

STRESZCZENIE

Choroby układu sercowo-naczyniowego są główną przyczyną śmiertelności w krajach rozwiniętych. Stąd też rośnie zainteresowanie opracowaniem nowych terapii profilaktycznych i leczniczych, pomocnych w zwalczaniu tych schorzeń. W grupie środków leczniczych przydatnych w działaniach profilaktycznych i terapii chorób cywilizacyjnych, coraz większą rolę odgrywają preparaty pochodzenia roślinnego.

Rodzaj *Rheum* L. (rzewień, rabarbar) od dawna jest znany w różnych regionach świata, nie tylko jako źródło gatunków jadalnych, ale także jako ceniony surowiec zielarski. Wiele aspektów działania tych roślin na organizm człowieka pozostaje jednak słabo opisanych, a ich stosowanie w wielu przypadkach opiera się jedynie na danych pochodzących z medycyny tradycyjnej. Celem prowadzonych badań była ocena wpływu ekstraktów z dwóch gatunków rzewienia - *Rheum rhaponticum* L. oraz *Rheum rhabarbarum* L. oraz typowych dla tych roślin stilbenów na funkcjonowanie wybranych osoczowych i komórkowych składników układu hemostazy. Badania skupiały się na aktywnościach biologicznych wskazywanych jako jedne z kluczowych dla kardioprotekcyjnego działania substancji naturalnych i obejmowały działanie przeciwzapalne, antykoagulacyjne/przeciwzakrzepowe oraz przeciwutleniające. Oceniano efektywność działania ekstraktów (frakcje butanolowe) z korzeni oraz ogonków liściowych wyżej wspomnianych gatunków rzewienia oraz obecnych tych roślinach pochodnych stilbenu: rapontygeniny i rapontycyny.

Plan badań obejmował zastosowanie modeli eksperymentalnych ściśle związanych z fizjologią układu sercowo-naczyniowego i hemostazą, tj. komórek śródbłonna ściany naczyniowej, leukocytów oraz osoczowych składników układu hemostazy (w tym kluczowych białek kaskady krzepnięcia krwi oraz układu fibrynolitycznego). W celu uzyskania jak najszerszego obrazu aktywności biologicznej badanych substancji, zastosowano zróżnicowany panel metod analitycznych: badania ekspresji genów, testy skринingowe inhibitorów, oznaczenia spektrofotometryczne i fluorometryczne, kinetyczną analizę aktywności enzymów, monitorowanie procesu krzepnięcia osocza krwi (oznaczenia turbidymetryczne), testy ELISA, mikroskopię fluorescencyjną, elektroforezę 1D oraz profilowanie wielocytokinowe oparte na technice blottingu.

Badane substancje roślinne zmniejszały odpowiedź zapalną komórek śródbłonna (HUVECs), działając na różnych poziomach molekularnych (modulacji ekspresji genów, hamowania uwalniania czynników prozapalnych oraz redukcji adhezji komórek). Odnotowano istotny spadek uwalniania markerów/białek odpowiedzi zapalnej (np. TNF- α ,

IL-2, MMP-9). Wykazano również właściwości antykoagluacyjne badanych ekstraktów, co może przekładać się na efekt przeciwwzakrzepowy. Ekstrakty z rzewienia hamowały proces krzepnięcia krwi indukowany czynnikiem tkankowym, stanowiącym główny fizjologiczny szlak aktywacji hemostazy osoczowej. Analizy bezpośredniego wpływu badanych substancji roślinnych na kluczowe proteazy serynowe kaskady krzepnięcia: trombinę i czynnik Xa wskazują, że obserwowany efekt antykoagulacyjny może być wynikiem inhibicji tych czynników. Ponadto, po raz pierwszy wykazano również zdolność badanych ekstraktów z rzewienia i stilbenów do ograniczania uszkodzeń składników osocza, wywołanych stresem oksydacyjnym.

Przeprowadzone badania dostarczyły nowych informacji na temat właściwości biologicznych metabolitów rzewienia w kontekście kardioprotekcyjnym, a uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych prac badawczych.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality in developed countries. Hence, there is a growing interest in the development of new preventive and therapeutic therapies to help combat these diseases. In the group of agents useful in prophylaxis and therapy of civilization diseases, preparations of plant origin play an increasingly important role.

The *Rheum* L. (rhubarb) genus has long been known in various regions of the world, not only as a source of edible species, but also as a valuable herbal material. However, many aspects of the effects of these plants on the human body remain poorly described, and in numerous cases, their use is still based only on data derived from traditional medicine. The aim of this study was to assess the effect of extracts from two species of rhubarb - *Rheum rhaponticum* L. and *Rheum rhabarbarum* L. and stilbenes typical for these plants on functions of selected plasma and cellular components of the haemostatic system. The work was focused on biological activities indicated as the key to the cardioprotective effect of natural substances, and included anti-inflammatory, anticoagulant/antithrombotic and antioxidant effects. Effectiveness of extracts (butanol fractions) from the roots and petioles of the above-mentioned rhubarb species and the stilbene derivatives that are present in these plants, *i.e.* rhapontigenin and rhaponticin, was evaluated.

The study design included the use of experimental models closely related to the physiology of the cardiovascular system and haemostasis, *i.e.* endothelial cells, leukocytes and plasma components of the haemostasis system (including key proteins of the blood coagulation cascade and the fibrinolytic system). To obtain the most comprehensive insight into the biological activity of the examined substances, a diverse panel of analytical methods was used: gene expression studies, inhibitor screening tests, spectrophotometric and fluorimetric assays, kinetic analysis of enzyme activity, monitoring of the blood plasma coagulation process (turbidimetric assays), ELISA, fluorescence microscopy, 1D-electrophoresis and the blotting-based multicytokine profiling.

The examined plant substances reduced the inflammatory response of endothelial cells (HUVECs), acting at various molecular levels (modulation of gene expression, inhibition of the release of pro-inflammatory factors and reduction of cell adhesion). There was a significant decrease in the release of inflammatory response markers/proteins (*e.g.* TNF- α , IL-2, MMP-9). The anticoagulant properties of the examined extracts were also demonstrated, which may result in an antithrombotic effect. Rhubarb extracts inhibited the blood plasma coagulation process, induced by the tissue factor, which is the main physiological pathway of

the blood plasma hemostasis activation. Analyzes of direct effects of the examined plant substances on the key serine proteases of the coagulation cascade: thrombin and factor Xa indicated that the observed anticoagulant effect might be a result of inhibition of these factors. Furthermore, for the first time, the ability of the investigated rhubarb extracts and stilbenes to reduce the oxidative stress-induced damage to plasma components was demonstrated as well.

The executed experiments provided new information on the biological properties of rhubarb metabolites in the cardioprotective context, and the obtained results may be a basis for further research.