 ml w stężeniu końcowym 20 μg/mL) przez 48 godzin. Po tym czasie zebrano komórki i przesiano na płytkę 12-dołkową pokrytą Matrigel. Zaobserwowano, że w przypadku komórek śródbłonka zastosowanie wskazanej dawki EPE powodowało prawie 2,5-krotny wzrost całkowitej długości

kapilar (tj. średnio z 6,57 μm do 16,25 μm w przypadku linii HMEC-1 i 8,4 μm do 20,4 μm w HUVEC) w przypadku stymulacji EndMT pomocą TGF- β oraz około 2-krotny wzrost w przypadku komórek stymulowanych białkami N (tj. średnio z 7,5 μm do 15,11 μm w przypadku linii HMEC-1 i 10,1 μm do 20,3 μm w HUVEC) lub S (tj. średnio z 7,99 μm do 15,97 μm w przypadku linii HMEC-1 i 8,4 μm do 20,51 μm w HUVEC). Wyniki dla HUVEC przedstawiono na Fig. 2A dla linii HMEC-1 Fig. 2B.

Przykład 6

Testowanie wpływu ekstraktu EPE na szybkość migracji komórek śródbłonka poddanych przemianie EndMT.

Analizowano czy ekstrakt EPE wpływała na szybkość migracji komórek śródbłonka. Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytce 12-dołkowej i po indukcji przemiany EndMT (5 μM TGF- β , 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ białka S lub 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności EPE przez 48 godzin do pełnej konfluencji. Po tym czasie wykonano rysę za pomocą końcówki (20-200 μL) do pipety automatycznej. Szybkość zarastania rysy obserwowano co 2 godziny w czasie 12 godzin, a obserwowane obrazy utrwalano na zdjęciach w mikroskopie i utrwalając uzyskane obrazy na zdjęciach. Wykonana analiza obrazów pozwoliła na stwierdzenie, że zastosowanie EPE (1 mL w stężeniu końcowym 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na komórki śródbłonka powodowało spadek szybkości migracji o przeszło 31% w stosunku do kontroli (komórek nie traktowanych EPE) w przypadku stymulacji EndMT za pomocą TGF- β . W linii HUVEC (tj. z 16,01 do 11,20 $\mu\text{m}/\text{godzinę}$) i o prawie 40% w przypadku linii HMEC-1 (tj. z 10,30 do 6,22). Dla komórek stymulowanych białkiem S zmiany zahamowania prędkości migracji wynosiły około 25 % (tj. z 14,53 do 10,91 dla HUVEC i 9,19 do 6,88 dla linii HMEC-1) a dla białka N około 28% (tj. z 13,50 do 9,69 dla HUVEC i 8,91 do 6,43 dla linii HMEC-1). Wyniki dla HUVEC przedstawiono na Fig. 2C dla linii HMEC-1 Fig 2D.

Przykład 7

Testowanie wpływu kwasu galusowego (GA) na poziom markerów śródbłonkowych i mezenchymalnych w analizowanych komórkach śródbłonka poddanych przemianie EndMT.

Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytkę 6-dołkową i po indukcji EndMT (5 μM TGF- β lub 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ białka S lub 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ białka N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności GA (czysty związek w dawce 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) przez 48 godzin. Po tym czasie z komórek przygotowano lizaty, które poddano analizie metodą Western blot. Zaobserwowano, że inkubacja komórek śródbłonka w obecności GA skutkuje spadkiem

poziomu markerów mezenchymalnych (Tabela 4). W komórkach HUVEC najsilniej zaznaczone zmiany obserwowano dla N-kadheryny 3,7-krotny spadek poziomu białka w każdym badanym modelu. Natomiast spadki poziomu wimentyny wyniosły od 1,89-krotnego dla modelu stymulacji EndMT za pomocą białka S lub TGF- β do 1,5-krotnego w przypadku stymulacji białkiem N wirusa SARS-CoV-2. Spadek poziomu markera miofibroblastów α -SMA był około 3,2-krotny we wszystkich analizowanych modelach badawczych EndMT. W komórkach linii HMEC-1 w przypadku N-kadheryny spadek we wszystkich modelach był 3,0-krotny. Największy 2-krotny spadek poziomu wimentyny zanotowano w modelu stymulacji za pomocą TGF- β i białka S. Natomiast w przypadku modelu indukowanego białkiem N spadek poziomu wimentyny był około 1,55-krotny. Zmiany poziomu α -SMA kształtował na poziomie 2,6-krotnego spadku we wszystkich badanych modelach EndMT. W przypadku markerów śródbłonna zaobserwowano, że hodowla komórek w obecności GA skutkowała wzrostem poziomu tych markerów (Tabela 4). W komórkach HUVEC zaobserwowano przeszło 0,8-krotny wzrost poziomu kładyny w komórkach, w których EndMT indukowano za pomocą TGF- β i około 0,6-krotny wzrost poziomu tego białka, gdy EndMT indukowała obecność w medium obydwu białek wirusa SARS-CoV-2 N lub S. W przypadku okładyny wzrosty dla obu typów komórek wynosiły około 0,9 w każdym modelu stymulacji EndMT. Z kolei w komórkach HMEC-1 wzrost poziomu kładyny był około 0,65-krotny we wszystkich badanych modelach a okładyny wahał się nieznacznie od 0,7-wzrostu w modelu indukowanym białkiem N do 0,64-krotnego dla dwóch pozostałych modeli EndMT.

