

14. Streszczenie

Nadmierna ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (UV) emitowane przez słońce lub sztuczne źródła powoduje oparzenia słoneczne i stany zapalne skóry, a w konsekwencji jest przyczyną fotostarzenia, czy też nowotworów skóry. Uszkodzenia DNA, indukowane promieniowaniem UVA, zachodzą w sposób pośredni, przez tworzenie wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu (ROS), ale także bezpośrednio poprzez indukcję powstawania fotoproduktów - cyklobutanowych dimerów pirymidynowych (CPD). Podwyższony poziom ROS oraz uszkodzenia DNA inicjują kilka kaskad transdukcji sygnału, m.in. z udziałem białka aktywowującego-1 (AP-1) i czynnika jądrowego kappa B (NF-kB) w celu uwolnienia cytokin prozapalnych. Ponadto wytwarzanie ROS prowadzi do oksydacyjnych modyfikacji innych makrocząsteczek i struktur komórkowych (np. białek, błon), co może wywołać śmierć komórki, najczęściej na drodze apoptozy. Miejscowe stosowanie filtrów przeciwsłonecznych wraz z endogenną fotoprotekcją antyoksydacyjną jest ogólną strategią ochrony skóry przed szkodliwym działaniem promieniowania UV. Dotychczas niewiele jest badań dotyczących potencjału fotoochronnego ekstraktów izolowanych z różnych organów i gatunków jesionów, a nieliczne badania nad fotoochronną rolą ekstraktów z liści oliwki i ziaren niepalonej kawy dotyczą głównie fotoochrony przed promieniowaniem UVB. Mechanizmy fotoochronnego działania wybranych surowców roślinnych są słabo poznane.

Zasadniczym celem badań było określenie roli ekstraktów pochodzących z naturalnych surowców roślinnych, z rodziny *Oleaceae* i *Rubiaceae*, w odpowiedzi komórek skóry na promieniowanie UVA. Celem badań była ocena potencjału fotoochronnego ekstraktów z liści oliwki europejskiej (*Olea europaea*) oraz z nasion kawy (*Coffea robusta*), które są popularnymi suplementami diety, a także trzech ekstraktów z surowców zielarskich - kory i liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*) oraz kory jesionu koreańskiego (*F. rhynchophylla*) wobec fibroblastów skóry (linii Hs68) w warunkach *in vitro* oraz poznanie mechanizmów fotoprotekcji. Podstawą hipotezy badawczej było założenie, że badane ekstrakty roślinne chronią ludzkie fibroblasty skóry przed szkodliwymi skutkami promieniowania UVA, ujawniając jednocześnie właściwości antyoksydacyjne, antyapoptotyczne oraz przeciwzapalne.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że wszystkie analizowane ekstrakty roślinne wykazują porównywalne, skuteczne działanie fotoochronne wobec fibroblastów skóry Hs68 poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm²), co wynika

przede wszystkim z ich antyoksydacyjnych właściwości (redukcja stresu oksydacyjnego) i zdolności do hamowania procesu apoptozy (szczególnie na szlaku mitochondrialnym) oraz ograniczania senescencji. Skuteczność zmiatania ROS i hamowania powstawania uszkodzeń DNA w naświetlanych fibroblastach jest porównywalna z działaniem fotoochronnym związku referencyjnego (kwercetyny), co może wynikać z synergistycznego działania składników ekstraktów i/lub z ich większej fotostabilności. Ekstrakty roślinne modulują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne poprzez zmianę równowagi redox za pośrednictwem układu tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny i przyczyniają się do hamowania kaskad, w które zaangażowane są białka p53, AP-1 oraz czynnik transkrypcyjny NFκB, a także powodują aktywację kaskady białka Klotho. Ekstrakty z kory *F. excelsior* i *F. rhynchophylla* oraz ekstrakt z nasion *C. robusta* hamują indukowaną promieniowaniem UVA ekspresję metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, przede wszystkim MMP-1, ale także MMP-3 i MMP-9. Badane ekstrakty wykazują właściwości przeciwzapalne, wpływając na zmniejszenie poziomu interleukiny-2 oraz TNFα wydzielanych przez leukocyty.

