



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Paulina Agnieszka Machała


Rola ekstraktów z surowców roślinnych z rodziny *Oleaceae* i *Rubiaceae* w ochronie komórek skóry przed promieniowaniem UVA

The role of extracts from plant materials from the
Oleaceae and *Rubiaceae* families in the protection of
skin cells against UVA radiation

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej
Instytutu Biochemii

pod kierunkiem dr. hab. Haliny Małgorzaty
Żbikowskiej, prof. UŁ (prof. em)

 Łódź, 2023

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	6
1. Wprowadzenie	13
2. Mechanizmy fotostarzenia skóry – wybrane aspekty ze szczególnym uwzględnieniem skutków działania promieniowania UVA	17
2.1. Uszkodzenia DNA	18
2.2. Stres oksydacyjny	22
2.3. Procesy zapalne	28
2.4. Modyfikacje komórkowych szlaków sygnalizacyjnych	29
2.5. Udział metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej	31
3. Współczesne koncepcje ochrony przeciwsłonecznej	32
3.1. Klasyfikacja i charakterystyka filtrów UV stosowanych w produktach przeciwsłonecznych	33
3.2. Naturalne antyoksydanty i inne dodatkowe składniki aktywne w nowoczesnych kosmetykach przeciwsłonecznych	36
3.3. Bezpieczeństwo filtrów przeciwsłonecznych dla zdrowia i środowiska	38
4. Właściwości biologiczne i prozdrowotne oraz potencjalne zastosowanie ekstraktów roślinnych z surowców pochodzących z wybranych roślin z rodziny <i>Rubiaceae</i> i <i>Oleaceae</i>	40
Część doświadczalna	46
5. Uzasadnienie podjęcia tematu	47
6. Założenia i cele badań	50
7. Materiały	51
7.1. Materiał badawczy	51
7.2. Charakterystyka linii komórkowej	52
7.3. Odczynniki chemiczne	53
7.4. Aparatura	54
8. Metody	55
8.1. Hodowla komórkowa	55
8.1.1. Wysiewanie komórek do inkubacji z badanymi ekstraktami roślinnymi	56
8.2. Oznaczanie profilu fitochemicznego badanych ekstraktów roślinnych	56
8.3. Przygotowanie roztworów macierzystych ekstraktów roślinnych	56
8.3.1. Inkubacja komórek z ekstraktami roślinnymi i naświetlanie	56

8.4. Ocena cytotoksyczności ekstraktów roślinnych	57
8.5. Metody oceny żywotności komórek i poziomu stresu oksydacyjnego	58
8.5.1. Oznaczanie żywotności komórek Hs68 po naświetleniu testem spektrofotometrycznym z CCK-8	58
8.5.2. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekstraktów roślinnych	59
8.5.2.1. Zdolność zmiatania kationorodnika ABTS ⁺	59
8.5.2.2. Metoda FRAP	60
8.5.2.3. Metoda redukcji rodnika DPPH [*]	60
8.5.3. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową (elektroforeza pojedynczej komórki)	61
8.5.4. Określenie poziomu ROS (metoda z H ₂ DCFDA)	62
8.5.5. Oznaczanie poziomu ekspresji reduktazy tioredoksyny	63
8.6. Metody oznaczania procesów śmierci komórkowej z wykorzystaniem markerów apoptozy i senescencji	64
8.6.1. Pomiar odsetka komórek apoptotycznych metodą cytometrii przepływowej	64
8.6.2. Pomiar aktywności kaspaz -8,-9 i -3	65
8.6.3. Oznaczanie aktywności β-galaktozydazy (SA-β-gal)	66
8.7. Oznaczanie stężenia MMP-1, MMP-3 i MMP-9 (test immunoenzymatyczny ELISA)	67
8.8. Oznaczanie poziomu ekspresji wybranych białek sygnałowych (czynników transkrypcyjnych)	68
8.8.1. Pomiar stężenia supresora nowotworu, białka p53	68
8.8.2. Pomiar stężenia czynnika transkrypcyjnego NFκB	69
8.8.3. Pomiar stężenia białka KLOTHO	70
8.8.4. Pomiar stężenia czynnika transkrypcyjnego AP-1	70
8.9. Metody oceny właściwości przeciwzapalnych ekstraktów roślinnych	71
8.9.1. Izolacja PBMCs z kożuszków leukocytarno-płytkowych	71
8.9.2. Inkubacja z ekstraktami i przygotowanie próbek do immunodetekcji cytokin (IL-2 i TNFα)	72
8.9.3. Oznaczanie stężenia IL-2	73
8.9.4. Oznaczanie stężenia TNFα	73
8.10. Wyznaczenie wskaźnika ochrony przeciwsłonecznej (SPF) metodą spektrofotometrii w ultrafiolecie	74
8.12. Analiza statystyczna	75
9. Wyniki	76
9.1. Analiza fitochemiczna	76

9.2. Cytotoksyczność ekstraktów roślinnych	76
9.3. Wpływ ekstraktów roślinnych na żywotność naświetlanych fibroblastów i na parametry stresu oksydacyjnego	77
9.3.1. Żywotność komórek Hs68	77
9.3.2. Całkowity potencjał antyoksydacyjny	79
9.3.3. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową	81
9.3.4. Poziom ROS (metoda z H ₂ DCFDA)	82
9.3.5. Poziom ekspresji reduktazy tioredoksyny	83
9.4. Wpływ ekstraktów roślinnych na drogi śmierci komórkowej indukowanej promieniowaniem UVA	84
9.4.1. Odsetek populacji żywych fibroblastów w hodowli po naświetleniu	84
9.4.2. Właściwości anti-apoptotyczne ekstraktów roślinnych	86
9.4.3. Aktywacja kaspazy -8,-9 i -3	87
9.4.4. Ocena procesu starzenia komórkowego na podstawie aktywności β-galaktozydazy	89
9.5. Analiza poziomu ekspresji metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej	90
9.6. Udział ekstraktów roślinnych w modulacji głównych szlaków sygnałowych biorących udział w odpowiedzi na promieniowanie UVA	92
9.6.1. Poziom ekspresji supresora nowotworu, białka p53	92
9.6.2. Poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego NFκB	93
9.6.3. Poziom ekspresji białka KLOTHO	94
9.6.4. Poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego AP-1	94
9.7. Ocena przeciwzapalnego działania ekstraktów poprzez pomiar stężenia wydzielanych cytokin prozapalnych IL-2 i TNFα (metoda ELISA)	95
9.7.1. Żywotność PBMC	95
9.7.2. Ocena aktywności prozapalnej czynnika martwicy nowotworów – TNFα	96
9.7.4. Ocena działania przeciwzapalnego badanych ekstraktów na podstawie enzymatycznego testu IL-2	98
9.8. Wyznaczenie wskaźnika ochrony przeciwśłonecznej (SPF) metodą spektrofotometrii w ultrafiolecie	99
10. Dyskusja	100
11. Podsumowanie wyników	121
12. Wnioski	123
13. Suplement	124
13.1. Analiza fitochemiczna	124

13.1.1. Analiza jakościowa UHPLC-PDA-ESI-MS ³ - metodyka	124
13.1.2. Analiza ilościowa HPLC- metodyka	124
13.1.3. Opis rezultatów	125
14. Streszczenie	134
15. Summary	136
16. Bibliografia	138
17. Dorobek naukowy	160

Wykaz stosowanych skrótów

4-MBC	– (ang. 4-methyl-benzylidene camphor); 4-metylo-benzylideneno kamfora
5-CQA	– (ang. 5-O-caffeoylquinic acid) kwas 5-O-kawoilochinowy
6-4PP	– (ang. pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct); fotoprodukt 6,4-pirymidyno-pirymidonu
8-oksoGua	– (ang. 8-oxo-7,8-dihydroguanine); 8-oksy-7,8-dihydroguanina (8-oksoguanina)
AA	– (ang. ascorbic acid); kwas askorbinowy
ABTS	– (ang. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
Agaroza LMP	– (ang. Low Melting Point Agarose); agaroza o niskim punkcie topnienia Agaroza NMP – (ang. Normal Melting Point Agarose); agaroza o normalnym punkcie topnienia
Akt	– (ang. protein kinase B); kinaza białkowa B
AlCl ₃	– (nazwa wg IUPAC: aluminium chloride); chlorek glinu
AP	– (ang. apurinic/apyrimidinic site); miejsce apurynowe/apirymidowe (miejsca AP/bezzasadowe)
AP-1	– (ang. activating protein-1); czynnik transkrypcyjny AP-1
APAF-1	– (ang. apoptotic protease activating factor 1); apoptotyczny czynnik aktywujący proteazę 1
ARE	– (ang. antioxidant response element); element odpowiedzi antyoksydacyjnej
ASK1	– (ang. apoptosis signal-regulating kinase 1); kinaza 1 regulująca sygnał apoptozy
ATF4	– (ang. activating transcription factor 4); czynnik transkrypcyjny indukowany stresem oksydacyjnym
ATM	– (ang. ataxia telangiectasia mutated); kinaza białkowa serynowo-treoninowa odpowiedzi na uszkodzenia DNA
ATR	– (ang. ataxia telangiectasia and Rad3-related protein); kinaza odpowiedzi na uszkodzenia DNA
Bax	– (ang. Bcl-2-associated X protein); białko proapoptotyczne
Bcl-2	– (ang. B-cell lymphoma-2 protein); rodzina białek

	antyapoptotycznych
BER	– (ang. base excision repair); naprawa przez wycinanie zasad
bFGF	– (ang. basic fibroblast growth factor); zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BMDBM	– (ang. butyl methoxydibenzoylmethane); metoksydibenzoilometan butylu
Bmk	– (ang. big mitogen-activated protein kinase); kinazy z rodziny MAP
BP	– (ang. benzophenones); benzofenon
BSA	– (ang. Bovine Serum Albumin); albumina surowicy bydlęcej
cAMP	– (ang. Cyclic adenosine monophosphate); cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan
CAT	– (ang. catalase); katalaza
CGA	– (ang. chlorogenic acid); kwas chlorogenowy
CO	– (ang. carbon monoxide); tlenek węgla
COX2	– (ang. cyclooxygenase-2); cyklooksygenaza-2
CPD	– (ang. citrate-phosphate-dextrose); cytrynian trójsodowy, antykoagulant
CRE/TRE	– sekwencje CRE lub TRE (TGA(C/G)TCA)
CytoC	– (ang. cytochrome C); cytochrom C
DAPI	– (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride); dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu
DCF	– (ang. 2,7-dichlorofluorescein); 2',7'-dichlorofluoresceina
DHHB	– (ang. diethylaminohydroxybenzoyl hexyl benzoate); benzoesan dietyloaminohydroksybenzoiloheksylu
DMEM	– (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium); podłoże wzrostowe DMEM
DMSO	– (ang. Dimethylsulfoxide); dimetylosulfotlenek
DPBS	– (ang. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline); buforowana fosforanem sól fizjologiczna
DPPH	– (ang. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
DSB	– (ang. Double Strand Break); pęknięcia dwóch nici DNA

ECM	– (ang. extracellular matrix); macierz pozakomórkowa
EDTA	– (ang. Ethylenediaminetetraacetic acid); kwas etylenodiaminotetraoctowy
EHMC	– (ang. Ethylhexyl Methoxycinnamate); metoksycynamonian etyloheksylu
ERK	– (ang. extracellular signal-regulated kinases); kinazy regulowane sygnałem pozakomórkowym
eV	– (ang. electron volt); jednostka elektronowolta
FapyGua	– (ang. 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine); 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna
FBS	– (ang. Fetal Bovine Serum); bydlęca surowica płodowa
FGF	– (ang. fibroblast growth factor); czynnik wzrostu fibroblastów
FITC	– (ang. fluorescein isothiocyanate); izotiocyanian fluoresceiny
Fos	– podjednostka czynnika transkrypcyjnego AP-1
GADD45	– (ang. growth arrest and DNA damage-inducible 45); białka modulujące odpowiedź komórkową na stres genotoksyczny
GCBE	– (ang. green coffee bean extract); ekstrakt z ziaren zielonej kawy
GPx	– (ang. glutathione peroxidase); peroksydaza glutationowa
GR	– (ang. glutathione reductase); reduktaza glutationowa
GSH	– (ang. glutathione); glutation
GST	– (ang. glutathione S-transferases); S-transferaza glutationowa
H ₂ DCF	– (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein); 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina
H ₂ DCF-DA	– (ang. 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate); dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
HBSS	– (ang. Hank's Buffered Salt Solution); zbuforowany roztwór Hanks'a
HIF-1	– (ang. hypoxia-inducible factor 1); czynnik indukowany przez hipoksję-1
HO	– (ang. heme oxidase); oksydaza hemowa
HPLC	– (ang. high-performance liquid chromatography); wysokosprawna chromatografia cieczowa
HR	– (ang. homologous recombination); rekombinacja homologiczna

HRP	– (ang. Horseradish Peroxidase); peroksydaza chrzanowa
Hs68	– ludzkie fibroblasty skóry
IGF-1	– (ang. insulin-like growth factor 1); insulinopodobny czynnik wzrostu 1
IL	– (ang. Interleukin); interleukina
iNOS	– (ang. inducible nitric oxide synthase); syntaza tlenu azotu/indukowalna NOS
I κ B	– (ang. inhibitor of NF- κ B); inhibitor NF- κ B
Jun (c-Jun)	– (ang. Jun kinase); kinaza białkowa aktywowana stresem (JNK/SAPK), podjednostka czynnika transkrypcyjnego AP-1
KL	– (ang. Klotho); białko Klotho
LAK	– (ang. lymphokine-activated killer cells, LAK cells); limfocyty LAK, niespecyficzne komórki cytotoksyczne
LOOH	– (ang. lipid hydroperoxide); wodoronadtlenek lipidu
Maf	– (ang. Maf proteins); podjednostka Nrf2
MAPK	– (ang. mitogen-activated protein kinases); kinazy aktywowane miogenami
MDA	– (ang. malondialdehyde); dialdehyd malonowy
MED	– (ang. minimal erythema dose); minimalna dawka rumienia
MMP(s)	– (ang. matrix metalloproteinase(s)); metaloproteinaza(y) macierzy pozakomórkowej
NAD(+)	– (ang. nicotinamide adenine dinucleotide); dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADH	– (ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide); dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać zredukowana)
NADPH	– (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NER	– (ang. nucleotide excision repair); naprawa przez wycinanie nukleotydów
NF- κ B	– (ang. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B
NK	– (ang. Natural Killer); komórki układu odpornościowego posiadające właściwości naturalnej cytotoksyczności

NQO1	– (ang. NAD(p)H:quinone oxidoreductase 1); oksydoreduktaza NAD(P)H:chinonu 1
Nrf2	– (ang. nuclear erythroid-2 related factor 2); czynnik jądrowy erytroid 2-pochodny/ czynnik transkrypcyjny
OC	– (ang. octocrylene); oktokrylen
OCS	– (ang. ethylhexyl salicylate); salicylan 2-etyloheksylu (salicylan oktylu)
OGG1	– (ang. oxoguanine glycosylase); glikozylaza 8-oksoGua
OLE	– (ang. Olive leaf extract); ekstrakt z liści oliwki europejskiej (<i>Olea europaea</i> L.)
p21	– (ang. protein 21); białko oddziałujące z CDK1/inhibitor kinaz zależnych od cyklin
p38 MAPK	– (ang. p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase); białko p38 należące do klasy kinaz MAP
p45	– (ang. protein p45, Nrf2 subunit); podjednostka białka Nrf2
p53	– (ang. tumor protein p53); białko kodowane przez gen supresorowy TP53
PABA	– (ang. para-aminobenzoic acid); kwas p-aminobenzoowy
PARP	– (ang. poly(ADP-ribose)polymerase); polimeraza Poli(ADP-rybozy)
PBMCs	– (ang. peripheral blood mononuclear cells); komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
PBS	– (ang. Phosphate Buffered Saline); zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PCNA	– (ang. proliferating cell nuclear antigen); jądrowy antygen komórek proliferujących
PI	– (ang. propidium iodide); jodek propidyny
PKC	– (ang. protein kinase C); kinaza białkowa C
pNA	– (ang. <i>p</i> -nitroaniline); 4-nitroanilina
PS	– (ang. phosphatidylserine); fosfatydyloseryna
PVDF	– (ang. polyvinylidene difluoride); polifluorek winylidenu
QU	– (ang. quercetin); kwercetyna
RIPA	– (ang. radioimmunoprecipitation assay buffer); bufor lizujący

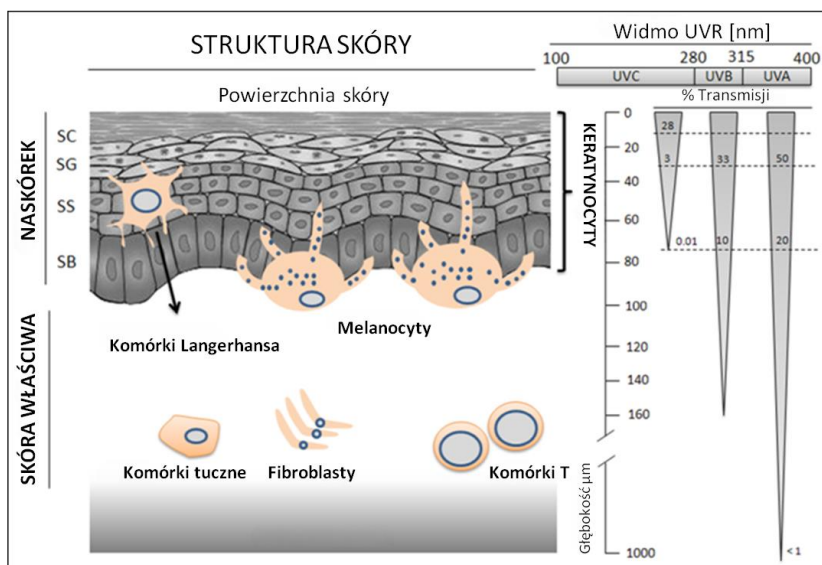
RNS	– (ang. reactive nitrogen species); reaktywne formy azotu (RFA)
ROS	– (ang. Reactive Oxygen Species); reaktywne formy tlenu (RFT)
RPA	– (ang. replication protein A); białko replikacyjne A
RPMI	– (ang. Roswell Park Memorial Institute medium); medium wzrostowe RPMI
RUT	– (ang. rutin); rutyna
SASP	– (ang. senescence-associated secretory phenotype); fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem
SA-β-GAL	– (ang. senescence-associated beta-galactosidase); β-galaktozydaza związana ze starzeniem
SCGE	– (ang. single cell gel electrophoresis); elektroforeza pojedynczej komórki
SDS	– (ang. Sodium Dodecyl Sulfate); siarczan dodecylu sodu
SIPS	– (ang. stress-induced premature senescence); przedwczesne starzenie wywołane czynnikami stresowymi
SIRT	– (ang. sirtuins); sirtuiny
Smad	– (ang. suppressor of mothers against decapentaplegic); rodzina białek zaangażowanych w przekaznictwo sygnału indukowanego TNFα
SOD	– (ang. superoxide dismutase); dysmutaza nadtlenkowa
SPF	– (ang. Sun Protection Factor); współczynnik aktywności (ochrony) przeciwsłonecznej
SSB	– (ang. Single Strand Break); pęknięcia pojedynczej nici DNA
SSBR	– (ang. single-strand break repair); naprawa pęknięć pojedynczych
TAC	– (ang. total antioxidant capacity); całkowity potencjał antyoksydacyjny
TiO ₂	– (nazwa wg IUPAC: Titanium Dioxide); dwutlenek tytanu/ tlenek tytanu (IV)
TLR-4	– (ang. Toll-like Receptor 4); receptor Toll-podobny 4
TMB	– (ang. 3,3',5,5' tetramethylbenzidine); 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna, substrat chromogenny
TNF	– (ang. Tumor Necrosis Factor); czynnik martwicy nowotworu
TPTZ	– (ang. 2,4,6-tripyridyl-s-triazine); 2,4,6-tripirydylo-s- triazyna

Trx	– (ang. thioredoxin); tioredoksyna
TrxR	– (ang. Thioredoxin reductase); reduktaza tioredoksyny
UV	– (ang. ultrafiolet); promieniowanie ultrafioletowe
VEGF	– (ang. vascular endothelial growth factor); czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
Wnt	– (ang. Wnt Signal transduction pathway); szlak sygnalizacyjny Wnt
WST-8	– (ang. water-soluble tetrazolium salt); rozpuszczalna w wodzie sól tetrazolowa
XP	– (ang. Xeroderma pigmentosum); skóra pergaminowa (schorzenie)
XRCC1	– (ang. X-ray repair cross-complementing protein 1); białko naprawy DNA
Z	– (ang. 2,2,4-triamino-5-(2 <i>H</i>)-oxazolone); 2,2,4-triamino-5-(2 <i>H</i>)-oksazolone
ZnO	– (nazwa wg IUPAC: Oxozinc); tlenek cynku

