

Mgr inż. Anna Zwyrzykowska-Wodzińska

- **Dziedzina:** Nauki rolnicze
- **Dyscyplina:** Zootechnika
- **Data otwarcia przewodu doktorskiego:** 24.03.2015r.
- **Temat:** Identyfikacja i działanie substancji biologicznie aktywnych zawartych w różnych gatunkach ostrokrzewów (*Ilex* sp.) – badania *in vitro* i *in vivo*
- **Promotor:** prof. dr hab. inż. Robert Kupczyński
- **Promotor pomocniczy:** dr hab. inż. Sebastian Opaliński, profesor uczelni
- **Recenzenci:** 1) dr hab. Barbara Tombarkiewicz
2) dr hab. Agnieszka Tomza-Marciniak

Anna Zwyrzykowska-Wodzińska

Streszczenie

Identyfikacja i działanie substancji biologicznie aktywnych zawartych w różnych gatunkach ostrokrzewów (*Ilex* sp.) – badania *in vitro* i *in vivo*

Celem przeprowadzonych badań była: i) izolacja, identyfikacja oraz oznaczenie ilościowe metabolitów wtórnych z europejskich odmian *Ilex* sp., ii) oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej, iii) w badaniach *in vivo* ocena wpływu ekstraktów wodnych z *I. paraguariensis* i *Ilex meserveae* na kształtowanie się parametrów hematologicznych, biochemicznych, immunologicznych oraz ocena histopatologiczna wybranych narządów szczurów Wistar. Badania przeprowadzono na 3 taksonach roślin z rodzaju *Ilex* spp. pochodzących z krzewów rosnących w kolekcji Katedry Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz *Ilex paraguariensis*. Materiał badawczy w postaci wysuszonych i roztartych liści, został poddany dwóm procesom ekstrakcji. Do badań jakościowych i ilościowych zastosowano techniki chromatografii cieczowej (LC, ang. *Liquid Chromatography*) oraz gazowej (GC, ang. *Gas Chromatography*) sprzężonej z detektorem masowym (MS). W ekstraktach metanolowych oznaczono 19 związków, w ekstraktach wodnych 46 związków, w ekstraktach dichlorometanowych 64 związki, a we frakcji saponinowej 21 związków. Oznaczenie ogólnej zawartości polifenoli wykonano metodą Folina – Ciocalteu. Najwyższą zawartość polifenoli stwierdzono w ekstrakcie wodnym z *I. paraguariensis*. Aktywność antyoksydacyjną badano trzema technikami DPPH, ABTS i FRAP. W II etapie badań szczury szczepu Wistar podzielono na następujące grupy: K – szczury kontrolne, YM – szczury żywione paszą standardową i otrzymujące do picia wodę z ekstraktem z *Ilex paraguariensis* (50 g/L), IM – szczury żywione paszą standardową i otrzymujące do picia wodę z ekstraktem z *Ilex x meserveae* (50 g/L). KCH – szczury żywione paszą standardową z dodatkiem 20 g cholesterolu/kg paszy i otrzymujące do picia wodę, YMCH – szczury żywione paszą standardową z dodatkiem 20 g cholesterolu/kg paszy i otrzymujące do picia wodę z ekstraktem z *Ilex paraguariensis* (50 g/L), IMCH – szczury żywione paszą standardową z dodatkiem 20 g cholesterolu/kg paszy i otrzymujące do picia wodę z ekstraktem z *Ilex x meserveae* (50 g/L). W badaniach *in vivo* zostały określone przyrosty masy ciała, parametry hematologiczne krwi (WBC, RBC, HGB, PLT, MCV, MCH, MCHC), parametry biochemiczne (glukoza, NEFA, białko całkowite, albuminy, kreatynina, TC, HDL, TG, ASPAT, ALAT) oraz parametry immunologiczne (IgG, IgM, IL-6 i IL-10). Wykonano również badania histologiczne i morfometryczne nerek, wątroby, jelit oraz serca. Otrzymane wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA) z powtarzanimi pomiarami.

Różnice między średnimi oszacowano testem HSD Tukey'a. Wśród badanych odmian *Ilex* spp. wysoką zawartością kwasu chlorogenowego charakteryzowała się odmiana *Ilex x meserveae* 'Blue Angel' i wyniosła 15,49%PP, a najmniejszą *Ilex paraguariensis* i wyniosła 9,34%PP. Rutyna była drugim istotnym związkiem polifenolowym w badanych ekstraktach, największą jej ilość stwierdzono dla *Ilex x meserveae* 'Blue Angel' (21,29%PP) a najniższą dla *Ilex paraguariensis* (9,30%PP). Wśród badanych ekstraktów z europejskich taksonów *Ilex* najwyższą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzował się ekstrakt metanolowy z *I. x meserveae*. Suplementacja zwierząt doświadczalnych wodnymi ekstraktami z *I. paraguariensis* i *I. x meserveae* istotnie ($p \leq 0,01$) wpłynęła na zmniejszenie przyrostów masy ciała w całym okresie doświadczalnym w porównaniu z kontrolą (K), podobnie dla grup z dodatkiem cholesterolu różnice te dla YMCH i IMCH wyniosły 3,13g i 3,5g w porównaniu z kontrolą KCH. Zastosowane ekstrakty z *I. x meserveae* przy diecie hipercholesterolomicznej hamowały nasilenie lipolizy, jednak nie miały wpływu na nasilenie hipertriglicydemii. Przy diecie hipercholesterolomicznej *I. paraguariensis* powodował bardzo wyraźny wzrost IL-6, natomiast zastosowanie *I. x meserveae* powodowała spadek stężenia tej interleukiny we krwi. Zastosowanie *I. x meserveae* bez względu na rodzaj diety powoduje wzrost IL-10, natomiast *I. paraguariensis* przy diecie standardowej powoduje obniżenie zarówno IL 6 jak i IL 10. Na podstawie analiz mikro i makroskopowych stwierdzono działanie ochronne ekstraktów na narządy mięszone w grupach otrzymujących dietę hipercholesterolomiczną. W szczególności zaobserwowano działanie ochronne wobec wątroby oraz serca. Oba ekstrakty wykazywały wysoką aktywność jednakże ekstrakt z *I. x meserveae* działał intensywniej. W grupach badanych zaobserwowano nasiloną diurezę. Przeprowadzone badania rozszerzyły wiedzę w zakresie profilaktyki chorób dietozależnych oraz stanowią dobrą podstawę dla przyszłych prac badawczych, w tym mających znaczenie dla zapobiegania niektórym schorzeniom cywilizacyjnym przy wykorzystaniu rodzimych gatunków roślin.