Tabela 4 przedstawia modulujący wpływ kwasu galusowego (GA) na poziom markerów śródbłonkowych i mezenchymalnych w komórkach HUVEC i HMEC-1 indukowanych do przemiany EndMT. Istotność statystyczna pomiędzy grupami została potwierdzona w oparciu o analizę Anova z testowaniem post hoc Tukeya, gdzie *** $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

| Markery śródbłonkowe | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|--------------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|--------------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| Linia komórkowa | HUVEC | | | | | | HMEC-1 | | | | | |
| | TGF- β | | Białko N | | Białko S | | TGF- β | | Białko N | | Białko S | |
| Stymulacja EndMT | | | | | | | | | | | | |
| Traktowanie | - | GA | - | GA | - | GA | - | GA | - | GA | - | GA |
| <i>N-kadheryna</i> | 3,67 | 0,99 *** | 3,36 | 0,89 *** | 2,99 | 0,81 *** | 3,51 | 1,17 *** | 3,29 | 1,09 *** | 3,06 | 1,03 *** |
| <i>wimentyna</i> | 2,70 | 1,43 *** | 2,44 | 1,55 ** | 2,45 | 1,30 *** | 2,54 | 1,24 *** | 2,20 | 1,41 *** | 2,33 | 1,15 *** |

| | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------|-------------|----------|------------|----------|-------------|---------------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| <i>α-SMA</i> | 3,25 | 1,03 *** | 2,03 | 0,64 ** | 2,98 | 0,96 *** | 2,89 | 1,13 *** | 1,84 | 0,71 ** | 3,05 | 1,17 *** |
| Markery mezenchymalne | | | | | | | | | | | | |
| Linia komórkowa | HUVEC | | | | | | HMEC-1 | | | | | |
| Stymulacja EndMT | TGF-β | | Białko N | | Białko S | | TGF-β | | Białko N | | Białko S | |
| Traktowanie | - | GA | - | GA | - | GA | - | GA | - | GA | - | GA |
| <i>Kludyna</i> | 0,46 | 0,57 * | 0,54 | 0,83 * | 0,73 | 1,11 ** | 0,57 | 0,90 ** | 0,65 | 0,99 ** | 0,82 | 1,26 ** |
| <i>Okludyna</i> | 0,77 | 0,86 | 0,83 | 0,91 * | 0,97 | 1,08 | 0,87 | 1,35 *** | 1,05 | 1,48 *** | 0,92 | 1,44 *** |

Przykład 8

Testowanie wpływu GA na zdolność tworzenia kapilar przez komórki śródbłonka poddanych przemianie EndMT

Sprawdzono czy GA będzie regulował zdolność komórek do tworzenia kapilar – cechy charakterystycznej dla komórek śródbłonka, którą tracą w procesie przejścia EndMT. Tworzenie kapilar oznaczono w oparciu o pomiar całkowitej długości tworzonych połączeń międzykomórkowych, tzw. kapilar. Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytkę 6-dołkową i po indukcji przemiany EndMT (5 μM TGF-β, 1 μg/mL białka S lub 1 μg/mL N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności 7,5 μg/mL GA przez 48 godzin. Po tym czasie zebrano komórki i przesiano na płytkę 12-dołkową pokrytą Matrigielem. Zaobserwowano, że w przypadku komórek śródbłonka zastosowanie GA powodowało prawie 2,1-krotny wzrost całkowitej długości kapilar (tj. średnio z 6,52 μm do 13,71 μm w przypadku linii HMEC-1 i 8,4 μm do 20,4 μm w linii HUVEC) w przypadku stymulacji EndMT za pomocą TGF-β oraz około 1,6-krotny wzrost w przypadku komórek stymulowanych białkami N (tj. średnio z 6,94 μm do 11,11 μm w przypadku linii HMEC-1 i 9,5 μm do 15,2 μm w linii HUVEC) lub S (tj. średnio z 7,86 μm do 12,66 μm w przypadku linii HMEC-1 i 8,42 μm do 13,44 μm w linii HUVEC). Wyniki dla HUVEC przedstawiono na Fig. 3A, dla linii HMEC-1 Fig 3B.