1. Wprowadzenie

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest emitowane przez słońce, jak i przez sztuczne źródła, takie jak lampy emitujące UV używane głównie do celów diagnostycznych i terapeutycznych oraz w solariach. Promieniowanie UV ma korzystny wpływ na zdrowie człowieka i odgrywa zasadniczą rolę w syntezie witaminy D, jednak istnieje też szereg szkodliwych skutków zdrowotnych w wyniku nadmiernej ekspozycji. Wielokrotna ekspozycja na promieniowanie UV przy mniejszych dawkach powoduje opaleniznę, jednocześnie jednak przyspiesza starzenie się skóry, zwane fotostarzeniem (Ansary i wsp., 2021), a także może być przyczyną powstawania raka skóry (Cadet i Douki, 2018; Jin i wsp., 2022). Nasłonecznienie (natężenie promieniowania słonecznego padającego na daną powierzchnię w określonym czasie) zależy od kilku parametrów geologicznych i środowiskowych, w tym szerokości geograficznej, pory roku i dnia, warunków meteorologicznych i grubości warstwy ozonowej (Battie i wsp., 2014). Promieniowanie UV można podzielić na trzy typy według długości fali: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) i UVC (100-280 nm). Wśród nich prawie całość promieniowania UVC i większość UVB są pochłaniane przez warstwę ozonową, nie wywierając żadnego wpływu na naszą skórę. Pozostała część promieniowania UVB docierająca do Ziemi (około 5%), może przenikać przez naskórek i przy nadmiernej ekspozycji może powodować rumień i oparzenia słoneczne, podczas gdy UVA może wnikać głębiej, aż do warstwy skóry właściwej, dlatego też jest głównie (w około 98%) odpowiedzialne za przedwczesne starzenie się skóry (Kageyama i Waditee-Sirisattha, 2019; Ansary i wsp., 2021). Głębokość, na jaką promieniowanie UV może przenikać przez skórę jest wprost proporcjonalna do długości fali promieni UV (Ryc. 1). Początkowo uważano UVB za główny czynnik odpowiedzialny za szkodliwe skutki działania promieniowania słonecznego. Jednak udowodniono, że UVA, mimo że ma mniejszą energię niż UVB, w rzeczywistości jest bardziej szkodliwe dla skóry niż powszechnie sądzono, ponieważ jest bardziej rozpowszechnionym składnikiem promieniowania słonecznego (ok. 95% tego typu promieniowania dociera do Ziemi), penetruje głębsze warstwy skóry, wywołując rozległe zmiany tkanki łącznej skóry. Procentowy rozkład promieniowania UV w skórze po ekspozycji na promieniowanie słoneczne wygląda następująco: około 70% promieniowania UVB pochłaniane jest przez warstwę rogową naskórka, 20% dociera do warstwy komórek żywych naskórka, a tylko ok.10% dociera do warstwy skóry właściwej. Natomiast UVA częściowo pochłaniane jest przez naskórek, ale aż

20-30% dociera do warstwy skóry właściwej (Battie i wsp., 2014). Promienie UVA są więc w stanie wnikać w głąb naskórka i skóry właściwej, gdzie powodują wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species), takich jak anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik hydroksylowy oraz nadtlenek wodoru i tlen singletowy. ROS oddziałując z bogatymi w lipidy błonami, a także białkami/enzymami i DNA komórek skóry, zmieniają ich strukturę oraz zaburzają prawidłowe funkcjonowanie. Dostępne dane literaturowe wskazują, że częsta ekspozycja na promieniowanie UVA przyczynia się do akumulacji uszkodzeń oksydacyjnych, prowadząc w konsekwencji do procesu zapalnego, fotostarzenia oraz fotokarcynogenezy (Cadet i wsp., 2015; Cadet i Douki, 2018, Jin i wsp., 2022). W ostatnich latach coraz więcej uwagi koncentruje się na badaniach nad szkodliwością promieniowania UVA, a ich głównym celem jest określenie zmian zachodzących w docelowych biologicznych cząsteczkach (ang. UVA targets) i wynikających z nich modyfikacji procesów komórkowych, które prowadzą do upośledzenia funkcji komórek skóry i degradacji tkanek (Battie i wsp., 2014).

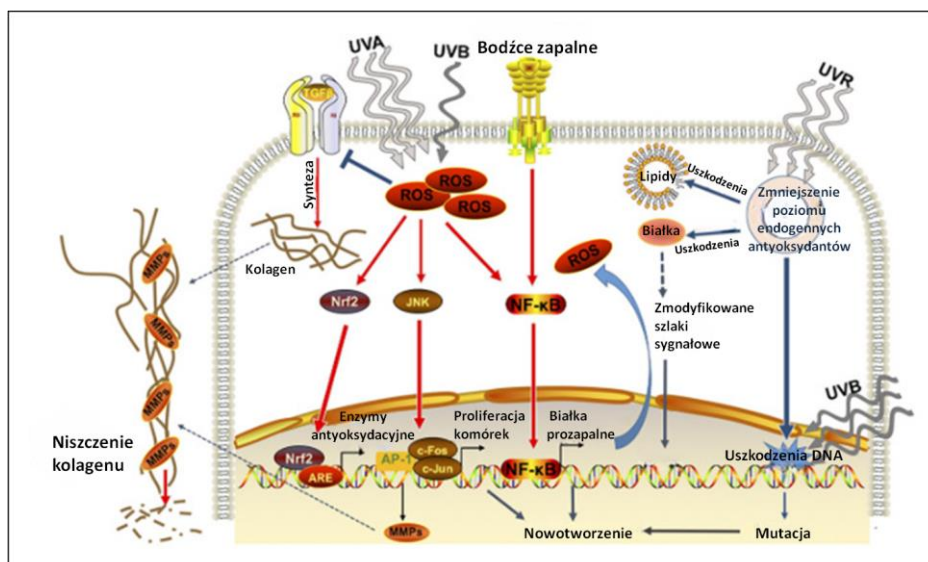


Ryc. 1. Głębokość penetracji skóry przez UV w zależności od długości fali promieniowania (wg Lee i wsp., 2013; zmodyfikowana).

Zarówno promieniowanie UVB, jak i UVA zostały zaklasyfikowane do czynników rakotwórczych klasy I przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Badań nad Rakiem (ang. IACR; International Association for Cancer Research) (Cadet i Douki 2018). Promieniowanie UV może indukować inicjację karcynogenezy, co wynika z jego zdolności do tworzenia uszkodzeń DNA i indukcji mutacji w protoonkogenach i genach supresorowych nowotworów, jak p53. Procesy te są spowodowane bezpośrednią absorpcją UVB, które

wywołują dimeryzację zasad pirymidynowych w DNA. Promieniowanie UVA uszkadza DNA w sposób zależny od tlenu, obejmujący reakcje fotouczulania (sensybilizacji). Powstające w tych reakcjach reaktywne formy tlenu i azotu prowadzą do uszkodzeń DNA, takich jak powstawanie oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad i nukleotydów w postaci m.in. 8-okso-7,8-dihydroguaniny (8-oksoGua) oraz pęknięć pojedynczej nici (SSB, ang. single-strand break) (Cadet i Douki, 2018; Baptista i wsp., 2021). 8-oksoGua ma wysoki potencjał mutagenny prowadzący do transwersji G:C do T:A, które zaobserwowano w onkogenach i genach supresorowych (np. p53), odgrywających ważną rolę w karcynogenezie (Zahra i wsp., 2021).

Jak przedstawiono na Ryc. 2, oprócz stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA w mechanizmie zarówno fotostarzenia, jak i fotokarcynogenezy istotną rolę odgrywają także procesy zapalne oraz modyfikacje komórkowych szlaków sygnalizacyjnych. Ekspozycja na promieniowanie UV indukuje powstawanie ROS. Wzrost poziomu ROS powoduje zachwianie równowagi między oksydantami i antyoksydantami, generując stres oksydacyjny, który z kolei uszkadza lipidy i białka. Stres oksydacyjny prowadzi również do uszkodzeń DNA, które powstają też w sposób bezpośredni. Podwyższony poziom ROS powoduje aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak Nrf2, JNK i NF- κ B, które wiążą się odpowiednio z ich specyficznymi sekwencjami DNA, elementem reagującym na przeciwutleniacze (ARE), AP-1 (c-Fos/c-Jun) i NF- κ B (Dunaway i wsp., 2018). Wśród dalszych celów tych czynników transkrypcyjnych są przeciwutleniacze fazy II i geny związane z promocją proliferacji komórek i syntezą mediatorów prozapalnych (tj. COX-2, prostaglandyny E2, interleukiny). Stan zapalny powoduje obrzęk, rumień oraz dodatkowo zwiększa powstawanie ROS. Modyfikacje oksydacyjne lipidów i białek prowadzą do zaburzeń sygnalizacji komórkowej, potencjalnie sprzyjających karcynogenezie. Ponadto stres oksydacyjny wzmacnia syntezę i uwalnianie metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs, ang. Matrix metalloproteinases), stanowiących biomarker starzenia się skóry, które degradują kolagen.



Ryc. 2. Wpływ słonecznego promieniowania ultrafioletowego na skórę. Uproszczone przedstawienie wpływu promieniowania UV na komórki naskórka/skóry (wg Dunaway i wsp., 2018; zmodyfikowana).

Wzrost częstości występowania schorzeń skóry (w tym nowotworów) oraz propagowanie zdrowego stylu życia i młodo wyglądającej skóry powoduje duże zainteresowanie społeczności naukowej badaniami nad opracowywaniem nowoczesnych, ulepszonych fotoochronnych produktów kosmetycznych (Dunaway i wsp., 2018). Nowatorskie receptury mają na celu przede wszystkim zminimalizowanie ryzyka raka skóry oraz oznak fotostarzenia (Shah i Mahajan, 2013). Promieniowanie UV zmniejsza endogenną ochronę antyoksydacyjną, dlatego zasadne jest dostarczanie egzogennych przeciwutleniaczy celem wzmocnienia właściwości obronnych organizmu przed środowiskowym stresem oksydacyjnym, w tym przed szkodliwym działaniem promieniowania UV (Poljśak i Fink, 2014). Reakcje zapalne pojawiające się po wydłużonej ekspozycji skóry na promieniowanie UV dodatkowo mogą przyspieszać procesy starzenia, stąd alternatywą dla egzogennych antyoksydantów mogą być fitozwiązki o działaniu przeciwzapalnym. Zapobieganie fotostarzeniu skóry i chorobom związanym z przedawkowaniem promieniowania UV obejmuje fotoprotekcję pierwotną i wtórną. Pierwsza jest oparta na miejscowym stosowaniu filtrów przeciwsłonecznych, które pochłaniają lub odbijają promieniowanie UV, druga natomiast polega na ogólnoustrojowym działaniu witamin i fitozwiązków zdolnych do hamowania dysfunkcji komórek narażonych na stres oksydacyjny. Udowodniono, że wiele różnych związków naturalnych wykazuje korzystne działanie wspierające skuteczną ochronę skóry przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem UV (Daré i wsp., 2020).

2. Mechanizmy fotostarzenia skóry – wybrane aspekty ze szczególnym uwzględnieniem skutków działania promieniowania UVA

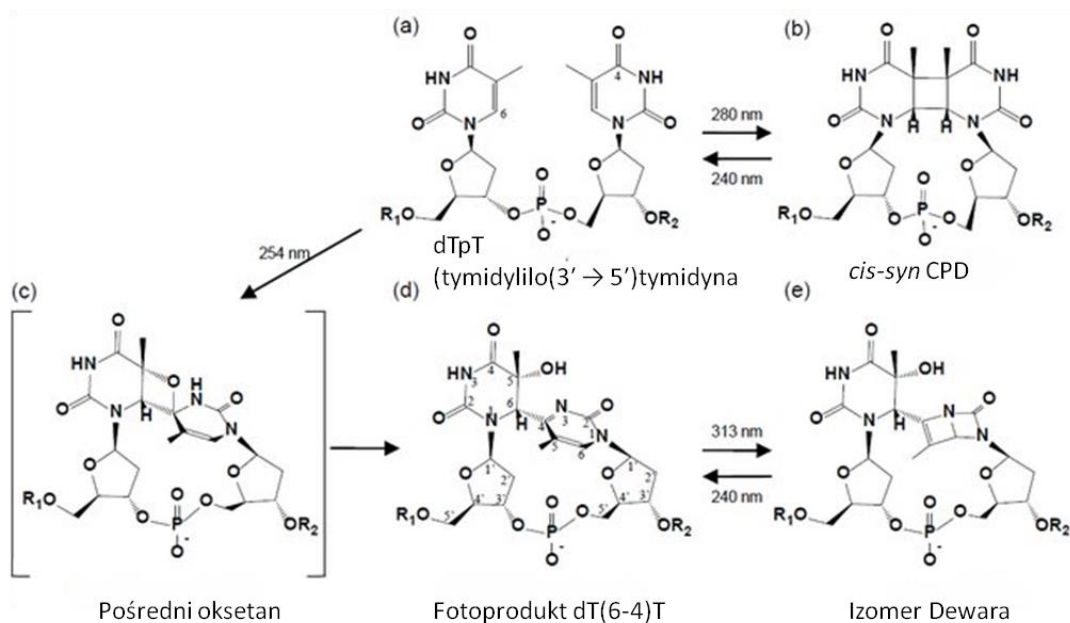
Fotostarzenie skóry to uszkodzenia spowodowane nadmierną i wielokrotną ekspozycją na promieniowanie UV. Według dostępnych danych (Iakovou i Kourti, 2022), aż 80% objawów starzenia skóry wynika z działania promieniowania słonecznego. Dotychczasowe badania dostarczyły wielu dowodów na to, że promieniowanie UVA znacząco przyczynia się do pogorszenia struktury skóry oraz klinicznych objawów fotostarzenia (Battie i wsp., 2014; Ansary i wsp., 2021). Obecnie uważa się, że ten typ promieniowania UV jest jednym z najważniejszych czynników środowiskowych powodujących fotouszkodzenia i przyspieszających starzenie się skóry (Battie i wsp., 2014). Charakterystycznymi objawami fotostarzenia są szorstkość i pogrubienie skóry, zwiotczenie oraz pojawianie się zmarszczek i przebarwień. Poza tym dochodzi do fragmentacji kolagenu w skórze, zwiększonej ilości glikozaminoglikanów i proteoglikanów, wzrostu markerów stanu zapalnego (mastocytów, eozynofili, komórek jednojądrzastych) i melanogenezy (Poon i wsp., 2015). Warto podkreślić, że widoczne efekty fotostarzenia zależą od typu skóry. Osoby z typem skóry I i II według Fitzpatricka wykazują objawy skóry zanikowej z mniejszą liczbą zmarszczek i przednowotworowymi zmianami dysplastycznymi, takimi jak rogowacenie słoneczne. Dla porównania, skóra typu III i IV wykazuje cechy hipertrofii z wyraźnymi zmarszczkami (skórzastą skórą) i plamami soczewicowatymi, może mieć również żółtawy wygląd wynikający z elastozy. Dodatkowo, zmiany w unaczynieniu skóry w następstwie nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV mogą również prowadzić do rozszerzenia naczyń krwionośnych, które klinicznie objawiają się jako teleangiektazje (Poon i wsp., 2015).

Starzenie ma zupełnie inny przebieg w zależności od tego, czy uwzględnia się naskórek, czy warstwę skóry właściwej. O ile w naskórku jest to głównie stopniowy proces rogowacenia polegający na sieciowaniu różnych białek, w warstwie skóry właściwej główną rolę w procesie starzenia odgrywa degradacja ECM, skutkiem której są drobne zmarszczki powstające w wyniku ubytku kolagenu, włókien elastyny i kwasu hialuronowego (Rinnerthaler i wsp., 2015; Salminen i wsp., 2022). MMPs odpowiadają za degradację włókien elastyny, kolagenów i proteoglikanów (Oh i wsp., 2020). Włókna elastynowe są strukturami bogatymi w mikrowłókna elastyny i inne białka. Elastyna i kolagen to glikoproteiny zawierające różne układy rozgałęzionych łańcuchów oligosacharydowych, podczas gdy proteoglikany składają się z jednego długiego, nierozgałęzionego łańcucha bocznego glikozaminoglikanu. Glikoproteiny są połączone ze sobą kwasem hialuronowym

i budują sieć skórną. Długie włókna kolagenowe, utworzone przez kolagen I i III są splecione, tworząc sieć zakotwiczoną w warstwie skóra-naskórek poprzez kolagen typu VII (Rinnerthaler i wsp., 2015). Podczas samoistnego starzenia się włókna kolagenowe i elastynowe pozostają nienaruszone, jedynie oddalają się od siebie, tworząc szerszą, pofałdowaną sieć. Fotostarzenie, któremu towarzyszą zwiększony poziom ROS, uszkodzenia oksydacyjne składników struktur komórkowych, uwalnianie metaloproteinaz, a przede wszystkim degradacja kolagenu, jest związane z utratą kolagenu typu I, III i VII. Długie włókna kolagenowe, elastynowe, glikoproteiny i glikozaminoglikany nie tworzą już funkcjonalnej sieci, lecz nieuporządkowaną (chaotyczną) strukturę. Proces degradacji w wyniku nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV dodatkowo przyspieszają elastazy wytwarzane przez neutrofile, które migrują do warstwy skóry właściwej (Saguie i wsp., 2021; Rinnerthaler i wsp., 2015). Reakcje fizjologiczne w odpowiedzi na działanie promieniowania UV zachodzą we wszystkich typach komórek i narządów, jednak najbardziej są na nie narażone komórki skóry (ze względu na chroniczną ekspozycję na promieniowanie UV).

2.1. Uszkodzenia DNA

Zdolność uszkodzania genomowego DNA, bezpośrednio, jak i w sposób pośredni poprzez ROS, jest dość dobrze poznanym skutkiem działania promieniowania UV (Khan i wsp., 2018). Przeprowadzono wiele badań, by określić rolę promieniowania UV w generowaniu uszkodzeń DNA i modulowaniu późniejszych odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórkach skóry (Cadet i wsp., 2009, Khan i wsp., 2018). Promieniowanie UVB poprzez bezpośrednie wzbudzenie nukleozasad pirymidynowych generuje, w sposób niezależny od tlenu, dwie główne klasy fotoproduktów bipirymidynowych, w tym CPD (ang. cyclobutane pyrimidine dimer) oraz fotoprodukty 6,4-pirymidyno-pirymidonu 6-4PP (ang. pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct). Po naświetlaniu komórek ludzkiej skóry promieniowaniem UVA również zidentyfikowano fotoprodukty bipirymidynowe, głównie CPD zawierające tyminę w jądrowym DNA (Cadet i wsp., 2015; Mouret i wsp., 2011). Ponadto fotony UVA są bardziej wydajne w przekształcaniu 6-4PP wytworzonych pod wpływem UVB w pokrewne izomery Dewara (Cadet i wsp., 2015). Izomery walencyjne Dewara są produktami fotoizomeryzacji fotoproduktów pirymidyny (6-4) pirymidonu, głównej klasy uszkodzeń indukowanych przez UV (Douki i wsp., 2016) (Ryc. 3).



Ryc. 3. Fotoprodukty DNA utworzone przez promieniowanie UV. (a) prawidłowy dTpT; (b) dimer *cis-syn* cyklobutanopirymidyny (CPD); (c) pośredni oksetan; (d) Fotoprodukt dT(6-4)T z numeracją atomów; oraz (e) izomer Dewara (wg Yokoyama i Mizutani, 2014; zmodyfikowana).