Uzyskane wyniki dostarczają nowych dowodów dotyczących ochronnego działania ekstraktów otrzymywanych z nasion kawy, liści oliwki i kory jesionów przed szkodliwym wpływem promieniowania UVA. Otrzymywane z tanich surowców, naturalne, standaryzowane ekstrakty roślinne, bogate w składniki aktywne, takie jak kwasy chlorogenowe, oleuropeina, czy pochodne kumarynowe, dodane do receptury tradycyjnych filtrów UV, mogą poprawić skuteczność ich działania, co jednocześnie umożliwiłoby zmniejszenie zawartości filtrów syntetycznych.

15. Summary

Excessive exposure to ultraviolet (UV) radiation emitted by the sun or artificial sources causes sunburn and skin inflammation, and consequently is the cause of photoaging or skin cancer. DNA damage, induced by UVA radiation, occurs indirectly through the formation of free radicals and other reactive oxygen species (ROS), but also directly through the induction of the formation of photoproducts - cyclobutane pyrimidine dimers (CPD). Increased levels of ROS and DNA damage initiate several cascades of signal transduction, e.g., with activation protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) to release pro-inflammatory cytokines. In addition, the production of ROS leads to oxidative modifications of other macromolecules and cellular structures (e.g., proteins, membranes), which can cause cell death, in majority by apoptosis. Topical application of sunscreens together with endogenous antioxidant photoprotection remains a general strategy to protect the skin from the harmful effects of UV radiation. So far, there are few studies on the photoprotective potential of extracts isolated from various organs and species of ash trees, and the few earlier studies on the photoprotective activities of the olive leaf and green coffee bean extracts have mainly been concerned on protection against UVB radiation. Mechanisms of photoprotective action of selected plant materials are poorly understood.

The main goal of the study was to examine the role of the extracts from natural plant materials of the *Oleaceae* and *Rubiaceae* families, in the response of skin cells to UVA radiation. The aim was to assess the photoprotective potential of the olive (*Olea europaea*) leaf extract and green coffee (*Coffea robusta*) bean extract, which are popular dietary supplements, and three extracts from herbal raw materials - the bark and leaves of the European ash (*Fraxinus excelsior*) and the bark of the Chinese ash (*F. rhynchophylla*) against skin fibroblasts (Hs68 line) as well as to explain the photoprotection mechanisms. We hypothesised that the plant extracts could protect human skin fibroblasts from the harmful effects of UVA radiation, displaying antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory activities.

Based on the results, it can be concluded that all the analyzed plant extracts provided a comparable and effective photoprotection against Hs68 skin fibroblasts exposed to UVA radiation (8 J/cm²), which is primarily due to their antioxidant properties (reduction of oxidative stress) and the ability to inhibit the process of apoptosis (especially the mitochondrial pathway) and limiting the senescence of fibroblasts. The effectiveness of scavenging ROS and inhibiting the formation of DNA damage in UVA-irradiated fibroblasts

is the same as that of the reference compound (quercetin), which may be due to the synergistic effect of the extract components and/or their greater photostability. Plant extracts modulate intracellular signaling pathways by changing the redox balance *via* the thioredoxin/thioredoxin reductase system and contribute to the inhibition of p53, AP-1 and NFκB transcription factor cascades, and activate the Klotho protein cascade. In addition, the extracts from the bark of *F. excelsior* and *F. rhynchophylla* and *C. robusta* seed extract inhibited the UVA-induced expression of matrix metalloproteinases, primarily MMP-1, but also MMP-3 and MMP-9. The extracts displayed anti-inflammatory properties, reducing the the release of interleukin-2 and TNFα from leukocytes.

The results provide new evidence regarding the protective effect of extracts from coffee seeds, olive leaves and ash bark against the harmful effects of UVA radiation. Isolated from cheap raw materials, natural, standardized plant extracts, rich in active ingredients such as chlorogenic acids, oleuropein or coumarin derivatives, added to the formula of traditional UV filters, can improve their effectiveness, which at the same time would allow reducing the content of synthetic filters.