Przykład 9

Testowanie wpływu GA na szybkość migracji komórek śródbłonka poddanych przemianie EndMT.

Analizowano, czy GA wpływał na szybkość migracji komórek śródbłonka. Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytce 12-dołkowej i po indukcji przemiany EndMT (5 μ M TGF- β , 1 μ g/mL białka S lub 1 μ g/mL N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności 7,5 μ g/mL GA przez 48 godzin do pełnej konfluencji. Po tym czasie wykonano rysę za pomocą końcówki (20-200 μ L) do pipety automatycznej. Szybkość zarastania rysy obserwowano co 2 godziny w czasie 12 godzin, a obserwowane obrazy utrwalano na zdjęciach mikroskopowych. Wykonana analiza obrazów pozwoliła na stwierdzenie, że zastosowanie GA na komórki śródbłonka powodowało spadek szybkości migracji o przeszło 35% w stosunku do kontroli komórek nie traktowanych GA w przypadku stymulacji EndMT za pomocą TGF- β w linii HUVEC (tj. z 16,21 do 10,54 μ m/godzinę) i prawie 37% w przypadku linii HMEC-1 (tj. z 10,30 do 6,51 μ m/godzinę). Dla komórek stymulowanych białkami wirusa SARS-CoV-2 zmiany zahamowania prędkości migracji wynosiły około 25 % (tj. z 14,40 do 10,78 dla linii HUVEC i 9,61 do 7,18 dla linii HMEC-1 dla białka S oraz tj. z 12,50 do 9,35 dla linii HUVEC i 8,77 do 6,67 dla linii HMEC-1 dla białka N). Wyniki dla HUVEC przedstawiono na Fig. 3C, dla linii HMEC-1 Fig 3D.

Przykład 10

Testowanie wpływu kwasu elagowego (EA) na poziom markerów śródbłonkowych i mezenchymalnych w analizowanych komórkach śródbłonka poddanych przemianie EndMT.

Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytkę 6-dołkową i po indukcji EndMT (5 μ M TGF- β lub 1 μ g/mL białka S lub 1 μ g/mL białka N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności 5,0 μ g/mL EA przez 48 godzin. Po tym czasie z komórek przygotowano lizaty, które poddano analizie metodą Western blot. Zaobserwowano, że inkubacja komórek śródbłonka w obecności EA skutkuje spadkiem poziomu markerów mezenchymalnych (Tabela 5). W komórkach HUVEC najsilniej zaznaczone zmiany obserwowano dla N-kadheryny – 2,6-2,7-krotny spadek poziomu białka w każdym badanym modelu. Natomiast spadki poziomu wimentyny wyniosły od około 1,63-krotnego dla modelu stymulacji EndMT za pomocą białka TGF- β przez 1,37-krotny spadek dla modelu indukowanego białkiem S do 1,25-krotnego w przypadku stymulacji białkiem N. Spadek poziomu markera miofibroblastów α -SMA był około 2,2-krotny w modelu indukowanym białkiem S natomiast 2,3-krotny w pozostałych analizowanych modelach badawczych EndMT. W komórkach linii HMEC-1 w przypadku N-kadheryny poziom jej spadał około 2,8-krotnego spadku poziomu białka dla modelu indukowanego TGF- β przez 2,5-krotny we wszystkich modelach EndMT. Największy 1,7-krotny spadek poziomu wimentyny zanotowano w modelu

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|
| <i>klaudyna</i> | 0,60 | 0,89 * | 0,68 | 0,96 * | 0,87 | 1,25 ** | 0,64 | 1,91 *** | 0,72 | 1,75 *** | 0,90 | 2,07 *** |
| <i>okludyna</i> | 0,92 | 1,41 ** | 0,98 | 1,54 ** | 1,13 | 1,72 ** | 0,70 | 1,39 *** | 0,76 | 1,26 *** | 0,89 | 1,47 *** |