Ostatnie badania sugerują, iż UVA nie tylko przyczynia się do bezpośredniego tworzenia uszkodzeń DNA, ale także utrudnia usuwanie fotoproduktów z genomowego DNA poprzez utlenianie i upośledzenie funkcji białek uczestniczących w procesach naprawy DNA (Khan i wsp., 2018). Dotychczas uzyskane dane dotyczące charakteru uszkodzeń DNA, w których pośredniczy UV, w większości bazują na oznaczaniu produktów degradacji DNA metodą HPLC lub pomiarze aktywności enzymów naprawy DNA (Cadet i wsp., 2015). Indukowane przez promieniowanie UV bezpośrednie, jak i pośrednie uszkodzenia DNA, w tym tworzenie fotoproduktów i utlenianie zasad, są następnie do pewnego stopnia naprawiane poprzez wycinanie nukleotydów (NER, ang. nucleotide excision repair), jak i wycinanie zasad (BER, ang. base excision repair). Dimery pirymidynowe, jak CPD i 6-4PP, powstają w wyniku bezpośredniej absorpcji fotonów przez zasady DNA. Powstawanie CPD zaobserwowano już w 1973 roku na modelu *E. coli* (Tyrrell, 1973). Niezależnie Douki i wsp. oraz Mouret i wsp., wykazali biologiczne znaczenie CPD indukowanych przez UVA w komórkach chomika chińskiego (CHO UVL-9) i ludzkiej skóry (komórki skóry pobranej bezpośrednio po operacji plastycznej piersi od zdrowych dawców) (Douki i wsp., 2003; Mouret i wsp., 2006). Pomimo stosunkowo niskiej energii (3.1 -3.9 eV), fotony UVA mogą być absorbowane przez cząsteczki DNA oraz inne chromofory obecne w komórkach skóry

(Moreno i wsp., 2019; Johann To Berens i Molinier, 2020). W naskórku znajdują się chromofory, których widma absorpcyjne mieszczą się w zakresie promieniowania UV, np. feomelanina i produkty pośrednie na drodze tworzenia melaniny, czy też kwas urokanowy. Należą do nich także kwasy nukleinowe oraz aminokwasy aromatyczne (Young, 1997; Saewan i Jimtaisong, 2022). Bezpośrednie wzbudzenie zasad DNA przez fotony promieniowania UV prowadzi do powstania CPD, a także 6-4PP. Te fotoprodukty generują zniekształcenia podwójnej helisy DNA, tworząc fizyczne bariery dla polimeraz transkrypcyjnych (polimerazy RNA), jak również dla polimeraz replikacyjnych DNA, co prowadzi do zaburzeń procesów niezbędnych do prawidłowego metabolizmu komórkowego (Moreno i wsp., 2019; Johann To Berens i Molinier, 2020).

Promieniowanie UVA indukuje różnego typu uszkodzenia DNA poprzez procesy utleniania (za pośrednictwem ROS), w tym tworzenie 8-oksoGua i innych utlenionych zasad, pęknięcia nici DNA, tworzenie miejsc bezzasadowych (apurynowych lub apirymidynowych) oraz wiązania krzyżowe między DNA a białkami (Moreno i wsp., 2019, D`Augustin i wsp., 2020). Pomiar poziomu 8-oksoGua jest często wykorzystywanym markerem w celu identyfikacji stresu oksydacyjnego. Guanina ze względu na potencjał redoks, jest najbardziej podatną na utlenianie zasadą azotową. Forma 8-oksoGua różni się od podstawowej guaniny tylko podstawnikami przy dwóch atomach: C8 i N7, które zawierają tlen zamiast wodoru i wodór zamiast pary elektronów. Taka zmiana jest wysoce mutagenna i jeśli nie zostanie naprawiona umożliwia tworzenie pary z adeniną, tworząc transwersję G:C do T:A. Po dalszej replikacji ta transwersja jest utrwalana, co wpływa na mutagenność (Cadet i Douki, 2018). Jednym z najwcześniejszych etapów naprawy jest rozpoznanie i usuwanie zmian przez glikozylazę DNA. W przypadku 8-oksoGua w procesie naprawy pośredniczy glikozylaza 8-oksoGua (OGG1, ang. oxoguanine glycosylase), która najpierw usuwa uszkodzenia poprzez hydrolizę wiązania glikozydowego, tworząc miejsca apurynowe/apirymidynowe (AP). Miejsce AP jest przetwarzane przez kolejne enzymy szlaku naprawy (Cadet i Douki, 2018; D`Augustin i wsp., 2020; Zahra i wsp., 2021). W odpowiedzi może również dochodzić do aktywacji polimerazy Poli-(ADP)-rybozy (PARP-1; ang. poly(ADP-ribose) polymerase 1). Aktywatorem PARP-1 są przerwy w jednej z dwóch nici DNA. Rekrutacja pozostałych czynników naprawy, XRCC1 (ang. X-ray repair cross-complementing protein 1), białek szkieletowych, polimerazy DNA beta i ligazy DNA, prowadzi do naprawy (Kumar i wsp., 2020).

Oprócz utlenionych zasad, po ekspozycji na promieniowanie UVA mogą również być generowane pęknięcia nici DNA. Pęknięcia pojedynczej nici (SSB, ang. single-strand break)

obejmują hydrolizę szkieletu fosfodiesterowego w jednej nici DNA. SSB uważane są za uszkodzenia, które łatwo naprawić przez re-ligację pęknięć pojedynczej nici (SSBR, ang. single-strand break repair). Rzadkie, nienaprawione SSB prowadzą do tworzenia pęknięć dwuniciowych (DSB, ang. double-strand break). DSB, jeśli nie prowadzą do śmierci komórkowej mogą powodować przegrupowania chromosomów, które charakteryzują genomy komórek rakowych. Dokładny sposób indukcji pęknięć pod wpływem promieniowania UV nie jest do końca poznany. Uważa się, że dimery bipyrimidynowe są bardziej szkodliwe aniżeli utlenione zasady, ponieważ silniej blokują progresję polimeraz replikacyjnych DNA (Khan i wsp., 2018). Zatrzymanie polimeraz replikacyjnych w miejscach takich uszkodzeń mogą prowadzić do załamania widełek replikacyjnych, a zatem dochodzi do tworzenia DSB, które powinny zostać naprawione przez rekombinację homologiczną (HR, ang. homologous recombination) (Khan i wsp., 2018; Tiwari i Wilson, 2019). Zdolność UVA do indukowania pęknięć dwuniciowych DNA jest nadal przedmiotem dyskusji. Podczas, gdy akceptowane jest tworzenie DSB zależne od replikacji, wątpliwe pozostaje tworzenie DSB niezależne od replikacji. Początkowe badania wskazywały na brak indukcji DSB w DNA komórek poddanych działaniu promieniowania UVA (Rizzo i wsp., 2011) ze względu na stosunkowo niską energię fotonów. Ponadto Cadet i Douki argumentowali, że powstawanie DSB z nienaprawionych SSB jest mało prawdopodobne, ponieważ UVA indukuje ponad dwukrotnie więcej 8-oksoGua w porównaniu z SSB (Cadet i wsp., 2015; Cadet i Douki, 2018). Są jednak badania potwierdzające powstawanie DSB w sposób niezależny od replikacji (Greinert i wsp., 2012; Wischermann i wsp., 2008). DSB mogą być generowane przez czynniki utleniające w postaci zgrupowanych uszkodzeń DNA (ang. clusters of lesions), które następnie są przekształcane w DSB podczas procesu naprawy, gdy obie nici są nacinane jednocześnie w bliskiej odległości (1-20 zasad). Niezależne analizy tworzenia γ H2AX, testu kometowego i immunodetekcji uszkodzeń DNA w komórkach zatrzymanych w fazie G1 potwierdzają zdolność UVA do indukowania tych zmian (Greinert i wsp., 2012). W zależności od typu naprawy pęknięć DNA może dojść do mutacji lub delecji genomowego DNA, przykładem mogą być uszkodzenia kinaz powiązanych z sygnalizacją związaną z przerwaniem nici DNA (Khan i wsp., 2018; Tiwari i Wilson, 2019).

Zatrzymanie cyklu komórkowego to ważny etap w zapobieganiu niestabilności genomowej oraz powstawaniu mutacji na skutek uszkodzenia DNA, ponieważ uniemożliwia wejście komórki z uszkodzonym DNA w fazę S (gdzie zmiany zasad mogą być kopiowane) lub mitozę (gdzie pęknięcia mogą prowadzić do utraty informacji genetycznej). Odpowiedzi punktów kontrolnych G1 i G2, które są kontrolowane przez kinazy szlaku odpowiedzi na

uszkodzenia DNA, czyli kinazę ATR (ang. ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) i ATM (ang. ataxia telangiectasia mutated), służą jako bariery nowotworzenia (Khan i wsp., 2018). Jeśli uszkodzenia DNA pozostają nie naprawione (lub źle naprawione) białko p53 kieruje komórkę na szlaki śmierci apoptotycznej. Apoptoza jest mechanizmem, dzięki któremu usuwane są stare lub uszkodzone komórki. Wykazano, że długotrwała ekspozycja na promieniowanie UVA spowalnia proliferację komórek skóry, stopniowo prowadząc do apoptozy (Chen i wsp., 2019a).

Obserwacja, że większość mutacji zbadanych w nowotworach skóry jest zlokalizowana w miejscach dimerów pirymidynowych wskazuje na ich silne właściwości mutagenne. Jednak same właściwości mutagenne różnych klas fotoproduktów nie są wystarczające do ustalenia ich udziału w mutagenezie. Uwzględnić należy także dynamikę procesów naprawy, ponieważ determinuje ona czas istnienia uszkodzeń DNA w genomie, a tym samym możliwość ekspresji ich potencjału mutagennego (Cadet i Douki, 2018). Oprócz zdolności inicjacji nowotworzenia, uszkodzenia DNA mogą prowadzić do uwalniania mediatorów immunosupresyjnych, jak czynnik martwicy nowotworów α (TNF α , ang. tumor necrosis factor α), czy cytokin zapalnych (Brand i wsp., 2018). Dodatkowo ważnym odkryciem jest fakt, że UVA zmniejsza zdolności naprawcze komórek, poprzez utlenianie białek mechanizmów naprawy DNA, takich jak PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen) i RPA (ang. replication protein A). Podsumowując, promieniowanie UVA powoduje dwa współistniejące szkodliwe efekty, powstawanie mutagennych uszkodzeń DNA i zmniejszenie zdolności komórek do ich usuwania (Cadet i Douki, 2018). Ze względu na kluczowe znaczenie dimerów pirymidynowych w procesie kancerogenezy konieczna jest ochrona skóry przed ich tworzeniem. Powstawanie tej klasy uszkodzeń zachodzi na skutek bezpośredniej absorpcji fotonów UVA przez DNA. Najskuteczniejszym sposobem ochrony komórek skóry jest zatem zmniejszenie dawki promieniowania UV docierającego do genomu. Ważną rolę ochronną pełnią naturalne pigmenty, takie jak melanina, a także cząsteczki substancji pochłaniających promieniowanie UV, obecne w filtrach przeciwsłonecznych (Cadet i Douki, 2018, Li i wsp., 2021).

2.2. Stres oksydacyjny

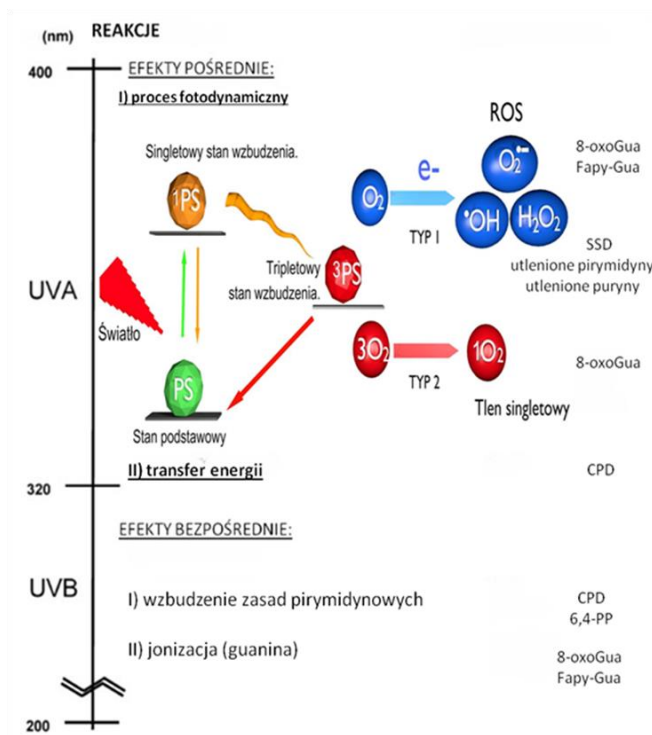
Stres oksydacyjny jest definiowany jako zaburzenie równowagi między poziomem reaktywnych form tlenu (ROS)/azotu (RNS, ang. reactive nitrogen species) a zdolnością organizmu do zapobiegania ich działaniu przez system ochrony antyoksydacyjnej. Stres oksydacyjny powstaje w wyniku zwiększonej generacji ROS/RNS i/lub spadku zdolności

ochronnych endogennych układów antyoksydacyjnych (Pisoschi i Pop, 2015). Wolne rodniki to reaktywne atomy lub cząsteczki posiadające niesparowany elektron (jeden lub więcej) na orbicie zewnętrznej (walencyjnej), jednocześnie zdolne do samodzielnego istnienia. ROS obejmują grupę cząsteczek, które powstają w reakcjach redukcji lub wzbudzenia cząsteczki tlenu (Pisoschi i Pop, 2015; Sies i Jones, 2020). Termin ROS obejmuje zarówno formy wolnorodnikowe, takie jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) czy rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), jak i niewolnorodnikowe, takie jak nadttlenek wodoru (H_2O_2), czy tlen singletowy (1O_2). Spotykane są także reaktywne formy azotu (np. tlenek azotu ($\cdot NO$), nadttlenoazotyn ($ONOO^-$)), żelaza, miedzi i siarki. Występowanie wolnych rodników związane jest z zachodzącymi procesami metabolicznymi, jak i działaniem czynników środowiskowych. Odgrywają one ważną rolę jako cząsteczki sygnałowe, które biorą udział w regulacji proliferacji, apoptozy i ekspresji genów poprzez aktywację/dezaktywację czynników transkrypcyjnych (Pisoschi i Pop, 2015).

Wyjaśnienie mechanizmów szkodliwego działania promieniowania UVA na DNA komórek skóry ściśle wiąże się z określeniem roli ROS, które są generowane przy udziale endogennych fotosensybilizatorów i w wyniku odpowiedzi biochemicznych. Endogenne i egzogenne sensybilizatory (uczulacze) absorbują promieniowanie UVA przechodząc w stan wzbudzony, który często jest stanem tripletowym (Baptista i wsp., 2021; Cadet i Douki, 2018). Po wzbudzeniu reagują bezpośrednio z substratem lub tlenem, zgodnie z dwoma mechanizmami sklasyfikowanymi odpowiednio, jako typ I i II (Ryc. 4). Mechanizm fotouczulania typu I obejmuje głównie reakcje przeniesienia elektronu (lub atomu wodoru) ze wzbudzonego fotouczulacza na substrat i utworzenie rodnikowych form, które oddziałując z tlenem cząsteczkowym generują ROS, przy czym guanina jest preferowanym celem fotosensybilizatora w stanie wzbudzonym. Fotouczulacze typu I, jak ryboflawina czy 2-metylo-1,4-naftochinon, generują w DNA powstawanie produktów, do których należą: 8-oksoGua, FapyGua (2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna) i Z (2,2,4-triamino-5-(2H)-oksazolone) wraz z małymi ilościami kilku typów utlenionych zasad pirymidynowych. W wyniku naświetlania komórek promieniowaniem UVA dochodzi do zwiększonego uwalniania jonu żelazawego, co sprzyja tworzeniu wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$), poprzez redukcję H_2O_2 w reakcji Fentona. Uszkodzenia zasad pirymidynowych generowane przez utlenianie, które obejmują wśród głównych produktów rozkładu 5,6-dihydroksy-5,6-dihydrotyminę, 5-formyluracyl, 5-hydroksymetylouracyl i 5-hydroksycytozynę, wynikają przede wszystkim z początkowej addycji rodnika $\cdot OH$ do podwójnego wiązania w pozycji 5,6 ugrupowania pirymidynowego i usunięcie wodoru

z grupy metylowej tyminy i 5-metylocytozyny. W przypadku guaniny, tworzenie produktów, jak 8-oksoGua, FapyGua, przebiega przez połączenie rodników nadtlenkowych z guaniną, w których pośredniczy $\cdot\text{OH}$ (Cadet i Douki, 2018; Zahra i wsp., 2021). Należy podkreślić, że $\cdot\text{OH}$ może utleniać zarówno zasady purynowe, jak i pirymidynowe, natomiast usunięcie wodoru z ugrupowania cukrowego prowadzi w większości przypadków do pęknięć nici (Cadet i wsp., 2009).

Drugi typ reakcji fotodynamicznych polega na przenoszeniu energii wzbudzenia elektronowego uczulacza na cząsteczkę tlenu (w której tlen jest w stanie trypletowym) z wytworzeniem tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$), którego podstawowym celem w DNA jest guanina. Wykazano, że $^1\text{O}_2$ nie jest w stanie reagować z ugrupowaniem 2-deoksyrybozy, a zatem nie jest w stanie indukować bezpośrednich pęknięć pojedynczej nici (SSB) w DNA (Cadet i Douki, 2018, Brotons i wsp., 2016). Powstawanie pęknięć można wytłumaczyć dalszym utlenianiem 8-oksoGua, które prowadzi do tworzenia stosunkowo niestabilnych produktów utleniania guaniny, takich jak Z, a następnie tworzenia labilnych miejsc bezzasadowych. Tlen singletowy, który jest dominującą formą ROS w reakcjach typu II ma zdolność reagowania nie tylko z kwasami nukleinowymi, ale także z lipidami i aminokwasami, takimi jak Trp (tryptofan, ang. tryptophane), His (histydyna, ang. histidine), czy Met (metionina, ang. methionine) (Baptista i wsp., 2021).



Ryc. 4. Główne reakcje zachodzące w DNA po naświetlaniu promieniowaniem UV (opracowanie własne na podstawie Cadet i wsp., 2009).

Skóra posiada skuteczny system obrony antyoksydacyjnej, jednak nadmierna i/lub wielokrotna ekspozycja na promieniowanie UV może wyczerpać zdolność antyoksydacyjną, prowadząc do modyfikacji oksydacyjnych/uszkodzeń składników komórek skóry i tkanki łącznej, a w konsekwencji do immunotoksyczności, przedwczesnego starzenia się, a nawet powstawania nowotworów skóry (Poljšak i Fink, 2014; Daré i wsp., 2020). Dwie główne kategorie obrony antyoksydacyjnej obejmują antyoksydanty zapobiegające powstawaniu ROS (prewencja) oraz antyoksydanty, które wychwytyują utworzone wolne rodniki (interwencja). Kolejna kategoria to antyoksydanty zaangażowane w procesy naprawcze, które usuwają uszkodzone przez ROS biomolekuły (eliminacja lub naprawa), zanim wpłyną na zmianę metabolizmu lub żywotność komórek (Poljšak i Fink, 2014). Antyoksydanty dzieli się też na enzymy przeciwutleniające i antyoksydanty małowcząsteczkowe. Pierwsza grupa obejmuje m.in., dysmutazę ponadtlenkową (SOD, ang. superoxide dismutase), peroksydazę glutationową (GPx, ang. glutathione peroxidase), reduktazę glutationową (GR, ang. glutathione reductase), katalazę (CAT, ang. catalase) i oksydazę hemową (HO, ang. heme oxidase) oraz tioredoksynę (Trx, ang. thioredoxin) i reduktazę tioredoksyny (TrxR, ang. thioredoxin reductase). Do nieenzymatycznych przeciwutleniaczy o niskiej masie cząsteczkowej zalicza się związki takie jak izoformy witaminy E, witamina C, glutation

(GSH), kwas moczowy i ubichinon (Poljšak i Fink, 2014; Yong i Ahn, 2018). GSH, który jest najważniejszym komórkowym (endogennym) antyoksydantem, działa jako czynnik redukujący, neutralizujący reaktywność wolnych rodników. CAT jest enzymem, który odpowiada za rozkład nadtlenu wodoru, podczas gdy SOD dezaktywuje anionorodnik ponadtlenny (Poljšak i Fink, 2014). W przeciwieństwie do katalazy, peroksydaza glutationowa redukuje szeroką gamę wodoronadtlenków organicznych (ROOH) i nadtlenu wodoru przy użyciu GSH, ostatecznie prowadząc do powstania nieszkodliwych cząsteczek, odpowiednio alkoholu i wody oraz disulfidu glutationu (GS-SG) (Zahra i wsp., 2021). Indukowalna oksydaza hemowa-1 (HO-1) w odpowiedzi na różne bodźce, w tym ekspozycję na promieniowanie UV, jest niezbędna do utrzymania homeostazy komórkowej. System HO może rozkładać hem do biliwerdyny, wolnego żelaza i tlenku węgla. Produkty te uczestniczą w procesach fizjologicznych, w tym w stresie oksydacyjnym, stanach zapalnych i apoptozie. HO-1 jest nie tylko markerem stresu oksydacyjnego, ale ma również właściwości cytoprotekcyjne (Chen i wsp., 2019b). System Trx/TrxR bierze udział w reakcjach wymiany grup tiolowych i wiązań disiarczkowych z licznymi białkami, kontrolując główne funkcje sygnalizacyjne i katalityczne komórek (Sharapov i wsp., 2021).