Słowa kluczowe: *Ilex paraguariensis*, *Ilex* spp., szczury Wistar, polifenole, saponiny, hipercholesterolemia, stres oksydacyjny

Anna Zwymkowska - Wodzińska

Abstract

Identification and activity of biologically active substances contained in various species of holly (*Ilex* sp.) - *in vitro* and *in vivo* studies

The aim of the research was: i) isolation and identification of secondary metabolites from European varieties of *Ilex* sp., ii) determination of antioxidant activity, iii) *in vivo* study, which includes analysis of morphological and biochemical parameters, as well as histopathological analysis of key tissues and organs of Wistar rats. The research were carried out on 3 taxa of plants of the genus *Ilex* sp. originating from shrubs growing in the collection of the Department of Horticulture, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, and commercial *Ilex paraguariensis*. The research material in the form of dried and ground leaves was subjected to two extraction processes. For qualitative and quantitative research, the techniques of liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) coupled with a mass detector (MS) were used. 19 compounds were determined in methanol extracts, 46 compounds in aqueous extracts, 64 compounds in dichloromethane extracts, and 21 compounds in the saponin fraction. The total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu method. The highest content of polyphenols was found in the water extract of *I. paraguariensis*. The antioxidant activity was tested with three techniques: DPPH, ABTS and FRAP. In the second stage of the study, the rats of the Wistar strain were divided into the following groups: K - control rats, YM - rats fed with standard feed and given water with *Ilex paraguariensis* extract (50 g / L) to drink, IM - rats fed with the standard feed and given water to drink with the extract of *Ilex x meserveae* (50 g / L). KCH - rats fed with standard feed with 20 g of cholesterol / kg of feed and given water to drink, YMCH - rats fed with standard feed with 20 g of cholesterol / kg of feed and given water to drink with extract of *Ilex paraguariensis* (50 g / L) , IMCH - rats fed with standard feed supplemented with 20 g of cholesterol / kg of feed and given drinking water with an extract of *Ilex x meserveae* (50 g / L). *In vivo* studies determined: weight gain, hematological parameters of blood (WBC, RBC, HGB, PLT, MCV, MCH, MCHC), biochemical parameters (glucose, NEFA, total protein, albumin, creatinine, TC, HDL, TG, ASPAT , ALAT and immunological parameters of IgG, IgM, IL-6 and IL-10). Histological and morphometric examinations of the kidneys, liver, intestines and heart were also performed. The obtained results were subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements. The fulfillment of the ANOVA assumptions was checked with the SW-W test (normality) and the Bartlett test (equality of

variance). Differences between the means were tested with HSD Tukey test. Among the tested cultivars, *Ilex* Sp. cultivar *Ilex x meserveae* 'Blue Angel' had the highest content of chlorogenic acid 15.49% PP and the lowest content had *Ilex paraguariensis* - 9.34% PP. Rutin was the second important polyphenolic compound in the examined extracts, the highest amount was found for *Ilex x meserveae* 'Blue Angel' (21.29% PP) and the lowest for *Ilex paraguariensis* (9.30% PP). Among the examined extracts from European *Ilex* taxa, the methanol extract from *I. x meserveae* was characterized by the highest antioxidant activity. Supplementation of experimental animals with aqueous extracts of *I. paraguariensis* and *I. x meserveae* significantly ($p \leq 0.01$) reduced the weight gain in the entire experimental period as compared to the control (K), similarly for the groups with the addition of cholesterol these differences for YMCH and IMCH were 3.13g and 3.5g compared to the KCH control. The *I. x meserveae* extracts used in the hypercholesterolomic diet inhibited the intensification of lipolysis, but had no effect on the severity of hypertriglyceridemia. With the hypercholesterolomic diet, *I. paraguariensis* caused a significant increase in IL-6, while the use of *I. x meserveae* caused a decrease in the concentration of this interleukin in the blood. The use of *I. x meserveae*, regardless of the type of diet, increases IL-10, while *I. paraguariensis* reduces both IL 6 and IL 10 with a standard diet. hypercholesterolomic. In particular, a protective effect on the liver (prevention of pathological conditions) and the heart (prevents cardiomyopathy) has been observed. Both extracts showed high activity, however the extract of *I. x meserveae* was more active. Increased diuresis was observed in the study groups. The conducted research broadened the knowledge in the field of the prevention of diet-related diseases and constitute a good basis for future research works, including those relevant to the prevention of certain civilization diseases with the use of native plant species.

Key words: *Ilex paraguariensis*, *Ilex* spp., Wistar rats, polyphenols, saponins, hypercholesterolemia, oxidative stress

Anna Zygzykowska - Noduliste