

**Monika Styrzczevska**

## **Identyfikacja i analiza składników włókna lnianego o właściwościach biomedycznych.**

### **Streszczenie**

Rośliny lnu (*Linum usitatissimum* L.), o bogatej tradycji w uprawie w umiarkowanej strefie klimatycznej, z których pozyskiwane jest włókno oraz nasiona, wykorzystywane są głównie w przemyśle spożywczym, farbiarskim, papierniczym, tekstylnym oraz kosmetycznym. Ostatnie lata badań nad składnikami produktów lnianych, głównie oleju oraz nasion, przyniosły wiele doniesień o ich zróżnicowanych prozdrowotnych właściwościach. Pozytywny wpływ na zdrowie odnotowano też w niedawnych badaniach przedklinicznych wykorzystania włókna lnianego jako opatrunku na trudno gojące się rany. Badania te oraz brak precyzyjnych danych na temat hydrofobowych składników włókna lnianego i ich aktywności, skłoniły do podjęcia analiz identyfikacyjnych oraz określających właściwości biologiczne wybranych związków hydrofobowych włókna.

Dzięki zastosowaniu metod chromatograficznych, w ekstrakcie związków hydrofobowych z włókna lnianego jako główne składniki zidentyfikowano szereg kwasów tłuszczowych, włączając wielonienasycone kwasy linolowy oraz linolenowy, oraz różnorodne związki sterolowe, z głównym przedstawicielem -  $\beta$ -sitosterolem, stanowiącym ponad połowę steroli włókna. Szczegółowe analizy chromatograficzne, spektrofotometryczne oraz spektroskopii masowej wykazały również obecność w badanym ekstrakcie bardzo ciekawego i unikalnego związku - kanabidiolu. Dotychczas, podobnie jak w przypadku reszty kanabinoidów, jego występowanie ograniczano jedynie do roślin konopi, jednakże badania przeprowadzone w ramach pracy wskazują na jego obecność również w roślinach lnu.

Ekstrakt, zawierający wymienione potencjalnie aktywne biologicznie związki, został poddany analizom mającym na celu określenie wpływu składników hydrofobowych włókna lnianego na procesy związane głównie z leczeniem trudno gojących się ran. W badaniach

szczególnie uwzględnione było określenie roli kanabidiolu, ze względu na charakterystyczną aktywność biologiczną tego typu związków oraz jego unikatowość w świecie roślin, ale także fitosteroli - związków o znanych cennych właściwościach biologicznych. Określono wpływ ekstraktu hydrofobowych składników włókna Inianego na potencjał proliferacyjny fibroblastycznych oraz keratynocytarnych komórek skóry ludzkiej, gdzie jedynie przy zastosowaniu końcowego stężenia ekstraktu odpowiadającego 0,2 µg CBD/ml w przypadku keratynocytów odnotowano niewielki spadek zdolności proliferacyjnych. W pozostałych próbach zauważalny był wzrost potencjału proliferacyjnego lub brak zmian w badanym parametrze. Ekstrakt wpływał też przyspieszająco na proces porostania rany przez komórki skórne *in vitro*, w którym największy udział ma migracja komórek. Wpływ ten również był związany z obecnością innych niż kanabidiol składników preparatu i według danych literaturowych związany może być zarówno z aktywnością steroli, jak i nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Przeprowadzona analiza wpływu badanego ekstraktu na transkryptom komórek fibroblastowych skóry ludzkiej wykazała, że prawdopodobnie, pomimo ilościowej przewagi kwasów tłuszczowych oraz steroli, głównym składnikiem bioaktywnym ekstraktu jest nowo zidentyfikowany kanabidiol. Wskazuje na to zarówno analiza ilościowa, jak i jakościowa, w ramach której zaobserwowano zmiany w poziomie transkrypcji wielu genów związanych z charakterystycznymi dla kanabinoidów szlakami przekazywania sygnału, a także ze stanem zapalnym. Zauważono również wiele zmian w transkryptomie prawdopodobnie opartych na działaniu związków sterolowych, głównie związanych z metabolizmem steroidów, macierzą zewnątrzkomórkową oraz regulacją cyklu komórkowego.

Dokładniejsza analiza ekspresji wybranych genów związanych ze stanem zapalnym oraz macierzą zewnątrzkomórkową wskazuje na hamowanie reakcji prozapalnych oraz reorganizację substancji międzykomórkowej pod wpływem ekstraktu związków hydrofobowych włókna Inianego. Za pierwszą z wymienionych aktywności głównym czynnikiem odpowiedzialnym jest wspomniany kanabidiol, ale sterole roślinne mogą działać synergistycznie i być współodpowiedzialne za część zaobserwowanych zmian. Natomiast za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, oprócz zmian w ekspresji kolagenów, odpowiadają inne składniki ekstraktu.

Przeprowadzone w ramach pracy doświadczenia pozwoliły również na potwierdzenie przeciwbakteryjnej aktywności ekstraktu, związanej z obecnością kanabidiolu. Wykazano jego hamujący wpływ na namnażanie bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Stężenia badanego ekstraktu, które były w stanie hamować wzrost wspomnianych gatunków mikroorganizmów były jednak przynajmniej dwukrotnie wyższe, niż najwyższe ze stosowanych w badaniach nad wpływem na ludzkie komórki skórne, nie można więc wykluczyć ich drażniącego efektu wobec tych komórek.

Odrębnym zagadnieniem poruszonym w pracy jest sama obecność kanabidiolu w roślinach Inu. Przeprowadzone pomiary potwierdzają zawartość tej cząsteczki we wszystkich częściach rośliny, z wyłączeniem oleju uzyskiwanego z nasion, a także sugerują zmiany poziomu jej produkcji pod wpływem warunków stresowych i hormonów roślinnych. Zidentyfikowano również potencjalny gen Inianej syntazy kwasu kanabidiolowego, którego sekwencja promotorowa charakteryzuje się obecnością wielu elementów regulatorowych, związanych z odpowiedzią na czynniki stresowe takie jak susza, chłód czy infekcja patogenna, a także hormony, głównie gibereliny i kwas abscysynowy. Analiza *in silico* stanowi pośrednie wytłumaczenie obserwowanych zmian poziomów kanabinoidów w badanych warunkach stresowych i sugeruje rolę tych związków w reakcji obronnej roślin.

W ramach pracy uzyskano również transgeniczne linie Inu ekspresjonujące syntazę kwasu kanabidiolowego z konopi. Linie te charakteryzowały się wzrostem zawartości kanabidiolu w tkankach zielonych, co świadczy o obecności aktywnej, podobnej do konopi drogi syntezy zidentyfikowanego w Inie kanabinoidu.

Uzyskane wyniki świadczą o obecności we włóknie Inianym unikalnego, aktywnego biologicznie kanabidiolu, głównego związku odpowiedzialnego za przeciwzapalne i przeciwbakteryjne właściwości ekstraktu związków hydrofobowych z włókna. Synergistyczne działanie innych składników ekstraktu, szczególnie steroli, ale prawdopodobnie także kwasów tłuszczowych, polegające na aktywacji proliferacji i migracji komórek skóry, jest szczególnie cenne w aspekcie wykorzystania włókna jako opatrunku na trudno gojące się rany. Wstępne badania potwierdzają również możliwość manipulacji zawartością związków kanabinoidowych poprzez transgenezę, co stanowić może o cechach użytkowych roślin, a także odporności na czynniki stresowe.