Zdolność antyoksydacyjna ludzkiego naskórka jest znacznie większa niż skóry właściwej. Badania Sandera i wsp., potwierdziły, że fotouszkodzenia są wynikiem zmniejszonej ekspresji enzymów antyoksydacyjnych (zmiany w aktywności na skutek ekspozycji na promieniowanie UVA), a także wzmożonych modyfikacji oksydacyjnych białek (Sander i wsp., 2002 wg. Poljšak i Fink, 2014; Parzonko i Kiss, 2019). Zbyt wysoki poziom ROS prowadzi do produkcji czynników transkrypcyjnych związanych z apoptozą. Badania wykazały, że naświetlanie komórek skóry (linia HSF) promieniowaniem UVA indukuje wzmożoną produkcję ROS oraz apoptozę (Han i wsp., 2022). Dodatkowo po naświetlaniu UVA spada aktywność SOD, CAT i GSH. Wiele badań potwierdziło, że ekspozycja ludzkiej skóry na promieniowanie UV prowadzi do utleniania biomolekuł komórkowych (Han i wsp., 2022). Struktury lipidowe, szczególnie błony komórkowe są jako pierwsze atakowane przez ROS, ze względu na obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych. Zwykle główne produkty peroksydacji lipidów, wodoronadtlenki lipidów (LOOH), są detoksykowane na szlaku enzymatycznym S-transferaz glutationowych (GST, ang. glutathione S-transferases) (Zahra i wsp., 2021; Sharapov i wsp., 2021). Jednak w przypadku zaburzonej homeostazy z LOOH, które nie uległy detoksykacji tworzą się toksyczne aldehydy, a najbardziej powszechnym jest wysoce reaktywny i mutagenny dialdehyd malonowy (MDA, ang. malondialdehyde). MDA tworzy stabilne wiązania

z grupami –SH białek, ale przede wszystkim z grupami aminowymi (-NH₂) białek, fosfolipidów lub kwasów nukleinowych (połączenia typu zasad Schiffa). MDA jako cząsteczka posiadająca dwie reaktywne grupy aldehydowe, może tworzyć charakterystyczne struktury – mostki amino-3-iminopropenowe, między- i wewnątrzcząsteczkowe, które są przyczyną reakcje sieciowania w tkance skórnej, prowadząc do jej uszkodzeń (Han i wsp., 2022). MDA dociera też do jądra komórkowego, gdzie może wiązać się z zasadami azotowymi, guaniną i cytozyną, tworząc mostki pomiędzy nićmi DNA. Mostki takie hamują proces replikacji, wykazano też ich działanie mutagenne (Zahra i wsp., 2021; Rinnerthaler i wsp., 2015).

Białka również ulegają bezpośrednim i pośrednim modyfikacjom (uszkodzeniom) w wyniku interakcji z ROS. Wpływa to na ich strukturę i funkcję, powodując, m.in. zmiany konformacji, fragmentację łańcucha polipeptydowego, agregację produktów sieciowania białek, zmianę ładunków elektrycznych, zwiększoną podatność na proteolizę, co w konsekwencji powoduje utratę aktywności enzymatycznej, czy też funkcji transportowych w przypadku białek receptorowych (Zahra i wsp., 2021). Modyfikacje pośrednie wiążą się z powstawaniem wtórnych produktów ubocznych. Przykładem może być fragmentacja szkieletu polipeptydowego białka, która następuje po związaniu wcześniej utlenionej glukozy z grupami aminowymi. Bezpośrednie modyfikacje zachodzą przy resztach aminokwasowych w łańcuchach bocznych lub przez tworzenie grup karbonylowych (Rinnerthaler i wsp., 2015). Już we wczesnych badaniach prowadzonych przez Thiele i wsp. zarejestrowano znacznie większy poziom karbonylowanych białek w komórkach ludzkiego naskórka poddanego działaniu promieniowania słonecznego w porównaniu z naskórkiem rzadko eksponowanym na promieniowanie UV, a w warunkach eksperymentalnych już po 30 minutach ekspozycji na promieniowanie UV dochodziło do utleniania białek (Thiele i wsp., 1998). Dodatkowo należy podkreślić, że obserwuje się zjawisko akumulacji produktów utleniania DNA, białek i lipidów, szczególnie w starzejących się komórkach i tkankach (przez lata eksponowanych na promieniowanie UV), co prowadzi do mechanizmu sprzężenia zwrotnego polegającego na zwiększonej produkcji ROS (powstaje tzw. „błędne koło”) (Rinnerthaler i wsp., 2015; Wang P. i wsp., 2019). Konsekwencje oksydacyjnych modyfikacji białek zachodzących w komórce zależą od stopnia ich nasilenia. W początkowym etapie nieznaczny poziom utlenionych molekuł, prowadzi do marginalnie zmniejszonej aktywności enzymatycznej lub zmian termostabilności. Na tym etapie komórka jest w stanie przeciwdziałać zmianom, częściowo naprawiając uszkodzenia (Rinnerthaler i wsp., 2015). Ważnym mechanizmem obronnym w tym kontekście jest układ Trx/TrxR, główna reduktaza disiarczkowa. Odgrywa ona ważną

rolę w ochronie przed stresem oksydacyjnym, zapobiegając wewnątrz- i międzycząsteczkowemu tworzeniu wiązań disiarczkowych, które w przeciwnym razie prowadziłyby do inaktywacji i/lub agregacji białek (Rinnerthaler i wsp., 2015; Gencheva i wsp., 2022). Kolejny etap charakteryzuje się zwiększonym utlenianiem białek ze względu na duże ilości ROS lub inne zmodyfikowane białka, a także niezdolność komórki do usuwania uszkodzeń. Białka zmodyfikowane chemicznie całkowicie tracą swoją aktywność i ulegają rozfałdowaniu. Białka stają się wówczas celem degradacji przez proteasom lub mogą być ponownie sfałdowane i „uratowane” przez białka szoku cieplnego (Lang i wsp., 2021). Na tym etapie może dojść także do inaktywacji proteasomu przez UVA w fibroblastach skóry, prowadząc do aktywacji AP-1 (ang. activated protein-1), kontrolującego ekspresję MMP-1 (ang. matrix metalloproteinase), która odpowiada za zwiększoną degradację białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Ostatni, najbardziej zaawansowany etap modyfikacji białek charakteryzuje się rozległym utlenianiem białek i ich uszkodzeniem - rozfałdowaniem i kowalencyjnym sieciowaniem (Rinnerthaler i wsp., 2015).

2.3. Procesy zapalne

Stan zapalny jest jednym z ważnych mechanizmów obronnych organizmu, jednak powtarzające się procesy zapalne indukowane promieniowaniem UV mogą w konsekwencji zwiększać ryzyko wystąpienia raka skóry. Chociaż układ antyoksydacyjny zdolny jest do przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu, nawet niewielka ilość ROS jest wystarczająca do zainicjowania stanu zapalnego poprzez NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i AP-1 (Garg i wsp., 2020, Oh i wsp., 2020, Low i wsp., 2021). NF- κ B stanowi rodzinę pięciu strukturalnie spokrewnionych białek (RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) i p52/p100 (NF- κ B2)) i pełni rolę centralnego mediatora odpowiedzi zapalnych. W formie podstawowej NF- κ B występuje w cytoplazmie w stanie nieczynnym (związany z inhibitorem I κ B, ang. inhibitor of NF- κ B). Podwyższony poziom ROS (głównie H₂O₂), pośredniczy w aktywacji NF- κ B indukowanej przez czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF α , ang. tumour necrosis factor alpha) poprzez fosforylację reszt serynowych w kinazach I κ B. Proces ten prowadzi do aktywacji NF- κ B oraz translokacji do jądra, w wyniku czego dochodzi do ekspresji wielu genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną i zapalną, jak IL-1 β (ang. interleukin), IL-10, IL-6 i TNF α (Garg i wsp., 2020). Czynniki TNF α bierze udział w patogenezie chorób skóry, w tym odpowiada za stymulację kolagenaz i elastaz, indukcję apoptozy i hiperproliferyzację limfocytów. Dodatkowo, NF- κ B aktywuje

metaloproteinazę 1 i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. basic fibroblast growth factor) (Garg i wsp., 2020, Kolakul i Sripanidkulchai, 2018; Wondrak i wsp., 2005).

Promieniowanie UVA indukuje reakcje zapalne, które są bezpośrednio związane z patogenezą fotostarzenia. Translokacja NF- κ B i AP-1 z cytozolu do jądra odgrywa ważną rolę w regulacji mediatorów prozapalnych. Promieniowanie może aktywować czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor), cyklooksyzgenazę-2 (COX-2, ang. cyclooxygenase-2) oraz indukowaną syntazę tlenku azotu (iNOS, ang. inducible nitric oxide synthase), które przyspieszają fotostarzenie (Balupillai i wsp., 2020). Dodatkowe znaczenie przypisuje się NF- κ B oraz AP-1 w zapewnianiu równowagi między procesem proliferacji, a apoptozą. Brak równowagi w tych dwóch procesach, zwłaszcza w kontekście protoonkogenów, jak c-Fos koreluje ze zwiększonym ryzykiem karcynogenezy w starzejących się komórek skóry (Rinnerthaler i wsp., 2015).

Stan zapalny wynikający z nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV jest także związany z obniżoną aktywnością białka Klotho. Transbłonowe białko Klotho, o właściwościach przeciwstarzeniowych, chroni przed różnymi czynnikami stresowymi (Ansary i wsp., 2021; Yamamoto i wsp., 2005). Szlak NF- κ B pośredniczy w funkcjonowaniu Klotho, co zostało potwierdzone w wielu badaniach (Ansary i wsp., 2021; Bocheva i wsp., 2022; Buendía i wsp., 2016). Na uwagę zasługują również sirtuiny (SIRT, ang. sirtuins). Sirtuiny, deacetylazy histonowe zależne od dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD⁺), ang. nicotinamide adenine dinucleotide), wykazują działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie sygnalizacji NF- κ B. Dodatkowo opóźniają starzenie się komórek, wpływając na naprawę uszkodzeń DNA. Udowodniono, że UV może powodować przewlekłe zapalenie poprzez zmniejszanie ekspresji SIRT1 w ludzkich keratynocytach (Ansary i wsp., 2021). Obniżenie poziomu SIRT1 prowadzi do zwiększonej aktywności MMPs i NF- κ B. Sirtuiny ze względu na zdolność do deacetylacji histonów, modulują ekspresję genów zaangażowanych w reakcję na stres oksydacyjny oraz apoptozę (Ansary i wsp., 2021; Balupillai i wsp., 2020).

2.4 Modyfikacje komórkowych szlaków sygnalizacyjnych

ROS, wytwarzane na skutek działania promieniowania UVA są uważane za kluczowe czynniki inicjujące sygnałowe szlaki fotostarzenia skóry. Jednym z dość dobrze poznanych dróg sygnałowych w tym procesie jest szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK, ang. miogen-activated protein kinase). Kinaza białkowa c-Jun (JNK, ang. c-Jun N-terminal protein kinase) i ERK5 (ang. extracellular signal-regulated kinases)/bmk1 (ang.

big miogen-activated protein kinase 1) są istotnymi członkami rodziny kinaz MAP. Wśród nich p38 MAPK ma kluczowe znaczenie w regulacji odpowiedzi komórkowej na promieniowanie UV (Zhang i wsp., 2020). Wzrost poziomu ROS prowadzi do uruchomienia kaskadowej reakcji szlaku sygnałowego p38 MAPK, po której następuje aktywacja AP-1. Heterodimer AP-1 złożony jest z c-Fos i c-Jun, odpowiada za aktywację transkrypcji w komórkach i indukuje produkcję MMPs, przede wszystkim 1, 3 i 9 (Zhang i wsp., 2020; Rinnerthaler i wsp., 2015; Mao i wsp., 2021). AP-1 hamuje również TGF- β , który jest odpowiedzialny za produkcję kolagenu. Ekspresja MMPs za pośrednictwem AP-1 prowadzi do zwiększonej degradacji macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix) (Rinnerthaler i wsp., 2015).

Białko supresorowe p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej na czynniki genotoksyczne. Wykazano, że białko p53 bezpośrednio aktywuje transkrypcję wielu genów regulujących progresję cyklu komórkowego, czy apoptotyczne szlaki komórkowe. Promieniowanie UV indukuje mutacje w supresorze nowotworu p53 (Rinnerthaler i wsp., 2015; Cui i wsp., 2007). Utrata funkcji p53 wpływa na nieprawidłowy wzrost komórek i niewłaściwą odpowiedź na przeżycie, dodatkowo zaburzenia ekspresji p53 odgrywają integralną rolę w rozwoju raka. Szczególnie w tkance skórnej p53 ma kluczowe znaczenie dla zachowania integralności tkanki po naświetlaniu UV. Promieniowanie UV może indukować mutacje „sygnaturowe” w genie p53, które obejmują mutacje przesunięcia ramki odczytu CC na TT, będące skutkiem substytucji dipirymidyny C na T (Cui i wsp., 2007; Sies i Jones, 2020). W odpowiedzi na uszkodzenia DNA dochodzi do aktywacji p53 i jego genów docelowych p21 i GADD45 (ang. growth arrest and DNA damage-inducible 45). Czynnikiem p53 bezpośrednio oddziałuje z białkami regulatorowymi związanymi ze szlakami NER. Mutacje w maszynerii NER mogą powodować schorzenie nazywane skórą pergaminową (XP, łac. *Xeroderma pigmentosum*), autosomalną recesywną chorobę charakteryzującą się upośledzoną naprawą DNA po ekspozycji na promieniowanie UV i wczesny rozwój nowotworów skóry. Wynika to z faktu, iż naprawa DNA jest osłabiana przy braku funkcjonalnego p53 (Lee i wsp., 2013).

Stymulowana przez UVA produkcja ROS wpływa na zmniejszenie stężenia antyoksydantów, m.in. GSH, zmieniając status redoks. Zaburzenie równowagi redoks wpływa na wrażliwy czynnik jądrowy Nrf2 (ang. nuclear erythroid-2 related factor 2) (Ryšavá i wsp., 2020). Endogenny Nrf2 jest niezbędny do ochrony komórek skóry przed uszkodzeniami oksydacyjnymi oraz w procesie regulacji równowagi redoks podczas starzenia się skóry (Bocheva i wsp., 2022). Białko Nrf2 składa się z dwóch podjednostek (p45 i Maf), które

poprzez interakcję z DNA regulują ekspresję szeregu genów. Nrf2 po translokacji do jądra, wiąże się z elementami odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. ARE, antioxidant response element), napędzając ekspresję genów docelowych, detoksykację i enzymy antyoksydacyjne, jak oksydoreduktaza NAD(P)H:chinonu 1 (NQO1, ang. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1) i oksydoreduktaza hemowa 1 (HO-1, ang. heme oxygenase 1) (Ryšavá i wsp., 2020, Chu i wsp., 2019). UVA ze względu na dłuższą długość fali, dociera do głębszych warstw skóry, m.in. do fibroblastów, gdzie stymuluje ekspresję genów antyoksydacyjnych, w których pośredniczy Nrf2. W przeciwieństwie do UVA, UVB bezpośrednio nie aktywuje Nrf2. Natomiast pochodne witaminy D3, produkty działania UVB, mogą aktywować sygnalizację Nrf2. W związku z tym szlak sygnalizacji Nrf2 odgrywa ważną rolę w fotoprotekcji (Bocheva i wsp., 2022). Badania prowadzone przez Saw i wsp. (Saw i wsp., 2014), wykazały, że wyciszenie Nrf2 zwiększa wrażliwość skóry na promieniowanie UV, co odnotowano jako wzrost intensywności reakcji zapalnych i uszkodzeń ECM. Zatem ścieżka sygnałowa Nrf2/ARE odgrywa istotną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego stanu redoks. Ścieżka ARE może pomóc w naprawie uszkodzonego DNA i skutecznie chronić komórki przed fotouszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem UV (Chen S. i wsp., 2019a).

2.5. Udział metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej

Metaloproteiny macierzy pozakomórkowej to endopeptydazy zależne od cynku, których główną funkcją jest degradacja białek ECM. U ludzi zidentyfikowano 23 typy MMPs, które odpowiadają za degradację ECM w tkance łącznej skóry. Ze względu na strukturę i specyficzność substratową MMPs dzieli się na kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny, matrylizyny i metaloproteiny błonowe (Shimoda, 2019). Za najważniejszą metaloproteiną zaangażowaną w degradację ECM uważana jest MMP-1, jest to kolagenaza, która degradowuje fibrylarny (tworzący włókna) kolagen typu I i II. Natomiast MMP-3 (stromelizyna-1) nie jest zdolna do rozszczepiania włóknowego kolagenu typu I (Noh i wsp., 2022; Kusumaningrum i wsp., 2018, Lu i wsp., 2022). Rozkłada jednak wiele innych białek ECM, takich jak kolagen typu IV, V, IX i X, fibronektynę, lamininę i glikoproteiny (Lu i wsp., 2022). Poza tym, MMP-3 aktywuje inne MMPs wydzielane w postaci zymogenów. Promieniowanie UVA aktywuje szlaki MAPK i NF- κ B, które wzmacniają ekspresję MMPs, przyspieszając w ten sposób degradację kolagenu i elastyny (Lin i wsp., 2022). Pośrednio UVA może także aktywować produkcję cytokin prozapalnych, jak TNF α , które również stymulują ekspresję MMPs. Badania sugerują również udział kinaz ERK1/2 i AKT (ang. protein kinase B) w wytwarzaniu cytokin i MMPs (Wang i wsp., 2019). Badania wykazały, że

promieniowanie UVA indukuje głównie ekspresję i aktywację wspomnianej wcześniej MMP-1, a także MMP-9 w komórkach skóry, zwiększając degradację kolagenu (Karadeniz i wsp., 2020, Ansary i wsp., 2021).

Ekspresja genu MMP-1 jest regulowana transkrypcyjnie przez czynnik AP-1, który jest heterodimeryczną formą ufosforylowanych białek c-Fos i c-Jun. Działanie promieniowania UVA przyczynia się do ekspresji MMPs poprzez aktywację szlaków sygnałowych MAPK, które są odpowiedzialne za heterodimeryzację c-Fos i c-Jun, a następnie translokację jądrową. Translokacja AP-1 inicjuje ekspresję MMP-1. Dodatkowo promieniowanie UVA wpływa na zwiększoną fosforylację p38 MAPK, ERK i JNK, które są odpowiedzialne za fosforylację c-Fos i c-Jun (Karadeniz i wsp., 2020; Kusumaningrum i wsp., 2018). NF- κ B jest kolejnym kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym w odpowiedzi na promieniowanie UVA. NF- κ B jest również odpowiedzialny za aktywację MMPs w naświetlanych fibroblastach skóry. Poza tym, NF- κ B, jako znany mediator zapalenia wywołanego przez UV i stres oksydacyjny, przemieszcza się do jądra i pobudza ekspresję różnych cytokin prozapalnych (Lu i wsp., 2022).

MMP-1 i MMP-3 odgrywają istotną rolę w utracie elastyczności, atrofii skóry i powstawaniu zmarszczek. Efekt ten jest nasilony działaniem promieniowania UVA (Lu i wsp., 2022). UV może również zmniejszać syntezę prokolagenu poprzez hamowanie szlaku sygnałowego TGF β /Smad. TGF β inicjuje sygnalizację poprzez wiązanie z receptorami powierzchniowymi komórki (receptory TGF β typu I i II), a następnie transkrypcję genów związanych z TGF β poprzez fosforylację kompleksu Smad2/Smad3. Promieniowanie UV hamuje translokację jądrową Smad2/Smad3, powodując zmniejszoną transkrypcję receptora TGF β typu II i zmniejszoną syntezę białek oraz ekspresję prokolagenu typu I w ludzkich fibroblastach (Ansary i wsp., 2021).