Przykład 11

Testowanie wpływu EA na zdolność tworzenia kapilar przez komórki śródbłonka poddanych przemianie EndMT

Sprawdzono, czy EA będzie regulował zdolność komórek do tworzenia kapilar – cechy charakterystycznej dla komórek śródbłonka, którą zatracają w procesie przejścia EndMT. Tworzenie kapilar oznaczono w oparciu o pomiar całkowitej długości tworzonych połączeń międzykomórkowych, tzw. kapilar. Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytkę 6-dołkową i po indukcji przemiany EndMT (5 μ M TGF- β , 1 μ g/mL białka S lub 1 μ g/mL N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności 5,0 μ g/mL EA przez 48 godzin. Po tym czasie zebrano komórki i przesiano na płytkę 12-dołkową pokrytą Matrigel. Zaobserwowano, że w przypadku komórek śródbłonka zastosowanie EA powodowało prawie 1,9-krotny wzrost całkowitej długości kapilar (tj. średnio z 6,57 μ m do 12,35 μ m w przypadku linii HMEC-1 i 8,31 μ m do 15,99 μ m w linii HUVEC) w przypadku stymulacji EndMT za pomocą TGF- β oraz około 1,3-1,4- krotny wzrost w przypadku komórek stymulowanych białkami N (tj. średnio z 7,74 μ m do 10,22 μ m w przypadku linii HMEC-1 i 10,48 μ m do 14,66 μ m w linii HUVEC) lub S (tj. średnio z 9,54 μ m do 12,41 μ m w przypadku linii HMEC-1 i 8,41 μ m do 11,45 μ m w linii HUVEC). Wyniki dla HUVEC przedstawiono na Fig. 4A, dla linii HMEC-1 Fig 4B.

Przykład 12

Testowanie wpływu EA na szybkość migracji komórek śródbłonka poddanych przemianie EndMT.

Analizowano, czy EA wpływała na szybkość migracji komórek śródbłonka. Komórki HUVEC lub linii HMEC-1 zostały wysiane na płytce 12-dołkowej i po indukcji przemiany EndMT (5 μ M TGF- β , 1 μ g/mL białka S lub 1 μ g/mL N wirusa SARS-CoV-2 przez 48 godzin) hodowane w obecności 5,50 μ g/mL EA przez 48 godzin do pełnej konfluencji. Po tym czasie wykonano rysę za pomocą końcówki (20-200 μ L) do pipety automatycznej. Szybkość zarastania rysy obserwowano co 2 godziny w czasie 12 godzin, a obserwowane obrazy utrwalano na zdjęciach. Wykonana analiza obrazów pozwoliła na stwierdzenie, że w przypadku komórek śródbłonka zastosowanie EA powodowało spadek szybkości migracji o przeszło 31%

w stosunku do komórek nie traktowanych w przypadku stymulacji EndMT za pomocą TGF- β w linii HUVEC (tj. z 16,01 do 11,20 $\mu\text{m}/\text{godzinę}$) i o prawie 20% w przypadku linii HMEC-1 (tj. z 10,30 do 8,52 $\mu\text{m}/\text{godzinę}$). Dla komórek stymulowanych białkiem S zmiany zahamowania prędkości migracji wynosiły około 18 % (tj. z 14,41 do 11,82 dla HUVEC i 9,55 do 7,84 dla linii HMEC-1) a dla białka N około 15% (tj. z 12,11 do 10,32 dla HUVEC i 8,74 do 7,44 dla linii HMEC-1). Wyniki dla HUVEC przedstawiono na Fig. 4C, dla linii HMEC-1 Fig 4D.

Wnioski

Badania wykazały, że polifenolowy ekstrakt z poprodukcyjnych wyłoków z nasion wiesiołka dziwnego (EPE) powoduje zahamowanie przemiany śródbłonkowo-mezenchymalnej, która leży u podstawy indukowania zmian zwłóknieniowych wywołanych zarówno przez cytokiny i czynniki wzrostu należące do nadrodziny TGF- β , jak i białka wirusa SARS-CoV-2.

Badania *in vitro* wykazały, że podanie EPE skutkuje wzrostem zdolności komórek o charakterze miofibroblastów do tworzenia kapilar. Ponadto zaobserwowano, że dodanie ekstraktu do hodowli komórek śródbłonka, indukowanych do przemiany EndMT hamuje wzrost poziomu markerów mezenchymalnych oraz obniża zdolności migracyjne komórek, a więc procesów mających krytyczne znaczenie dla patologicznych zmian zwłóknieniowych wywodzących się ze śródbłonka naczyń.