3. Współczesne koncepcje ochrony przeciwsłonecznej

Wraz z poprawą standardów życia znacznie wzrosły wymagania dotyczące zadbanej, młodo wyglądającej skóry, stąd badania nad metodami zapobiegania procesom fotostarzenia mają coraz większe znaczenie naukowe i społeczne (Chen i wsp., 2019a). Stosowanie filtrów przeciwsłonecznych jest niezbędnym elementem fotoochrony, ważnym w profilaktyce nowotworów skóry. Stosowane obecnie filtry stanowią fizyczną blokadę, a mechanizm ich działania oparty jest na (I) absorpcji oraz (II) rozpraszaniu i odbijaniu energii UV. Obok filtrów przeciwsłonecznych stosowane są również miejscowo związki o właściwościach przeciwutleniających, które dodatkowo chronią przed skutkami reakcji fotoutleniania

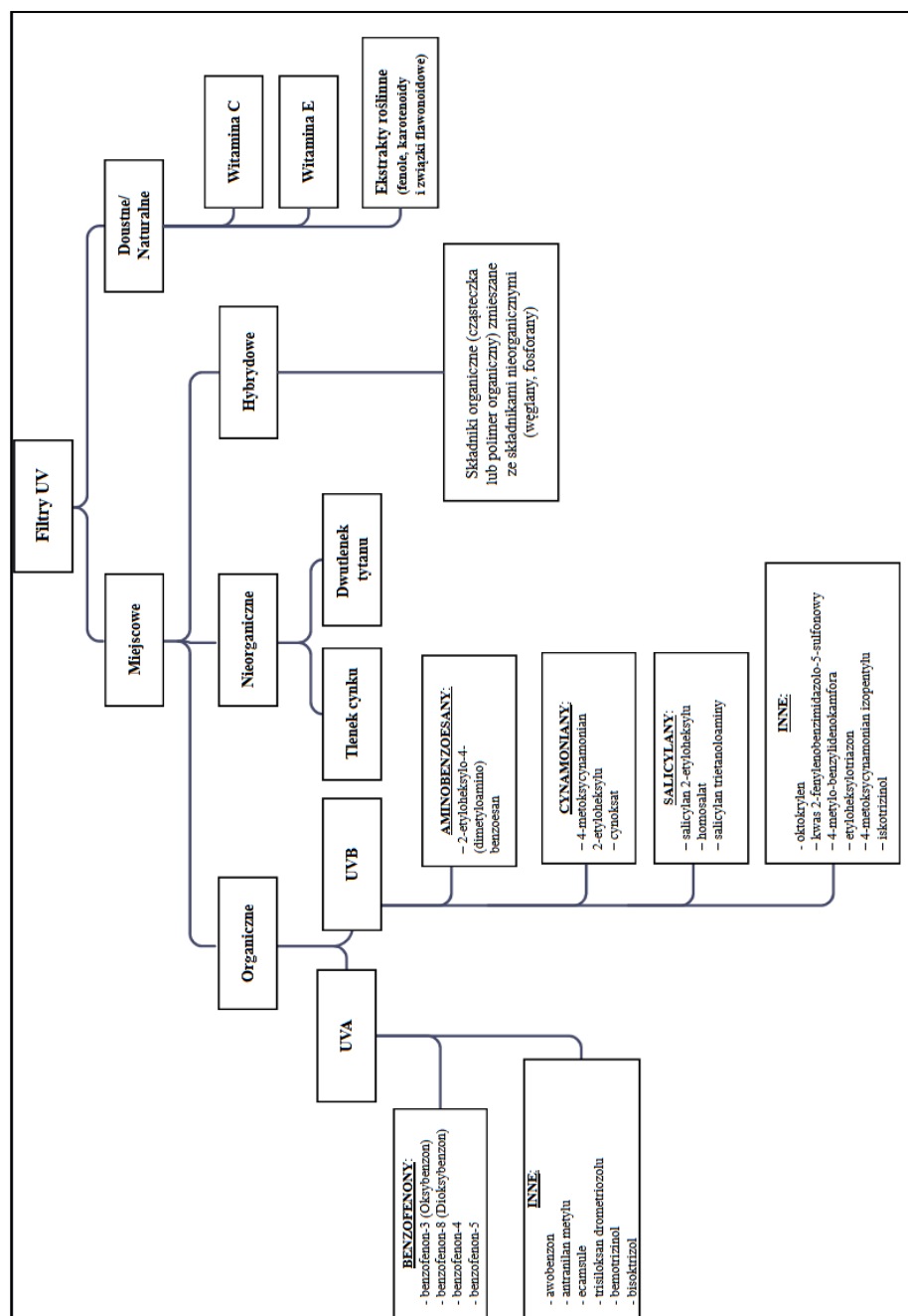
(Gonzalez i wsp., 2011; Krutmann i wsp., 2020). Jako uzupełnienie ochrony miejscowej, do stosowania bezpośrednio na skórę (ang. topical application), zalecana jest ogólnoustrojowa fotoprotekcja, która opiera się głównie na doustnej suplementacji witamin oraz prekursorów i pochodnych witamin o działaniu antyoksydacyjnym (m.in., witaminy C, D i E, karotenoidy i ksantofile, likopen, nikotynamid), a także naturalnych suplementów roślinnych bogatych w związki fenolowe (np. katechiny i inne polifenole zielonej herbaty, kwercetyna, czy izoflawony) (Parrado i wsp., 2018). Nie mniej ważną rolę w fotoprotekcji ogólnoustrojowej odgrywa zdrowa dieta bogata w warzywa i owoce, które są źródłem naturalnych witamin antyoksydacyjnych i polifenoli.

Produkty kosmetyczne zawierające filtry przeciwsłoneczne powinny spełniać kilka podstawowych kryteriów. Muszą być bezpieczne, nietoksyczne, chemicznie obojętne, niedrażniące i w pełni chronić przed szerokim spektrum promieniowania, nie powinny penetrować skóry, ich zadaniem jest działać na powierzchni (Ngoc i wsp., 2019). Produkty przeciwsłoneczne chronią ludzką skórę przed uszkodzeniami wywołanymi nadmierną ekspozycją na promieniowanie UV, ponieważ zawierają składniki aktywne, organiczne lub nieorganiczne, zwane filtrami UV. Związki te charakteryzuje odrębny mechanizm działania ochronnego. Filtry nieorganiczne mogą rozpraszać i odbijać promieniowanie UV, podczas gdy związki organiczne w głównej mierze odpowiadają za pochłanianie promieniowania. Połączenie tych dwóch typów filtrów UV zwiększa skuteczność działania preparatów przeciwsłonecznych (Morocho-Jácome i wsp., 2020; Saewan i Jimtaisong, 2015; Heo i wsp., 2018). Wiele z tych preparatów stanowi mieszaninę składników naturalnych z konwencjonalnymi filtrami, dzięki czemu produkty te są bardziej bezpieczne – poprzez wprowadzanie do receptury związków naturalnych o działaniu fotoochronnym, możliwe jest ograniczenie zawartości syntetycznych filtrów, co minimalizuje niepożądane efekty (Ngoc i wsp., 2019). Jednocześnie wiele naturalnych składników aktywnych wykazuje efekt synergistyczny z syntetycznymi składnikami, a także poprzez działanie nawilżające przeciwdziała oznakom starzenia się skóry.

3.1. Klasyfikacja i charakterystyka filtrów UV stosowanych w produktach przeciwsłonecznych

Ze względu na mechanizm działania filtry UV można podzielić na dwie zasadnicze grupy, nieorganiczne i organiczne. Filtry nieorganiczne (inaczej mineralne) działają na zasadzie dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich obejmuje załamanie i rozpraszanie promieniowania, drugi natomiast oparty jest na wzbudzeniu cząstek filtra i działaniu

podobnym do filtrów organicznych (Mancuso i wsp., 2017; Narbutt i wsp., 2018; Caloni i wsp., 2021). Typowe filtry nieorganiczne, które są powszechnie akceptowane i stosowane na całym świecie, zawierają tlenek cynku (ZnO, nazwa wg IUPAC: Oxozinc) oraz dwutlenek tytanu (TiO₂, nazwa wg IUPAC: Titanium Dioxide). Związki te są chemicznie obojętne i nie powodują reakcji uczuleniowych. Jednak związki nieorganiczne są często widoczne na skórze, co uważa się za niepożądany efekt wizualny (Saewan i Jimtaisong, 2015). Filtry organiczne mogą występować w postaci płynnej lub stałej i absorbować fotony promieniowania UVA i/lub UVB. Są to związki aromatyczne, zawierające wiele sprzężonych pierścieni aromatycznych, dzięki czemu absorbują energię UV, która następnie jest rozpraszana w postaci ciepła (Mancuso i wsp., 2017). Filtry organiczne ze względu na zdolność pochłaniania promieniowania UV można podzielić na filtry UVA, UVB lub filtry UV o szerokim spektrum (UVA i UVB). Ze względu na strukturę cząsteczki istnieje pięć głównych typów filtrów organicznych: pochodne kwasu para aminobenzoesowego (PABA; ang. para-aminobenzoic acid), benzofenony, salicylany, cynamoniany i pozostałe niesklasyfikowane związki. Pochodne PABA są wysoce skuteczne w pochłanianiu UVB. Benzofenony dobrze absorbują promieniowanie UVA2 (320-340 nm), natomiast salicylany są słabymi pochłaniaczami UVB i są stosowane głównie w połączeniu z innymi absorbentami organicznymi. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się produkty hybrydowe, łączące właściwości związków organicznych i nieorganicznych oraz surowce roślinne, zawierające przeciwutleniacze (Ngoc i wsp., 2019). Klasyfikacja środków ochrony przeciwsłonecznej została przedstawiona na rycinie 5.



Ryc. 5. Produkty ochrony przeciwsłonecznej - filtry UV (opracowanie własne na podstawie Mancuso i wsp., 2017; Ngoc i wsp., 2019).

Organiczne filtry są niewidoczne na powierzchni skóry, dlatego też są bardziej akceptowane przez konsumentów (Saewan i Jimtaisong, 2015). Przykładami dostępnych na rynku składników absorbujących promieniowanie UV są pochodne kwasu cynamonowego, jak metoksycynamonian etyloheksylu (EHMC, ang. ethylhexyl methoxycinnamate), benzofenony (BP, ang. benzophenones), jak powszechnie stosowany benzofenon-3 (potocznie

oksybenzon, BP-3, ang. benzophenone-3), salicylany, jak salicylan etyloheksylu (OCS, ang. ethylhexyl salicylate), pochodne benzoilowe, jak benzoesan dietyloaminohydroksybenzoiloheksylu (DHHB, ang. diethylaminohydroxybenzoyl hexyl benzoate) i metoksydibenzoilometan butylu (BMDBM, ang. butyl methoxydibenzoylmethane) (Caloni i wsp., 2021). Cząsteczki te przechodząc w stan wzbudzenia pod wpływem promieniowania, uwalniają energię w postaci fluorescencji i ciepła, rozpraszając jej część i przekształcając w nieszkodliwą dla skóry długość fali (Caloni i wsp., 2021; Saewan i Jimtaisong, 2015). Niestety niektóre filtry organiczne, na przykład oksybenzon (BP-3), mogą być toksyczne, powodować reakcje niepożądane, a nawet stanowią zagrożenie ekologiczne (Morocho-Jácome i wsp., 2020). Oksybenzon i metoksykynamonian etyloheksylu mają ograniczone zastosowanie, ponieważ po ekspozycji na promieniowanie UV mogą ulegać aktywacji i wytwarzać cząsteczki fotouczulacza (Saewan i Jimtaisong, 2015).

Skuteczność filtrów przeciwsłonecznych UVB jest mierzona za pomocą współczynnika ochrony przeciwsłonecznej (SPF, ang. sun protection factor).

3.2. Naturalne antyoksydanty i inne dodatkowe składniki aktywne w nowoczesnych kosmetykach przeciwsłonecznych

Trudno jest osiągnąć skuteczną ochronę przeciwsłoneczną przy użyciu wyłącznie syntetycznych filtrów UV. W wielu badaniach stwierdzono, iż włączenie związków naturalnych do produktów przeciwsłonecznych umożliwia zwiększenie wartości SPF lub poprawę fotostabilności (utrzymanie wartości SPF po ekspozycji na UV) (Ngoc i wsp., 2019; Morocho-Jácome i wsp., 2020; Santhra Krishnan i wsp., 2021). Substancje występujące naturalnie, jak ekstrakty roślinne czy wyizolowane związki, stają się coraz częściej przedmiotem zainteresowania pod kątem włączenia ich do receptury filtrów ochrony przeciwsłonecznej (Saewan i Jimtaisong, 2015).

Tradycyjne filtry przeciwsłoneczne stanowią jedynie „pasywną fotoochronę” i nie są skuteczne w przypadku uszkodzenia komórek skóry w wyniku ekspozycji na zbyt wysoką dawkę promieniowania. Szczególnie niebezpieczne są komórki z nienaprawionymi uszkodzeniami DNA, które mogą prowadzić do mutacji. Ciekawą strategią w opracowaniu nowoczesnych kosmetyków fotoochronnych jest połączenie przeciwutleniaczy i enzymów naprawy DNA, co mogłoby zmniejszyć częstość mutacji i wzmocnić odpowiedź immunologiczną (Ngoc i wsp., 2019). Przełomowa receptura została opracowana w oparciu o chemoprewencyjne właściwości endonukleazy T4 (fotolizazy), którą połączono z inną endonukleazą oraz glikozydazą 8-oksoguaninową (Ngoc i wsp., 2019). W tym

eksperymentalnym pilotażowym badaniu przeprowadzonym przez Emanuele i wsp. zastosowano dwa obce gatunkowo enzymy naprawy DNA, fotoliazę z *Aspergillus nidulans* i endonukleazę z *Micrococcus luteus* (Emanuele i wsp., 2013). Miejscowe zastosowanie preparatu skutecznie zapobiegało skracaniu telomerów wywołanemu promieniowaniem UV i nadekspresji protoonkogenu c-FOS w ludzkiej skórze. Ponadto, w randomizowanych badaniach klinicznych, przeprowadzonych na pacjentach ze zrogowaceniem słonecznym, udowodniono jednoznacznie skuteczniejsze działanie ochronne kremu przeciwsłonecznego wzbogaconego w enzymy naprawy DNA w porównaniu z kremem tradycyjnym (Carducci i wsp., 2015). Korzystnym rozwiązaniem wydaje się być również połączenie antyoksydantów z czynnikami bezpośrednio wpływającymi na mediatory starzenia, takimi jak aktywatory SIRT1 lub suplementacja NAD⁺ (Ngoc i wsp., 2019).

Niektóre składniki pozyskiwane z naturalnych źródeł są powszechnie stosowane w kosmetykach naturalnych lub wegańskich, a na rynku kosmetycznym rośnie tendencja do wprowadzania zaawansowanych, przyjaznych dla środowiska produktów. Ekstrakty roślinne pozyskiwane z różnych organów roślin zarówno gatunków rodzimych jak i egzotycznych są cennym surowcem wykorzystywanym w przemyśle kosmetycznym ze względu na obecność metabolitów pierwotnych (podstawowe związki budulcowe roślin), a przede wszystkim wtórnych (różnorodne związki charakterystyczne dla poszczególnych grup roślin). Substancje aktywne, jak fenole i polifenole, steroidy i sterole, peptydy, białka czy polisacharydy wykorzystuje się jako składniki dermokosmetyków i produktów przeciwsłonecznych. Szczególnym zainteresowaniem ze względu na ich zdolność do przeciwdziałania fotostarzeniu cieszą się związki pochodzące z organizmów morskich. Wiele z nich jest w fazie komercjalizacji (Morocho-Jácome i wsp., 2020). Większość metabolitów wtórnych to przeciwutleniacze syntetyzowane przez rośliny w określonych warunkach środowiska (skład gleby i efekt sezonowy). Przeciwutleniacze o strukturze fenoli mogą zapewnić działanie fotoochronne dzięki obecności grup chromoforowych. Niektóre działają jak filtry UV na powierzchni skóry, podczas gdy inne mogą zwalczać stres oksydacyjny lub działać przeciwzapalnie (Morocho-Jácome i wsp., 2020). Wśród tych związków fenolowych wyróżniają się niektóre klasy, jak fitoestrogeny, karotenoidy, ksantofile, kumaryny, proantocyjanidyny, antocyjany, katechiny, kwasy fenolowe, triterpeny, alkaloidy, terpenoidy, taniny, garbniki, olejki eteryczne i flawonoidy (Salian i wsp., 2021).

Polifenole pochłaniają promieniowanie w zakresie 304-350 nm oraz 352-385 nm. Kwasy ferulowe, kawowe i p-kumarowe oraz ich kwaśne pochodne (np. kwas rozmarynowy i chlorogenowy) są zdolne do pochłaniania promieniowania w zakresie UVB (Morocho-

Jácome i wsp., 2020). Flawonoidy absorbują w zakresie 240-285 nm i 300-550 nm, w związku z tym ich włączenie do receptur filtrów przeciwsłonecznych zapewnia ochronę o szerokim spektrum działania. Najczęstszymi klasami flawonoidów są flawony (katechiny) i flawonole (kwercetyna) ($\lambda = 280-350$ nm), flawanony (disometyna) ($\lambda = 280-560$ nm), izoflawony ($\lambda = 236-262$ nm) oraz antocyjanidyny ($\lambda = 465-560$ nm). Genisteina, która jest głównym izoflawonem występującym w ekstraktach sojowych, skompleksowana z chlorkiem glinu (AlCl_3 , nazwa wg IUPAC: aluminium chloride) wykazuje maksimum absorpcji przy 382 nm. Wśród karotenoidów o działaniu fotoochronnym są α -karoten, β -kryptoksantyna i likopen. Karotenoidy (α - tokoferol i β -karoten), które mają długie łańcuchy węglowe, absorbują głównie światło widzialne, przy ok. 455 nm (Morocho-Jácome i wsp., 2020).

Ekstrakty z zielonej herbaty są powszechnie stosowane w kosmetyce ze względu na charakter fotoochronny. Zawierają flawonoidy takie, jak galusan epigallokatechiny, epikatechina, epigallokatechina, które skutecznie zmiatają wolne rodniki (Morocho-Jácome i wsp., 2020). Miejscowe zastosowanie ekstraktów z zielonej i białej herbaty zapewniało ochronę ludzkiej skóry przed powstawaniem rumienia po naświetlaniu UV, obserwowano także zmniejszenie poziomu uszkodzeń DNA (Saewan i Jimtaisong, 2015). Polifenole obecne w herbacie są zdolne do zmiatania ROS i absorbowania promieniowania UVB, przez co chronią enzymy naprawy DNA przed utlenianiem. Związkiem fenolowym o silnym działaniu przeciwutleniającym należącym do klasy stilbenów jest resweratrol. Badania *in vivo* wykazały, że trans-resweratrol jest w stanie zapobiegać uszkodzeniom i rakowi skóry wywołanym promieniowaniem UV (Morocho-Jácome i wsp., 2020; Mansuri i wsp., 2021).

3.3. Bezpieczeństwo filtrów przeciwsłonecznych dla zdrowia i środowiska

Wiele potencjalnych środków przeciwsłonecznych może wykazywać negatywne skutki, w tym podrażnienia skóry, fotoalergiczne zapalenie skóry, „estrogenność” czy ryzyko niedoboru witaminy D (Ngoc i wsp., 2019).

Niektóre komercyjne filtry przeciwsłoneczne całkowicie pochłaniają UVB, natomiast przepuszczają duże ilości UVA, co może przyczyniać się do wzrostu ryzyka wystąpienia czerniaka. Celowe, długotrwałe miejscowe stosowanie kremu przeciwsłonecznego, szczególnie o wysokim SPF, paradoksalnie może zwiększać ryzyko czerniaka, ponieważ umożliwia dużo dłuższą ekspozycję na promieniowanie słoneczne. Co więcej niektóre wrażliwe na światło składniki kremu przeciwsłonecznego mogą być czynnikiem fotoalergicznym. W szczególności PABA i oksybenzon są najczęstszymi składnikami powodującymi zaburzenia skórne. O ile większe cząstki nie są uznane za szkodliwe, nano-

i mikrocząstki niektórych nieorganicznych filtrów mogą penetrować wierzchnią warstwę skóry, przez co mogą działać toksycznie na organizm. Na przykład wykazano, że nanocząstki TiO_2 przenikają przez błony komórkowe i zaburzają funkcje życiowe hodowli ludzkich fibroblastów skóry (Ngoc i wsp., 2019). Jednym z poważnych skutków ubocznych nadużywania filtrów UV, które poprzez skórę dostają się do ustroju, jest zakłócenie spermatogenezy i prawidłowego funkcjonowania plemników, co może negatywnie wpływać na męską płodność (Heo i wsp., 2018). Produkty zawierające np. benzofenony, pochodne kamfory czy kwas cynamonowy, jeśli przenikają poprzez skórę, mogą zaburzać gospodarkę hormonalną, ponieważ wywołują efekt podobny do działania estrogenów (Chu i wsp., 2022).

Powszechne stosowanie filtrów UV w połączeniu z rosnącą popularnością turystyki, nieuchronnie doprowadziło do wykrycia tych substancji w środowisku i zidentyfikowania ich jako nowy rodzaj zanieczyszczenia w wodach morskich (Lebaron, 2022, Caloni i wsp., 2021). Najczęściej stosowane filtry mineralne mogą być uwalniane do środowiska w zmiennej ilości od 8 do 72%, przy czym formuła kosmetyku ma duży wpływ na szybkość uwalniania do wody (Caloni i wsp., 2021; Lebaron, 2022). Wymyte do wody ulegają dalszym modyfikacjom. Obecność materii organicznej w środowisku wodnym powoduje stabilizację cząstek TiO_2 , które w procesie dyspergowania mogą tworzyć agregaty z makrocząsteczkami, np. kwasami humusowymi. Szkodliwe działanie nieorganicznych filtrów UV na organizmy wodne wynika głównie z ich zdolności do przenoszenia pochłoniętej energii na otaczające cząsteczki, powodując powstawanie ROS (Caloni i wsp., 2021). Filtry UV mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka, ze względu na nieznaną losy tych związków w łańcuchu troficznym. Niektóre z nich gromadzą się w organizmach morskich, gdzie mogą być metabolizowane lub ulegać bioakumulacji i biomagnifikacji (Lebaron, 2022). Szacuje się, że bioakumulacja składników filtrów UV w organizmach morskich zajmujących wyższe poziomy w łańcuchu troficznym prowadzi do dziennego spożycia przez człowieka wraz z dietą 0,3-15,2 ng tych szkodliwych substancji. Zanieczyszczenie ekosystemów morskich filtrami UV stanowi poważne zagrożenie utraty bioróżnorodności (Caloni i wsp., 2021; Lebaron, 2021), m.in. ustalono związek pomiędzy osłabieniem koralowców spowodowanym ekspozycją na filtry przeciwsłoneczne, a występowaniem infekcji wirusowych u tych organizmów. Sugeruje to, że obecność szczególnie BP-3 oraz ZnO może być przyczyną zjawiska wybielania raf koralowych, co często prowadzi do śmierci całego koralu. Badania laboratoryjne dostarczają coraz więcej dowodów, że inne organiczne filtry UV, w tym EHMC i OC, a także filtry nieorganiczne, głównie ZnO mogą być przyczyną wybielania raf koralowych (Lebaron, 2021).

4. Właściwości biologiczne i prozdrowotne oraz potencjalne zastosowanie ekstraktów roślinnych z surowców pochodzących z wybranych roślin z rodziny *Rubiaceae* i *Oleaceae*

Alternatywne źródła składników o działaniu przeciwutleniającym, immunomodulującym lub fotoochronnym wykorzystywane są w preparatach kosmetycznych, a także w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i w produkcji nutraceutyków (Bosso i wsp., 2021).

Kawowiec, inaczej kawa (*Coffea* L.) jest krzewem lub niewielkim drzewem wiecznie zielonym z rodziny marzanowatych (*Rubiaceae*). Obejmuje ponad 100 gatunków, z których Arabica (*Coffea arabica*) i Robusta (*Coffea canephora*; *Coffea robusta*) to dwa z najbardziej rozpoznawalnych i najczęściej uprawianych gatunków kaw (Melese i Kolech, 2021; AL-Asmari, 2020). Ziarna (nasiona pestkowca) kawy znajdują zastosowanie przede wszystkim, w przemyśle spożywczym oraz w medycynie i kosmetologii (Bosso i wsp., 2021). Ekstrakt z nasion kawy niepalonej, określany w literaturze jako ekstrakt z ziaren „zielonej” kawy (GCBE, ang. green coffee bean extract) jest bogatym źródłem (aż ok. 50%) kwasów chlorogenowych (CGAs, ang. chlorogenic acids), które są różnymi estrami powstałymi między kwasem cynamonowym, a kwasem chinowym. Skład chemiczny nasion kawy różni się w zależności od warunków uprawy i sposobu przetwarzania (palenie, mielenie). Ziarna „zielonej” kawy mają większy potencjał jako źródło związków aktywnych niż ziarna kawy palonej. Przykładowy skład ziaren „zielonej” kawy przedstawia się następująco: 60% stanowią węglowodany (stachioza, rafinoza, sacharoza, celuloza, arabinogalaktan, galaktomannany, arabinoza, glukoza, galaktoza, fruktoza, mannitol, mannoza, ksyloza, ryboza), 8-18% stanowią białka. W skład wchodzi również lipidy (trigliceryd, stigmasterol i sitosterol), kwasy tłuszczowe (oleinowy, linolowy, palmitynowy, linolenowy, arachidowy, stearynowy, behenowy i lignocerynowy) oraz polifenole (12-18% suchej masy; w tym kwasy kawoilochinowe, ferulochinowe, cynamoilochinowe i dikawoilochinowe). Asparagina, alanina, kwas glutaminowy, lizyna i kwas asparaginowy to główne składniki aminokwasowe kawy. Ponadto kawa jest bogata w kofeinę, trigonellinę, teofilinę i teobrominę (Pratiwi, 2021). Wykazano, że CGAs hamują peroksydację lipidów (redukcja MDA) i zwiększają całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza poprzez zwiększenie aktywności SOD i stężenia GSH. Wykazują również działanie przeciwzapalne poprzez obniżanie poziomu TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-8 (Nikpayam i wsp., 2018). Oprócz kwasów fenolowych wysoką aktywność przeciwutleniającą wykazują kofeina, inne polifenole, alkaloidy, garbniki i saponiny. Kofeina

jest coraz częściej stosowana w kosmetykach nie tylko ze względu na właściwości antyoksydacyjne, ale także zdolność przenikania przez barierę skórą. Pomaga chronić komórki skóry przed promieniowaniem UV i spowalnia procesy fotostarzenia (Pratiwi, 2021). Kofeina dzięki utrzymywaniu nawilżenia, pigmentacji i niwelowaniu drobnych zmarszczek sprawia, że skóra staje się zdrowsza i młodsza.

Wodne lub alkoholowe ekstrakty z ziaren „zielonej” kawy wykazują wysoki potencjał antyoksydacyjny i stanowią potencjalny surowiec wykorzystywany przy produkcji kosmetyków takich jak mydła, kremy do ciała i twarzy czy olejki (Bosso i wsp., 2021). GCBE w postaci proszku, kapsułek, tabletek czy gumy do żucia jest sprzedawany jako suplement diety, który może działać wspomagająco przy leczeniu otyłości (Samadi i wsp., 2015, Sudeep i Shyam Prasad, 2021), nadciśnienia (Ochiai i wsp., 2004), hiperglikemii (Asbaghi i wsp., 2020). GCBE może poprawić funkcjonowanie bariery przepuszczalności naskórka, nawilżenie warstwy rogowej naskórka i funkcję mikrokrążenia, co poprawia wygląd skóry (Bosso i wsp., 2021). Dodatkowo ekstrakt wykazuje właściwość antyelastazową, właściwości przeciwstarzeniowe poprzez hamowanie aktywności enzymów kolagenazy i elastazy w liniach komórkowych fibroblastów. Ekstrakt wpływa na wzrost ekspresji genów białek strukturalnych kolagenu, przy jednoczesnym hamowaniu ekspresji MMPs i cytokin zapalnych. Kofeina wykazuje aktywność hamującą względem MMPs (Saewan i Jimtaisong, 2022). GCBE przypisuje się również zdolności fotoprotekcyjne. Widmo kofeiny charakteryzuje się maksymalną absorbancją przy 272 nm, natomiast maksymalny pik absorbancji CGA wynosi 330 nm (Navarra i wsp., 2017), co świadczy o zdolności pochłaniania promieniowania zarówno w zakresie UVB, jak i UVA. Kwasy kawoilochinowe i kawoiloferulowe silnie pochłaniają promieniowanie przy 325 nm, a jest to zakres promieniowania UVA (Clifford i wsp., 2008).

Oliwka europejska (*Olea europaea* L.) to drzewo oleiste pochodzące z regionu Morza Śródziemnego, należące do rodziny oliwkowatych (*Oleaceae*) (Borjan i wsp., 2020). Suszone liście oliwki, jeden z produktów ubocznych przemysłu olejarskiego (oliwy), są uważane za tani surowiec zielarski, który stanowi istotne źródło związków fenolowych o szerokim zakresie aktywności biologicznych (przede wszystkim właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne) (Özcan i Matthäus, 2017; Nunes i wsp., 2022). Ekstrakt z liści oliwki europejskiej (OLE, ang. olive leaf extract) jest dostępny komercyjnie jako suplement diety o wielu korzyściach zdrowotnych. Duża zawartość związków fenolowych w liściach oliwnych wskazuje na ich wysoką zdolność antyoksydacyjną, a także właściwości hipotensyjne, obniżające poziom cholesterolu, kardioprotekcyjne, przeciwzapalne,

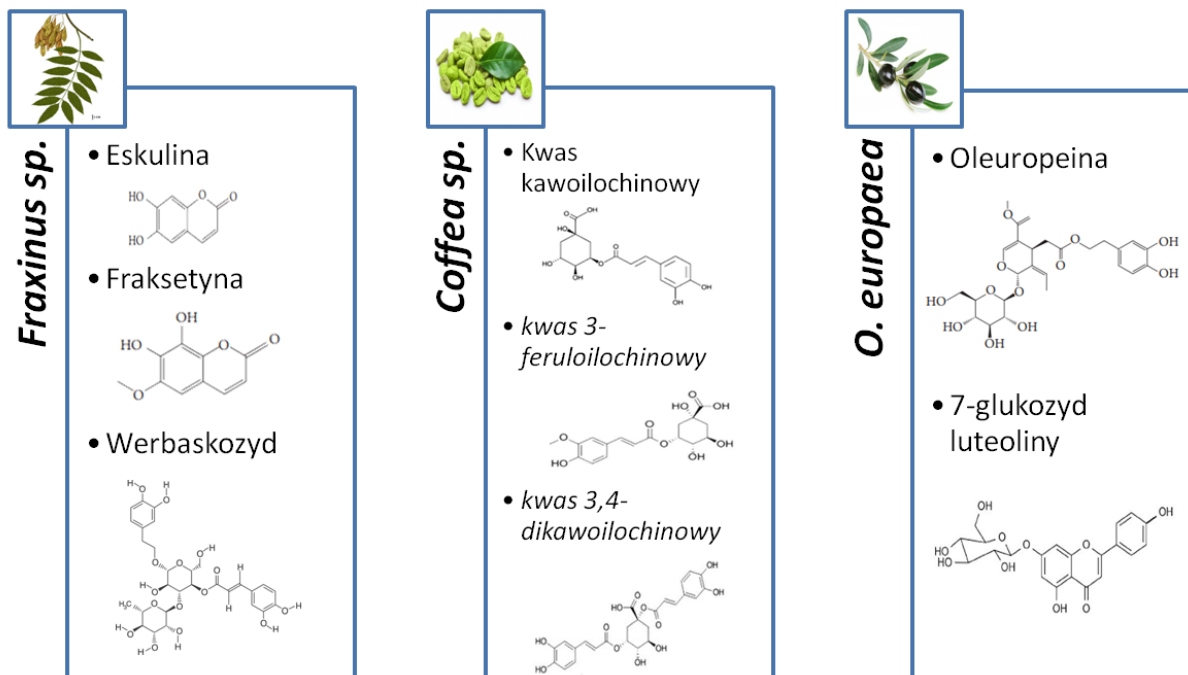
przeciwdrobnoustrojowe (Qabaha i wsp., 2017). Głównymi związkami fenolowymi w ekstraktach z liści oliwki są oleuropeina, hydroksytyrozol, werbaskozyd, 7-glukozyd apigeniny i 7-glukozyd luteoliny (Özcan i Matthäus, 2017). Można je przyporządkować do 5 głównych grup związków fenolowych: oleuropeozydy (oleuropeina i werbaskozyd), flawony (7-glukozyd luteoliny, 7-glukozyd apigeniny, 7-glukozyd diosmetyny, lutelina i diosmetyna), flawonole (rutyna), flawon-3-ole (katechina) i podstawione fenole (tyrozol, hydroksytyrozol, wanilina, kwas wanilinowy i kwas kawowy) (Özcan i Matthäus, 2017; Abaza i wsp., 2015).

OLE jest dostępny w postaci proszku lub kapsułek. Enkapsulacja zwiększa rozpuszczalność w wodzie, a także zabezpiecza przed degradacją i utlenianiem (Abaza i wsp., 2015, Nunes i wsp., 2022). Najobficiej występującym polifenolem jest oleuropeina, dzięki której ekstrakt wykazuje właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne (Qabaha i wsp., 2017). Związki fenolowe mogą również działać chemoprewencyjne poprzez modulację cyklu komórkowego, indukcję apoptozy, regulację epigenetyczną, hamowanie szlaków transdukcji sygnału, jak NFκB, AP-1 oraz MAPK lub poprzez działanie antyoksydacyjne w przypadku fotokarcynogenezy (Lecci i wsp., 2021). Ponadto związki fenolowe obecne w OLE aktywują enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej (Castejón i wsp., 2020), OLE zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych, jak SOD, CAT, GR, GST. Szczególnie oleuropeina ma zdolność zwiększania poziomu SOD i GPx. Wiele związków fenolowych wykazuje zdolność do hamowania uszkodzeń skóry wywołanych promieniowaniem UVA. Jednocześnie są zdolne do indukcji apoptozy za pośrednictwem ROS w komórkach uszkodzonych przez UVA (Lecci i wsp., 2021). Przeciwutleniacze, jak oleuropeina, hydroksytyrozyna i tyrozyna mogą zapobiegać powstawaniu ROS w komórkach skóry naświetlanych promieniowaniem UVB. Hydroksytyrozyna zmniejszając stres oksydacyjny zapobiega postępowi starzenia się skóry. Dodatkowo hydroksytyrozyna zmniejsza ekspresję mRNA MMP-1 oraz MMP-3. Zarówno OLE, jak i oleuropeina mogą zapobiegać zmniejszeniu elastyczności skóry poprzez hamowanie produkcji ROS i MMP-13 (kolagenazy 3) (Nunes i wsp., 2022). Hydroksytyrozyna zapobiega aktywacji NFκB, zmniejsza wydzielanie cytokin (IL-1β, IL-6, TNFα), wzmacniając działanie przeciwzapalne (Nunes i wsp., 2022; Castejón i wsp., 2020). OLE wykazuje charakterystyczne piki absorpcyjne, przy $\lambda = 280$ nm, odpowiadający związkom flawonowym oraz $\lambda = 325$ nm, odpowiadający związkom fenolowym, głównie oleuropeinie (da Silva i wsp., 2019).

Do rodziny *Oleaceae* należy również rodzaj jesion (*Fraxinus*) obejmujący ponad 43 gatunki drzew (Akter i wsp., 2020), które są szeroko rozpowszechnione w Ameryce Północnej, Europie oraz wschodniej i zachodniej Azji. Jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior*) charakteryzuje się zawartością węglowodanów (mannitol, sorbitol, galaktoza, glukoza, sacharoza, rafinoza, mannitol, stachioza), kumaryn (fraksetyna, fraktyna, eskulina, eskuletyna, fraksynol), flawonoidów (kwercetyna, suberyna, ramnoglukozyd, kaempferol), kwasów organicznych, saponin, witamin (C, B1, karotenoidów), garbników (Bussmann, 2019). Niektóre gatunki *Fraxinus* znajdują zastosowanie we współczesnej medycynie. Kora jesionu wyniosłego była od dawna stosowana jako środek przeciwgorączkowy i przeciwreumatyczny. Ekstrakty roślinne z różnych organów (kora, liście) *Fraxinus sp.*, i wyizolowane z nich związki potencjalnie mogą modulować aktywność różnych kluczowych enzymów związanych z odpowiedzią zapalną. Eskuletyna posiada zdolność do hamowania aktywacji MAPK i AP-1 (Sarfraz i wsp., 2017). Alkoholowy ekstrakt z kory *F. excelsior* hamuje aktywność mieloperoksydazy (Middleton i wsp., 2005), natomiast olejek eteryczny z *F. excelsior* wykazuje zdolność hamowania ekspresji genów COX-2 oraz cytokin prozapalnych, TNF α i IL-1 β w hodowli synowocytów bydłych aktywowanych lipopolisacharydem (Maghsoudi i Haj-allahyari, 2018). Inne lecznicze zastosowanie tej rośliny obejmuje działanie immunomodulujące, przeciwbakteryjne, przeciwutleniające, regenerujące skórę (Maghsoudi i Haj-allahyari, 2018). Jesion koreański (*Fraxinus chinensis* ssp. *rhynchophylla*) jest źródłem licznych substancji bioaktywnych, m.in., glukozydów sekoirydoidowych, kumaryn, lignanów, flawonoidów, związków fenolowych. Kora jesionu koreańskiego była używana w Chinach, jako środek przeciwbakteryjny, przeciwbólowy, przeciwzapalny, ale też posiada właściwości moczopędne, przeciwzkrzepowe i przeciwalergiczne (Lee i wsp., 2020; Lee i wsp., 2021). Spośród szerokiego spektrum aktywności biologicznych przypisywanych jesionom na uwagę zasługuje działanie przeciwnowotworowe. Badania wykazały, że metabolity i ekstrakty z różnych gatunków jesionów mają zdolność hamowania karcynogenezy poprzez ukierunkowane działanie na różne białka szlaków sygnałowych związanych z namnażaniem się komórek nowotworowych (Sarfraz i wsp., 2017).

Obecność sekoirydoidów, fenyloetanoidów i kumaryn jest cechą charakterystyczną rodzaju *Fraxinus*, zwłaszcza występowanie kumaryn pozwala na odróżnienie ich od innych roślin z rodziny *Oleaceae*. Wpływ naparów z liści jesionu wyniosłego na zmniejszoną produkcję ROS oraz mediatorów stanu zapalnego, m.in., TNF α , IL-8 i IL-1 β w modelu ludzkich neutrofilii przypisano złożonemu współdziałaniu flawonoidów, fenyloetanoidów,

kumaryn, irydoidów i sekoirydoidów (Kiss i wsp., 2020). Kumaryny wykazują właściwości, które mogłyby być wykorzystane w fotoprotekcji i podobnie, jak większość polifenoli mogą pełnić więcej niż jedną rolę. Kumaryny mogą absorbować fotony w paśmie UV (λ_{\max} w zakresie 330-355 nm) i mogą skutecznie zmniejszać poziom ROS (Tattini i wsp., 2014). Eskuletyna (6,7-dihydroksykumaryna) wykazuje działanie przeciwzapalne, przypisuje się jej działanie hamujące wydzielanie cytokin (TNF α , IL-1 β , IL-6) i chemokin poprzez blokowanie szlaku sygnałowego NF κ B (Jeong i wsp., 2018). Wykazano, że eskuletyna wykazuje działanie fotoochronne poprzez hamowanie mRNA MMP-1 (Sarfranz i wsp., 2017). Eskuletyna hamuje ekspresję MMP-1 wywołaną promieniowaniem UV poprzez hamowanie aktywności AP-1 i NF κ B, co wpływa na zapobieganie postępowi fotostarzenia się skóry. Wpływa też na zmniejszenie wywołanego przez UV uszkodzenia skóry (szorstkość i zwiotczenie), chroniąc przed utratą kolagenu. Ekstrakt z kory *F. excelsior* ze względu na działanie neutralizujące wolne rodniki oraz hamowanie aktywności elastazy i kolagenazy jest roślinnym surowcem zasługującym na badania pod kątem potencjalnego zastosowania w przemyśle dermokosmetycznym (Sarfranz i wsp., 2017).



Ryc. 6. Struktura dominujących substancji aktywnych w badanych ekstraktach roślinnych (opracowanie własne na podstawie: Bosso i wsp., 2021; Borjan i wsp., 2020; Sarfraz i wsp., 2017).