Zaobserwowano także, że dwa główne składniki EPE - kwas galusowy (GA) i elagowy (EA), stosowane osobno działają analogicznie.

Z powyższego wynika, że zarówno polifenolowy ekstrakt z poprodukcyjnych wyłoków z nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*) zawierający kwas elagowy i kwas galusowy, jak i kwas elagowy i kwas galusowy stosowane osobno mają zastosowanie w leczeniu chorób o podłożu zwłóknieniowym.

Literatura

[1] Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):583-94. doi: 10.1038/nri1412. PMID: 15286725;

[2] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012 Jul 6;18(7):1028-40. doi: 10.1038/nm.2807

[3] Kumar A, Kapnadak SG, Girgis RE, Raghu G. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Rev Respir Med.* 2018 May;12(5):375-385. doi: 10.1080/17476348.2018.1462704.

- [4] Cho JG, Lee A, Chang W, Lee MS, Kim J. Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Front Immunol.* 2018 Feb 20;9:294. doi: 10.3389/fimmu.2018.00294
- [5] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007 Aug;13(8):952-61. doi: 10.1038/nm1613
- [6] Ma J, Sanchez-Duffhues G, Goumans MJ, Ten Dijke P. TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Apr 21;8:260. doi: 10.3389/fcell.2020.00260
- [7] Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, Cook JR, Nordvig AS, Shalev D, Sehrawat TS, Ahluwalia N, Bikdeli B, Dietz D, Der-Nigoghossian C, Liyanage-Don N, Rosner GF, Bernstein EJ, Mohan S, Beckley AA, Seres DS, Choueiri TK, Uriel N, Ausiello JC, Accili D, Freedberg DE, Baldwin M, Schwartz A, Brodie D, Garcia CK, Elkind MSV, Connors JM, Bilezikian JP, Landry DW, Wan EY. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med.* 2021 Apr;27(4):601-615. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z.
- [8] Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, Atif SM, Hariprasad G, Hasan GM, Hassan MI. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020 Oct 1;1866(10):165878. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.
- [9] Huertas A, Montani D, Savale L, Pichon J, Tu L, Parent F, Guignabert C, Humbert M. Endothelial cell dysfunction: a major player in SARS-CoV-2 infection (COVID-19)? *Eur Respir J.* 2020 Jul 30;56(1):2001634. doi: 10.1183/13993003.01634-2020.
- [10] Abo-Gresha NM, Abel-Aziz EZ, Greish SM. Evening primrose oil ameliorates platelet aggregation and improves cardiac recovery in myocardial-infarct hypercholesterolemic rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014 Mar 13;6(1):23-36.
- [11] Jack AM, Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of diabetes and evening primrose oil treatment on responses of aorta, corpus cavernosum and mesenteric vasculature in rats. *Life Sci.* 2002 Sep 6;71(16):1863-77. doi: 10.1016/s0024-3205(02)01912-4.
- [12] Tsutsumi T, Nagaoka T, Yoshida T, Wang L, Kuriyama S, Suzuki Y, Nagata Y, Harada N, Kodama Y, Takahashi F, Morio Y, Takahashi K. Nintedanib ameliorates experimental pulmonary arterial hypertension via inhibition of endothelial mesenchymal transition and smooth muscle cell proliferation. *PLoS One.* 2019 Jul 24;14(7):e0214697. doi: 10.1371/journal.pone.0214697.
- [13] Cipriani P, Di Benedetto P, Ruscitti P, Capece D, Zazzeroni F, Liakouli V, Pantano I, Berardicurti O, Carubbi F, Pecetti G, Turrinchia S, Alesse E, Iglarz M, Giacomelli R. The Endothelial-mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis Is Induced by Endothelin-1 and Transforming Growth Factor- β and May Be Blocked by Macitentan, a Dual Endothelin-1 Receptor Antagonist. *J Rheumatol.* 2015 Oct;42(10):1808-16. doi: 10.3899/jrheum.150088.
- [14] Suzuki T, Tada Y, Gladson S, Nishimura R, Shimomura I, Karasawa S, Tatsumi K, West J. Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition. *Respir Res.* 2017 Oct 16;18(1):177. doi: 10.1186/s12931-017-0660-4.
- [15] Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Srivastava SP, Koya D. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes.* 2014 Jun;63(6):2120-31. doi: 10.2337/db13-1029.
- [16] Yao Y, Li Y, Zeng X, Ye Z, Li X, Zhang L. Losartan Alleviates Renal Fibrosis and Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Under High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia. *Front Pharmacol.* 2018 Oct 29;9:1213. doi: 10.3389/fphar.2018.01213.