Część doświadczalna

5. Uzasadnienie podjęcia tematu

Nadmierna ekspozycja na promieniowanie UV powoduje rumień skóry i oparzenia słoneczne (UVB), a także reakcje fototoksyczne i fotoalergiczne (UVA), a odległymi w czasie skutkami mogą być wzmożona pigmentacja, zmiany przednowotworowe, immunosupresja i przedwczesne starzenie. Na poziomie molekularnym skutkiem długotrwałej ekspozycji na UV są uszkodzenia DNA, mutacje genów, stres oksydacyjny i reakcje zapalne – wszystkie te czynniki odgrywają kluczową rolę w procesach fotostarzenia i powstawania nowotworów skóry. Rak podstawnokomórkowy i płaskonabłonkowy (kolczystokomórkowy) oraz czerniak należą do jednych z najczęściej występujących nowotworów. Patogeneza tych schorzeń jest wieloczynnikowa, ale promieniowanie UV światła słonecznego, czy lamp w solariach, uważa się za główny czynnik etiologiczny. Promieniowanie UV, w tym UVA (320-400 nm) oraz UVB (290-320 nm), wchodzi w interakcję z komórkami skóry na zasadniczo różne sposoby. Promieniowanie UVB jest silnie absorbowane przez DNA, co prowadzi do bezpośredniego uszkodzenia DNA, podczas gdy DNA prawie nie absorbuje promieniowania UVA. Biologiczny efekt promieniowania UVA w znacznym stopniu zależy od obecności tlenu, oksydaz i endogennych fotosensybilizatorów, generując ROS, które uszkodzają DNA oraz inne biomolekuły (Dahle i Kvam, 2003). Chociaż UVA ma niższą energię niż UVB, nadmierna ekspozycja na UVA może powodować przedwczesne starzenie się skóry (Chu i wsp., 2019, Saewan i Jimtaisong, 2022). Przez wiele lat uważano, że promieniowanie UVB jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za szkodliwe działanie promieniowania słonecznego. Jednak promieniowanie UVA jest równie niebezpieczne, ponieważ jest najbardziej rozpowszechnionym składnikiem promieniowania słonecznego, wnika głębiej w skórę niż UVB oraz wywołuje zmiany w skórze właściwej. Promieniowanie UVA ma zdolność przenikania nie tylko przez naskórek, ale przez chmury, odzież oraz szklane szyby, toteż człowiek jest narażony na jego działanie przez cały rok. Skutki szkodliwego działania UVA na skórę są długofalowe, kumulują się i często są nieodwracalne. Podobnie jak promieniowanie UVB, tak i UVA zostało zaklasyfikowane przez IACR do czynników rakotwórczych klasy I (Cadet i Douki 2018). Choć konsekwencje szkodliwego wpływu promieniowania UV na skórę człowieka są znane, a fotoprotekcja oparta na osłonie przeciwsłonecznej jest ważną strategią zapobiegania fotostarzeniu i nowotworom skóry, jeszcze w ostatnich dekadach XX wieku nie doceniano negatywnego wpływu promieniowania UVA na skórę i w produktach ochrony przeciwsłonecznej stosowano głównie filtry chroniące przed UVB. W tym kontekście wyjaśnienie mechanizmów szkodliwego działania

promieniowania UVA na poziomie komórkowym i molekularnym, jak również identyfikacja związków roślinnych chroniących komórki skóry przed tym typem promieniowania są istotnym elementem niezbędnym dla szeroko pojętej profilaktyki starzenia i nowotworów skóry.

W ochronie przed promieniowaniem UV mają zastosowanie filtry przeciwsłoneczne, aplikowane miejscowo na powierzchnię skóry, a także preparaty doustne zawierające przeciwutleniacze, neutralizujące reaktywne formy tlenu. Obok filtrów mineralnych (tj. ditlenek tytanu, tlenek cynku) organiczne filtry UV (m.in., pochodne kwasu salicylowego, czy kamfory) są głównymi składnikami aktywnymi w produktach ochrony przeciwsłonecznej (Parrado i wsp., 2018). Stosowane filtry UV dość skutecznie chronią skórę przed rumieniem i zmianami barwnikowymi, jednak nie zapewniają wystarczającej ochrony przed uszkodzeniami DNA i modyfikacjami oksydacyjnymi pozostałych makromolekuł komórek skóry. Wykazano też, że niektóre syntetyczne filtry UV mogą powodować reakcje alergiczne i podrażnienia skóry (Nunes i wsp., 2018), ich fotostabilność jest często ograniczona (Dondi i wsp., 2006; Parrado i wsp., 2018), mogą być też toksyczne jako substancje zaburzające gospodarkę hormonalną (Chu i wsp., 2022), a ich uwalnianie do środowiska może być szkodliwe dla ekosystemów morskich (Morocho-Jácome i wsp., 2020).

Obecnie konsumenci poszukują produktów kosmetycznych zawierających w swoim składzie ekstrakty i oleje roślinne, pozbawionych sztucznych barwników oraz konserwantów, jednocześnie oczekują produktów skutecznych w działaniu. Innowacyjnym rozwiązaniem w ochronie przeciwsłonecznej jest wprowadzanie do preparatów naturalnie występujących związków i ekstraktów roślinnych. Szczególnie korzystnym aspektem stosowania naturalnych składników aktywnych w recepturze środków ochrony przeciwsłonecznej są ich właściwości antyoksydacyjne, ale także szereg innych aktywności biologicznych, m.in., właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe i przeciwgrzybicze), a także przeciwmutagenne, immunostymulujące, czy przyspieszające procesy gojenia. Obecnie stosowane filtry przeciwsłoneczne są coraz częściej wzbogacane w roślinne substancje bioaktywne, m.in., polifenole (w tym flawonoidy, antocyjany), kwasy fenolowe, steroidy i sterole, terpenoidy, polisacharydy (Morocho-Jácome i wsp., 2020). Dobrymi kandydatami na fotoprotektory są ekstrakty uzyskiwane z roślin, które charakteryzują się różnorodnością mechanizmów działania chroniących przed wieloma niepożądanymi skutkami promieniowania UV. Naturalne składniki aktywne, zwłaszcza oleuropeina (sekoirydoid), która łagodzi reakcję rumieniową skóry wywołaną promieniowaniem UV; kwasy kawoilochinowe i kawoiloferulowe, silnie pochłaniające promieniowanie przy 325 nm; czy

też związki kumarynowe, w tym eskuletyna, która jest znanym filtrem UV, mogą poprawić skuteczność działania filtrów UV. Liście oliwne są bogatym źródłem związków bioaktywnych, takich jak oleuropeina, werbaskozyd, rutyna, tyrozol i hydroksytyrozol, które wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwustrojowe i antyproliferacyjne (Rahmanian i wsp., 2015). Z kolei z różnych gatunków jesionów wyizolowano szereg składników chemicznych, w tym sekoirydoidy, fenyletanoity, lignany, flawonoidy i kumaryny, poza tym stwierdzono, że metabolity te, jak i zawierające je ekstrakty, wykazują różnorodne działania biologiczne, jak przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwdrobnoustrojowe, także regenerujące skórę. Eskuletyna, eskulina, fraksyna i fraksetyna to niektóre z farmakologicznie czynnych składników o działaniu antyoksydacyjnym, przeciwbakteryjnym, przeciwnowotworowym oraz przeciwzapalnym (Jeong i wsp., 2018).

Dotychczas brak 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 kawy dotyczą głównie fotoochrony przed promieniowaniem UVB. Mechanizmy fotoochronnego działania wybranych surowców roślinnych są słabo poznane. Wcześniejsze badania *in vitro* i *in vivo* dotyczące aktywności biologicznej ekstraktu z liści oliwki, który obecnie jest popularnym suplementem diety, koncentrowały się głównie na właściwościach antyoksydacyjnych i związanym z nimi działaniem przede wszystkim kardio- i chemoprewencyjnym, podczas gdy działanie ochronne na komórki skóry było rzadko badane (Özcan i Matthäus, 2017). Według dostępnych danych oleuropeina hamuje uszkodzenia skóry spowodowane promieniowaniem UVB u myszy, a hydroksytyrozol, strukturalna jednostka oleuropeiny, chroni DNA i hamuje prozapalną odpowiedź keratynocytów na działanie promieniowania UVB (Sumiyoshi i Kimura, 2010; Guo i wsp., 2010). Podobnie GCBE, charakteryzujący się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi, został wprowadzony do obrotu jako suplement diety ze względu na wiele korzyści zdrowotnych, m.in. jako środek pomocniczy podczas leczenia nadciśnienia (Ochiai i wsp., 2004), otyłości (Samadi i wsp., 2015, Sudeep i Shyam Prasad, 2021), czy hiperglikemii (Asbaghi i wsp., 2020). Mało natomiast wiadomo o fotoochronnej aktywności GCBE. Ekstrakt z liści *Coffea robusta*, bogate źródło kwasu chlorogenowego ze śladową zawartością kwasu kawowego, wykazuje działanie przeciwutleniające (m.in. redukuje poziom ROS) i przeciwzapalne (hamuje ekspresję COX-2 i inhibitora kappa B) w fibroblastach ludzkiej skóry, poddanych działaniu UVB, a także posiada zdolność do łagodzenia fotouszkodzeń wywołanych UVB u bezwłosych myszy BALB/c (Wu i wsp., 2017). Główne

składniki ekstraktów *Fraxinus* sp., czyli eskulina i eskuletyna wykazują silne działanie antyoksydacyjne. Eskuletyna ma zdolność wychwytywania ROS w ludzkich fibroblastach skóry (HDF) naświetlanych UVB, a także traktowanie komórek HDF eskuletyną przed naświetlaniem UVA wpływa na zmniejszenie ekspresji mRNA MMP-1 (Lee i wsp., 2007).

Naturalne, standaryzowane ekstrakty roślinne, bogate w składniki aktywne, zwłaszcza związki fenolowe, takie jak kwasy kawoilochinowe, oleuropeina, czy pochodne kumarynowe, dodane do receptury tradycyjnych filtrów UV, mogą poprawić skuteczność ich działania, co jednocześnie umożliwiłoby zmniejszenie zawartości filtrów syntetycznych w preparacie.

6. Założenia i cele badań

Głównym celem badań była ocena potencjału fotoochronnego ekstraktów z wybranych surowców roślinnych wobec fibroblastów skóry w warunkach *in vitro* oraz poznanie mechanizmów fotoprotekcji.

Podstawą hipotezy badawczej było założenie, że badane ekstrakty roślinne chronią ludzkie fibroblasty skóry (linii Hs68) przed szkodliwymi skutkami promieniowania UVA, ujawniając jednocześnie właściwości antyoksydacyjne, antyapoptotyczne oraz przeciwzapalne.

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej zostały podzielone na cele szczegółowe:

- 1) ocena cytotoksyczności ekstraktów roślinnych wobec badanych komórek (test CCK-8)
- 2) określenie udziału ekstraktów roślinnych w ochronie fibroblastów przed stresem oksydacyjnym indukowanym promieniowaniem UVA poprzez pomiar:
 - a. żywotności (test CCK-8)
 - b. poziomu uszkodzeń DNA (test kometowy)
 - c. poziomu wewnątrzkomórkowych ROS (metoda fluorescencyjna z H₂DCF-DA)
- 3) wskazanie prawdopodobnych mechanizmów odpowiedzialnych za działanie antyoksydacyjne i fotoochronne ekstraktów poprzez określenie ich wpływu na:
 - a. układ tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny (ekspresję TrxR metodą ELISA)
 - b. drogi śmierci komórkowej indukowanej promieniowaniem UVA z wykorzystaniem markerów apoptozy i senescencji (ocena stopnia eksternalizacji fosfatydyloseryny metodą cytometrii przepływowej, pomiar aktywności kaspaz -8, -9 i -3 (testy z substratami chromogennymi) oraz β -galaktozydazy związanej ze starzeniem metodą ELISA)

- c. produkcję metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP -1, -3 i -9 metodą ELISA)
 - d. główne szlaki sygnałowe z udziałem supresora nowotworowego p53, czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFκB oraz białka Klotho (metoda ELISA)
- 4) ocena przeciwzapalnego działania ekstraktów poprzez pomiar stężenia wydzielanych cytokin prozapalnych IL-2 i TNFα (metoda ELISA)
 - 5) pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekstraktów roślinnych (metodą FRAP oraz metodą redukcji kationorodnika ABTS⁺ i rodnika DPPH) oraz wyznaczenie wskaźnika ochrony przeciwslonecznej (SPF)

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji ds. Bioetyki Badań Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego – uchwała nr 12/KBBN-UŁ/III/2018.

7. Materiały

7.1. Materiał badawczy

Przedmiotem badań były dwa komercyjne ekstrakty roślinne z:

- liści oliwki (*Olea europaea*); rodzina oliwkowate (*Oleaceae*)
- nasion kawy (*Coffea robusta*); rodzina marzanowate (*Rubiaceae*)

oraz trzy ekstrakty wyizolowane w Zakładzie Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z następujących surowców roślinnych:

- kory i liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*); rodzina oliwkowate (*Oleaceae*)
- kory jesionu koreańskiego (*Fraxinus rhynchophylla*); rodzina oliwkowate (*Oleaceae*)

Materiał biologiczny do badań stanowiły:

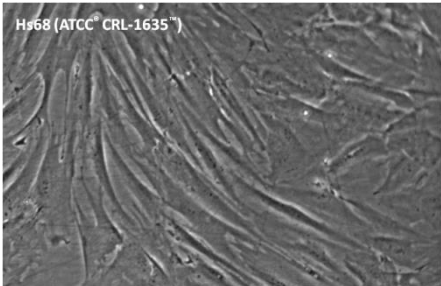
- linia ludzkich fibroblastów skóry – Hs68
- jednojądrzaste komórki krwi obwodowej – (ang. peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)

Komórki linii Hs68 zakupiono w American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, Stany Zjednoczone).

Komórki jednojądrzaste (PBMCs) izolowano z kożuszków leukocytno-płytkowych zakupionych w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi (krew od dawców była pobierana do zestawu z antykoagulantem CPD (cytrynian trisodowy, fosforan, glukoza)).

7.2. Charakterystyka linii komórkowej

Tabela 1. Specyfikacja linii komórkowej Hs68

Linia Hs68 (ATCC® CRL-1635™)	
Organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek
Pierwotne usytuowanie	Skóra, napletek
Morfologia	Fibroblasty
Typ wzrostu komórek	Wzrost w postaci monowarstwy (linia komórek adherentnych)
Choroba	Niedobór aspartoacylazy
Dane kliniczne (płeć/wiek)	Mężczyzna rasy kaukaskiej
Pochodzenie	Hs68 jest jedną z serii linii ludzkich fibroblastów skóry opracowanych w Naval Biosciences Laboratory (NBL) w Oakland w Kalifornii. Materiał uzyskano od nowonarodzonego mężczyzny rasy kaukaskiej w lutym 1969 roku.
Nowotworowość	Nie
Zdjęcie*	

*Zdjęcie reprezentatywne przedstawiające morfologię komórek wykorzystanych w doświadczeniach wykonano przy pomocy mikroskopu świetlnego kontrastowo-fazowego o odwróconej optyce model Primo Vert firmy Carl Zeiss z kamerą AxioCam 105 color (autorstwa Paulina Machała).

7.3. Odczynniki chemiczne

Tabela 2. Odczynniki chemiczne zastosowane w doświadczeniach

Odczynniki chemiczne
Odczynniki do hodowli komórkowej
<ul style="list-style-type: none"> • Biological Industries (Cromwell, USA): bufor HBSS (Hanks` Balanced Salt solution) bez czerwieni fenolowej; DPBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺; PBS; • Biowest (Nuaille, Francja): inaktywowana termicznie płodowa surowica bydłęca (FBS); • Lonza (Basel, Szwajcaria): medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z 4,5 g/L glukozą i L-glutaminą; • Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): antybiotyki penicylina i streptomycyna; RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640) medium z L-glutaminą; trypsyna-EDTA;
Komercyjne zestawy odczynników
<ul style="list-style-type: none"> • BioVision (Mountain View, CA, USA): Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kit #K106-100; FLICE/Caspase-8 Colorimetric Assay Kit #K113-100; Caspase-9 Colorimetric Assay Kit #K119-100; Thioredoxin Reductase 1 (TXNRD1) Human SimpleStep ELISA® Kit (ab192150; Abcam, Cambridge, UK) • Boster Biological Technology (Valley Ave, Pleasanton, California, USA): Human KL PicoKine™ ELISA #Ek1688; • Glory Science (TX, USA): Human Transcription Factor/Activator Protein 1 (AP-1) ELISA Kit #H7438; • Krishgen BioSystems (Mumbai, India): Human TNF-α GENLISA™ ELISA KB1145; Human IL-2 GENLISA™ ELISA KB1064; • Qayee Biotechnology (Shanghai, China): Human NFκB1 ELISA Kit; • Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): Cell Counting Kit-8 (CCK-8); • Wuhan Fine Biological Technology Co., Ltd., (Wuhan, China): Human MMP-1 (Matrix Metalloproteinase 1) ELISA Kit EH3656; Human MMP-3 (Matrix Metalloproteinase 3) ELISA Kit EH0235; Human MMP-9(Matrix Metalloproteinase 9) ELISA Kit EH0238; Human Total P53 (Tumor Protein p53) ELISA Kit EH3898;
Pozostałe odczynniki
<ul style="list-style-type: none"> • Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): 5-amino-2,3-dihydroftalazyn-1,4-dionu (luminol);

aceton; agarozą LMP (o niskiej temperaturze topnienia); agarozą NMP (o normalnej temperaturze topnienia); albumina surowicy bydłowej (BSA); błękit trypanu; dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI); dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (H2DCF-DA); Histopaque®-1077; kwas 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS); kwas 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoesowy) (DTNB); kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy (Trolox); kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA); odczynnik Bradford; Triton™ X-100; Tween® 20; kwercetyna; rutyna; kwas askorbinowy; 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ); 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); RIPA Lysis Buffer;

- Bio-Rad (Hercules, USA): Precision Plus Protein™ Dual Color Standards;
- POCH (Gliwice, Polska): H2O2; etanol; HCl; NaOH; metanol; glicyna; DMSO; sodium dodecyl sulfate (SDS); Tris; H2SO4; NaH2PO4·H2O; Na2HPO4;

7.4. Aparatura

- Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA: cyfrowy analityczny cytometr przepływowy model LSR® II
- Bio-Rad, Hercules, USA: automatyczny licznik komórek model TC20™
- Bio-Rad, Hercules, USA: czytnik mikroplitek UV-Vis Bio-Rad 550
- BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Niemcy: czytnik mikroplitek UV-Vis SPECTROstar Nano
- Carl Zeiss z kamerą AxioCam 105 color, Oberkochen, Niemcy: mikroskop świetlny kontrastowo-fazowy o odwróconej optyce
- Cleaver Scientific Ltd., Rugby, Wielka Brytania: aparat do elektroforezy kometowej model CSL-COM20
- Froilabo, Meyzieu, Francja: zamrażarka laboratoryjna głębokiego mrożenia model BM EVO 515
- INFORS HT, Bottmingen, Szwajcaria: kołyska laboratoryjna model WAVETEC
- Jenoptik, Tokio, Japonia: mikroskop fluorescencyjny o odwróconej optyce model Eclipse E400 firmy Nikon z kamerą ProgRes MF cool
- Kucharczyk, Warszawa, Polska: blok grzejno-chłodzący Hot Winter 3 - model Combitherm-2 CH3-150 firmy BioSan (Korneuburg, Austria)

- lampa rtęciowa o mocy 60 W (EMITA VP-60)
- lampa UV – ML3500 Series MAXIMA (typ ML-3500S)
- MPW MED. Instruments, Warszawa, Polska: wirówka model MPW-352R
- MPW, Warszawa, Polska: wirówka MPW 260R
- MPW, Warszawa, Polska: wirówka MPW 370
- Nüve, Ankara, Turcja: cieplarka laboratoryjna model EN 400
- Nüve, Ankara, Turcja: inkubator CO₂ do hodowli komórek model EC 160
- RADWAG, Radom, Polska: wagi laboratoryjne: analityczna – model AS 60/220.R2; precyzyjna – model PS 200/2000.R2.H
- Sigma, Osterode am Harz, Niemcy: wirówka model 3K30
- Spektrofotometr UV/VIS T60
- Thermo Scientific™, Waltham, Stany Zjednoczone: czytnik płytek do pomiaru fluorescencji model Fluoroskan™
- Thermo Scientific™, Waltham, Stany Zjednoczone: komora z przepływem laminarnym model Safe 2020
- Unicam, Cambridge, Wielka Brytania: spektrofotometr Helios UV-Vis

8. Metody

8.1. Hodowla komórkowa

Hodowlę komórek Hs68 prowadzono w pożywce DMEM o wysokiej zawartości glukozy z L-glutaminą oraz pirogronianem sodu, wzbogaconej o czerwień fenolową, z dodatkiem 10% FBS oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 mg/ml). Komórki hodowano w standardowych warunkach w inkubatorze CO₂ (37°C, 5% CO₂ i 90% wilgotnością). Po osiągnięciu 80% konfluencji, komórki regularnie pasażowano, używając do badań fibroblasty w wykładniczej fazie wzrostu.

Pasażowanie komórek adherentnych: po usunięciu medium hodowlanego, monowarstwę komórek przemywano buforem DPBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺. Następnie dodano roztwór trypsyny – EDTA (0,25%), w celu odklejenia komórek od podłoża. Inkubację z trypsyną prowadzono w inkubatorze CO₂ czasie 3-5 min, kontrolując ten proces pod mikroskopem. Po odklejeniu komórek dodano medium hodowlane, a następnie zawiesinę komórkową przenoszono do nowych, sterylnych butelek hodowlanych, uzupełniając do wymaganej objętości pożywką hodowlaną (DMEM).