- [17] Tsai TH, Lee CH, Cheng CI, Fang YN, Chung SY, Chen SM, Lin CJ, Wu CJ, Hang CL, Chen WY. Liraglutide Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition and Attenuates Neointima Formation after Endovascular Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Cells*. 2019 Jun 14;8(6):589. doi: 10.3390/cells8060589.
- [18] Song S, Zhang M, Yi Z, Zhang H, Shen T, Yu X, Zhang C, Zheng X, Yu L, Ma C, Liu Y, Zhu D. The role of PDGF-B/TGF- β 1/neprilysin network in regulating endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary artery remodeling. *Cell Signal*. 2016 Oct;28(10):1489-501. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.06.022.
- [19] Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation *Med. Aromat Plants*. 2015;4:3.
- [20] Kiss A., Naruszewicz M. Polyphenolic compounds characterization and reactive nitrogen species scavenging capacity of *Oenothera paradoxa* defatted seed extract. *Food Chem.*, 2012;131:485-492.
- [21] Jaszewska E., Kośmider A., Kiss A.K., Naruszewicz M.: Pro-oxidative and pro-apoptotic action of defatted seeds of *Oenothera paradoxa* on human skin melanoma cells. *J. Agr. Food Chem.*, 2009; 57:8282-8289.
- [22] Jaszewska, E., Kosmider, A., Kiss, A.-K., Naruszewicz M., *Oenothera paradoxa* defatted seeds extract containing pentagalloylglucose and procyanidins potentiates the cytotoxicity of vincristine. *J. Physiol. Pharm.* 2010;61:637-643.
- [23] Górlach S, Wagner W, Podsedek A, Sosnowska D, Dastych J, Koziolkiewicz M. Polyphenols from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds induce apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *J. Agric Food Chem*. 2011;59:6985-6997.
- [24] Lewandowska U, Owczarek K, Szewczyk K, Podsedek A, Koziolkiewicz M, Hrabec M. Influence of polyphenol extract from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) seeds on human prostate and breast cancer cell lines. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 2014a;68:110-118.
- [25] Owczarek K, Hrabec E, Fichna J, Sosnowska D, Koziolkiewicz M, Szymanski J, Lewandowska U. Inhibition of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase-2, and metalloproteinase-9 expression by flavanols from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) in human colon cancer SW-480 cells. *J. Funct. Food*, 2017;37:553-563.
- [26] Luque de Castro MD, García LE. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 1998;369:1-10.
- [27] PLESZCZYŃSKA, Małgorzata i SZCZODRAK, Janusz, 2005. Taniny i ich rozkład enzymatyczny [online]. 2005. Komitet Biotechnologii PAN. [dostęp: 17 wrzesień 2021]. Dostępny w Internecie: http://rcin.org.pl/Content/112025/POZN271_140281_biotechnologia-2005-no1-pleszczynska.pdf
- [28] Chen W, Huang Y, Qi J, Tang M, Zheng Y, Zhao S, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from areca husk. *Journal of Food Processing & Preservation*. 2014;38(1):90-96.
- [29] Ciğeroğlu Z, Aras Ö, Pinto CA, Bayramoglu M, Kırbaşlar Şİ, Lorenzo JM, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) leaves via D-optimal design and artificial neural network design with categorical and quantitative variables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018;98(12):4584-4596.
- [30] Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Nat Prod Commun*. 2013 Dec;8(12):1821-9.
- [31] LU, J. and YUAN, Q. (2008), A NEW METHOD FOR ELLAGIC ACID PRODUCTION FROM POMEGRANATE HUSK. *Journal of Food Process Engineering*, 31: 443-454.
- [32] Ali Abdulkadh Al-Ghan. Extraction and Purification of Gallic Acid from *Eucalyptus camaldulensis* Leaves. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences/No.(9)/Vol.(24):2016*.
- [33] Wang X-H, Cai C, Li X-M. Optimal Extraction of Gallic Acid from *Suaeda glauca* Bge. Leaves and Enhanced Efficiency by Ionic Liquids. *International Journal of Chemical Engineering*, 2016.
- [34] Karamać M, Kosińska A, Pegg RB. CONTENT OF GALLIC ACID IN SELECTED PLANT EXTRACTS. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2006;56(1):55-58.