Każdorazowo po pasażu komórkowym oceniano żywotność fibroblastów. Do oceny wykorzystywano błękit trypanu – barwnik wnikaający do komórek o uszkodzonej błonie komórkowej zabarwia takie komórki na niebiesko. Zawiesinę komórkową wraz z barwnikiem zmieszano w stosunku (1:1), a następnie zliczano pod mikroskopem, przy użyciu komory Thoma®. Liczbę komórek w przeliczeniu na 1 ml wyliczano na podstawie wzoru: $4 \times 10^6 \times a \times n$, w którym a – to średnia liczba komórek w małym kwadracie komory; n - rozcieńczenie badanej próby. Na tej podstawie sporządzano zawiesinę komórkową o pożądanej gęstości. Żywotność komórek wynosiła $99 \pm 5\%$.

8.1.1. Wysiewanie komórek do inkubacji z badanymi ekstraktami roślinnymi

Komórki wysiewano na przezroczyste lub czarne, jałowe 96-dołkowe płytki hodowlane lub przezroczyste płytki 6-dołkowe, w zależności od prowadzonego doświadczenia. Również liczba komórek była uzależniona od wykonywanego eksperymentu. W celu utworzenia monowarstwy, czyli przyklejenia się komórek do podłoża, hodowlę komórkową zakładano 24 godziny przed inkubacją z ekstraktami.

8.2. Oznaczanie profilu fitochemicznego badanych ekstraktów roślinnych

Metodyka analizy fitochemicznej, jakościowej UHPLC-PDA-ESI-MS³ oraz ilościowej HPLC, została przeprowadzona przez Zakład Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego UMED w Łodzi w ramach prowadzonej współpracy. Metodyka ta została zamieszczona w rozdziale 13 – Suplement.

8.3. Przygotowanie roztworów macierzystych ekstraktów roślinnych

Ekstrakty roślinne metanolowe (z *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus rhynchophylla*) oraz etanolowo-wodne (z *Olea europaea* oraz *Coffea robusta*) rozpuszczano w DMSO, otrzymując roztwory o stężeniu wyjściowym 20 mg/ml. Antyoksydanty stanowiące kontrolę pozytywną (kwercetyna i rutyna) również były rozpuszczane w DMSO (roztwory macierzyste 20 mg/ml) lub w wodzie (kwas askorbinowy). Końcowe stężenie DMSO w przygotowywanych próbkach nie przekraczało 0,125%.

8.3.1. Inkubacja komórek z ekstraktami roślinnymi i naświetlanie

Badane ekstrakty roślinne uprzednio rozcieńczone do określonych stężeń dodawano do komórek w proporcji objętościowej 1/100 i inkubowano przez 24 godziny. Przed etapem naświetlania komórki trzykrotnie przemywano DPBS, następnie naświetlano dawką 8 J/cm^2

promieniowania UVA, pozostawiając cienką warstwę DPBS. Po naświetlaniu powtórzono proces przemywania, w końcowym etapie dodawano świeże medium hodowlane. Optymalna zastosowana dawka promieniowania została ustalona wcześniej doświadczalnie, tak aby uzyskać zauważalne uszkodzenia komórkowe i aby odsetek żywych komórek wynosił około 80%. Równolegle sporządzano kontrolę fibroblastów, do której dodawano DMSO zamiast badanych związków roślinnych. Jednocześnie dla każdego doświadczenia przygotowywano identyczne zestawienie prób, które nie poddawano naświetlaniu. W badaniach wstępnych do naświetlania fibroblastów stosowano lampę rtęciową o mocy 60 W (EMITA VP-60), natomiast w pozostałych badaniach stosowano lampę UV – ML3500 Series MAXIMA (typ ML-3500S), każdorazowo dostarczając taką samą dawkę promieniowania – 8 J/cm². Analizy biochemiczne wykonywano po naświetlaniu w czasie wymaganym w danym eksperymencie. Do niektórych oznaczeń wykorzystywano supernatanty komórkowe, uzyskiwane przez odwirowanie (2600 obr./min, 15 min, wirówka MPW 260R). Supernatanty zamrażano i przechowywano do dalszych oznaczeń (-20°C/-80°C).

8.4. Ocena cytotoksyczności ekstraktów roślinnych

W celu określenia czy badane ekstrakty roślinne i kontrolne antyoksydanty nie są cytotoksyczne wobec komórek Hs68 prowadzono 48-godzinną hodowlę komórkową w medium z dodatkiem ekstraktów w badanych stężeniach (2,5; 5; 10; 25 µg/ml). Po wyznaczonym czasie inkubacji wykonywano test CCK-8, analogicznie jak w przypadku określania żywotności fibroblastów po naświetleniu (podrozdział 8.5.). Przeżywalność komórek Hs68 przedstawiono w postaci „% kontroli”, przyjmując absorbancję w komórkach kontrolnych (nieinkubowanych z ekstraktami) jako 100%.

$$\text{żywotność [\%]} = \frac{\text{absorbancja próby inkubowanej z ekstraktem} \times 100\%}{\text{absorbancja próby kontrolnej}}$$

8.5. Metody oceny żywotności komórek i poziomu stresu oksydacyjnego

8.5.1. Oznaczanie żywotności komórek Hs68 po naświetleniu testem spektrofotometrycznym z CCK-8

Zasada metody:

Metaboliczny test oznaczania żywotności komórek jest oparty na pomiarze absorbancji barwnego formazanu, produktu redukcji (dzięki aktywności enzymów oksydoredukcyjnych, przede wszystkim dehydrogenaz komórkowych żywych komórek) rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazoliowej WST-8 (sól monosodowa 2-(2-metoksy-4-nitrofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazolu). Powstały formazan charakteryzuje się pomarańczowym zabarwieniem, a ilość aktywnych metabolicznie komórek jest proporcjonalna do intensywności zabarwienia medium komórkowego. Roztwór wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ nm. Oznaczenia wykonywano za pomocą komercyjnego zestawu – Cell Counting Kit-8, Code 96992 - zgodnie z metodą opisaną przez producenta (Sigma-Aldrich).

Przebieg oznaczenia:

Fibroblasty wysiewano na jałowe, przezroczyste 96-dółkowe mikropłytki w liczbie 10000 komórek na dółek (1×10^4), przeznaczone do naświetlania na jedną płytkę, natomiast komórki nienaświetlane na drugą płytkę, w co najmniej 3 powtórzeniach. Przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze (37°C , 5% CO_2 i 90% wilgotności), w celu utworzenia monowarstwy. Po inkubacji usunięto pożywkę hodowlaną z nad komórek, dodano świeżą pożywkę bez dodatku FBS oraz badane związki roślinne. Inkubowano przez 24 godziny w analogicznych warunkach, po czym usuwano medium, monowarstwę przemywano dwukrotnie DPBS (w/o Ca^{2+} , w/o Mg^{2+}). Dodawano DPBS oraz naświetlano fibroblasty dawką promieniowania równą 8 J/cm^2 . Powtórzono etap przemywania, następnie dodawano świeże medium bez FBS i inkubowano w inkubatorze (37°C , 5% CO_2) przez 48 godzin. Po upływie czasu inkubacji komórki przepłukiwano DPBS, nanosząc świeże medium oraz odczynnik CCK-8. Po 3-godzinnej inkubacji dokonywano pomiaru absorbancji przy $\lambda=490$ nm na czytniku mikropłyttek (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Niemcy: czytnik mikropłyttek UV-Vis SPECTROstar Nano).

Odsetek żywych fibroblastów Hs68 po naświetleniu UVA obliczano wg poniższego wzoru przyjmując absorbancję odpowiedniej kontroli nienaświetlanej jako 100%.

$$\text{żywołność [\%]} = \frac{\text{absorbancja próby naświałlanej} \times 100\%}{\text{absorbancja zbieżnej próby nienaświałlanej}}$$

8.5.2. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekstraktów roślinnych

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC, ang. Total antioxidant capacity) ekstraktów z: *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus rhynchophylla*, *Olea europaea* oraz *Coffea robusta* oznaczono trzema wybranymi metodami.

8.5.2.1. Zdolność zmiatania kationorodnika ABTS⁺

Zasada metody: Zdolność ekstraktów roślinnych do redukcji kationorodnika ABTS^{•+} oznaczano według metody Re i wsp. (Re i wsp., 1999). Utlenianie ABTS nadsiarczanem potasu prowadzi do wytworzenia zielononiebieskiego chromoforu kationorodnika ABTS^{•+}, ulegającemu odbarwieniu pod wpływem przeciwutleniaczy obecnych w badanej próbce. Spadek absorbancji przy $\lambda=414$ nm jest miarą TAC.

Przebieg oznaczenia: ABTS rozpuszczono w 10 mM buforze sodowo fosforanowym o pH 7,4, dodając nadsiarczan potasu. Następnie roztwór przechowywano w temperaturze pokojowej przez 12 godzin (w ciemności). Macierzysty roztwór kationorodnika rozporcjonowano i zamrożono (-20°C). Przed każdym pomiarem roztwór macierzysty kationorodnika ABTS^{•+} rozcieńczano 10mM buforem sodowo fosforanowym o pH 7,4 do osiągnięcia absorbancji około 1,0 przy $\lambda=414$ nm.

Do 200 μ l 0,4 M buforu octanowego (pH 5,8) dodawano po 5 μ l badanych ekstraktów. Mierzono absorbancję w czytniku mikroplatek UV-Vis SPECTROstar Nano firmy BMG LABTECH płytek, przy $\lambda = 415$ nm (A0). Do każdej studzienki na płytce 96-dołkowej dodawano po 20 μ l 10 mM roztworu kationorodnika ABTS^{•+} w 30 mM buforze octanowym (pH 3,6). Jednocześnie sporządzano próbę kontrolną (blank) zawierającą 205 μ l 0,4 M buforu octanowego (pH 5,8) z 20 μ l roztworu kationorodnika ABTS^{•+}. Płytkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, następnie mierzono absorbancję przy $\lambda = 415$ nm (A1). Sporządzano krzywą wzorcową dla Troloxu (0,008 – 1,0 μ mol/ml). Absorbancję mierzono przy 415 nm, następnie dodawano po 20 μ l roztworu kationorodnika ABTS^{•+}. Próbkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej i ponownie mierzono absorbancję przy długości fali 415 nm. TAC ekstraktów, wyrażony w jednoelektronowych równoważnikach Troloxu, obliczono na podstawie różnic absorbancji A1 – A0 (po uprzednim odjęciu: A1

BLANK – A0 BLANK), krzywej wzorcowej oraz poprzez pomnożenie uzyskanego wyniku 2 razy (1 cząsteczka Troloxu reaguje z 2 wolnymi rodnikami). Oznaczenie wykonano w 4 niezależnych powtórzeniach.

8.5.2.2. Metoda FRAP

Zasada metody: Metoda oparta jest na redukcji jonów Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} , które są kompleksowane przez TPTZ (2,4,6-tripirydylo-S-triazynę) z wytworzeniem intensywnie niebieskiego zabarwienia. Zmiana absorbancji wytworzonego kompleksu TPTZ- Fe^{2+} jest proporcjonalna do zawartości antyoksydantów w badanej próbce. Kompleks wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 593 nm.

Przebieg oznaczenia: Ekstrakty oraz związki referencyjne: kwas askorbinowy, kwercetynę i rutynę rozpuszczano w 50% DMSO (uzyskiwano roztwory o stężeniu 5 mg/ml), a następnie kolejno rozcieńczano tym samym roztworem w celu otrzymania roztworów o stężeniach 5, 10, 20, 40, 80 μ g/ml. Przygotowano 10 mM roztwór TPZT w 40 mM HCl, 20 mM roztwór $FeCl_3$ oraz sporządzono krzywą wzorcową (z użyciem $FeSO_4$).

Do 240 μ l roztworu roboczego (bufor octanowy + TPTZ + $FeCl_3$) dodawano po 20 μ l badanych ekstraktów. Próbkę inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym zmierzono absorbancję przy długości fali 593 nm na czytniku mikroplótek UV-Vis SPECTROstar Nano firmy BMG LABTECH. Określono przyrost wartości absorbancji ΔA poszczególnych próbek w stosunku do absorbancji próby odczynnikowej. Zdolność redukującą badanych próbek wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej (wyniki wyrażono w ekwiwalentach jonów żelaza – mmolach Fe^{2+} /g suchego ekstraktu).

8.5.2.3. Metoda redukcji rodnika DPPH \cdot

Zasada metody: Rodnik DPPH \cdot (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) w roztworze metanolowym charakteryzuje się intensywnie fioletowym zabarwieniem o maksimum absorpcji przy długości fali 517 nm. Rodnik ulega redukcji pod wpływem wychwytywania elektronów pochodzących od substancji antyoksydacyjnych, w wyniku czego powstaje słabo zabarwiony produkt. Zmiana zabarwienia została zarejestrowana spektrofotometrycznie.

Przebieg oznaczenia: Ekstrakty oraz związki referencyjne rozpuszczano w 50% DMSO, a następnie kolejno rozcieńczano w celu otrzymania roztworów o stężeniach w zakresie: 10-80 μ g/ml. Sporządzono macierzysty metanolowy roztwór rodnika DPPH \cdot , w celu przygotowania roboczego roztworu o absorbancji około 1,4. Na płytkę nanoszono po 20 μ l

prób badanych oraz po 400 µl roboczego metanowego roztworu rodnika DPPH'. Mieszaninę inkubowano w ciemności przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie odczytano absorbancję przy długości fali 517 nm na czytniku mikropłytek UV-Vis SPECTROstar Nano firmy BMG LABTECH. Spadek absorbancji ($A_0 - A$) jest miarą ilości antyoksydantów obecnych w próbce. Wyznaczono %RSA (ang. *Radical Scavenging Activity*), czyli zdolność do przeciwdziałania reakcji utleniania dla średnich wartości absorbancji w badanych próbkach, na podstawie wzoru:

$$\%RSA = 100 \times (A_0 - A)/A_0,$$

gdzie A_0 – absorbancja próby kontrolnej, A – absorbancja prób badanych.

8.5.3. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową (elektroforeza pojedynczej komórki)

Zasada metody:

Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym pojedynczej komórki pozwala na analizę uszkodzeń materiału genetycznego, powstałych na skutek działania czynników genotoksycznych. Elektroforeza pojedynczych komórek (ang. *single cell gel electrophoresis*, *SCGE*), umożliwia analizę pęknięć DNA, zarówno jednoniciowych, jak i dwuniciowych. Trwająca elektroforeza pozwala na migrację DNA w stronę anody z prędkością uzależnioną od rozmiarów cząsteczki. Obraz spod mikroskopu uszkodzonej komórki przypomina wyglądem kometę: „głowa” odpowiadająca miejscu unieruchomienia komórki przed lizą oraz „ogon” stanowiący fragmenty i pętle nici DNA, uwolnione ze struktur jądrowych w wyniku pęknięć DNA. Uszkodzenia DNA w fibroblastach oznaczono za pośrednictwem testu kometowego w alkalicznej wersji według Singh i wsp. (Singh i wsp., 1988) z kilkoma modyfikacjami (Klaude i wsp., 1996). Poziom uszkodzeń DNA określany jest jako % DNA zawartego w „ogonie” (Czubaszek i wsp., 2014).

Przebieg doświadczenia:

Komórki wysiewano na jałowe płytki 6-dołkowe, w liczbie $2 \cdot 10^5$ komórek/ml. Po 24-godzinnej inkubacji dodawano badane ekstrakty roślinne o odpowiednich stężeniach (w zakresie 5–25 µg/ml), a także związki referencyjne (kwas askorbinowy, kwercetynę i rutynę) do końcowego stężenia 25 µg/ml, komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny. Po upływie czasu inkubacji przepłukiwano komórki roztworem DPBS oraz naświetlano promieniowaniem UVA (8 J/cm^2), wymieniano medium i prowadzono dalszą 24-godzinną

inkubację, umożliwiając naprawę powstałych uszkodzeń DNA. Równocześnie przygotowywano identyczny zestaw prób, które nie były traktowane promieniowaniem UVA. W kolejnym etapie poddawano komórki trypsynizacji, celem ich odklejenia od płytki, wirowano. Osad komórkowy zawieszano w roztworze agarozy o niskim punkcie topnienia (LMP). Przygotowaną zawiesinę komórek nanoszono na szkiełko podstawowe, opłaszczone agarozą o normalnym punkcie topnienia (NMP), przykrywano nakrywkowym szkiełkiem, pozostawiano do czasu zestalenia agarozy. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki narażone na działanie 10 μM H_2O_2 przez 10 minut na lodzie. Komórki poddawano procesowi lizy w buforze lizującym (zawierającym 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris pH 10; 1 godzina, 4°C), w celu uwolnienia DNA. Następnie szkiełka przemywano buforem rozwijającym i umieszczano w tym samym buforze (3 M NaOH, 1 mM EDTA) na okres 20 minut. Wykonywano elektroforezę (20 min, 17 V, 32 mA w buforze elektroforetycznym: 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) (Czubatka i wsp., 2015). Po zakończonej elektroforezie, szkiełka pozostawiano do wysuszenia, a następnie barwiono roztworem DAPI. Komórki zliczano pod mikroskopem fluorescencyjnym Nikon Eclipse (Nikon, Tokio, Japonia), wyposażonym w kamerę video 4910 COHU (Cohu, Inc., San Diego, CA) i komputerem z oprogramowaniem Lucia-Comet v.4.51 (Laboratorium Obrazowania, Praga, Republika Czeska). Analiza była oparta na zliczeniu 100 przypadkowo wybranych komet w odniesieniu do wszystkich preparatów. Poziom uszkodzeń DNA w naświetlonych fibroblastach wyrażano jako procentowa zawartość DNA w „ogonie”, po odjęciu uszkodzeń endogennych (% DNA w „ogonie” w zbieżnej próbce nienaświetlanej).

8.5.4. Określenie poziomu ROS (metoda z H_2DCFDA)

Zasada metody: metoda opiera się na utlenianiu sondy fluorescencyjnej $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (dioctanu dihydrodichlorofluoresceiny) przez istniejące wewnątrzkomórkowe ROS. Sonda $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ to chemicznie zredukowana forma fluoresceiny. Posiada ona możliwość swobodnego przenikania do wnętrza komórki, poprzez błonę komórkową, a tam ulega hydrolizie (deacetylacji) do niefluoryzującej H_2DCF , na skutek działania esteraz. W następnym etapie sonda ulega utlenieniu przez wewnątrzkomórkowe ROS, tworząc końcowy produkt reakcji, jakim jest 2',7'-dichlorofluoresceina (DCF), charakteryzująca się silną fluorescencją. Związek ten pozostaje w cytozolu komórek, wykazując maksimum wzbudzenia przy długości fal wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ i maksimum emisji, przy długości fal emisji $\lambda_{\text{em}} = 529 \text{ nm}$. Intensywność fluorescencji sondy jest wprost proporcjonalna do ilości

reagujących z nią ROS, obecnych w komórce. Oznaczenie wykonano na podstawie metody opisanej przez Balcerczyk i wsp. (Balcerczyk i wsp., 2005), a wyniki przedstawiono jako % kontroli, przyjmując za 100% ilość względnych jednostek fluorescencji (RFU) w fibroblastach kontrolnych (nietraktowanych ekstraktami) po naświetleniu (obliczano różnice w RFU pomiędzy kontrolą naświetlaną i nienaświetlaną).

Przebieg doświadczenia:

Komórki wysiewano na czarne, sterylne 96-dołkowe płytki w liczbie 1×10^4 komórek/ml. Prowadzono 24-godziną inkubację, dodawano ekstrakty roślinne w odpowiednich stężeniach i ponownie poddawano 24-godzinnej inkubacji. Próby przepłukiwano dwukrotnie za pomocą sterylnego HBSS do każdego dołka dodawano po 100 μ l roztworu HBSS (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES, 1% glukoza), zawierającego H₂DCFDA o stężeniu końcowym 10 μ mol/l (10 μ M). Komórki inkubowano z sondą przez 30 minut w inkubatorze CO₂ (37°C, 5% CO₂ i 90% wilgotności). Nadmiar sondy odpłukiwano dwukrotnie za pomocą HBSS, pozostawiając ostatecznie niewielką ilość roztworu HBSS, naświetlano komórki promieniowaniem UVA (dawka 8 J/cm²). Odczytów natężenia fluorescencji dokonywano po 120 minutach od zakończenia naświetlania, w urządzeniu Fluorocan firmy Thermoscientific (długość fali wzbudzenia 485 nm i emisji 538 nm).

8.5.5. Oznaczanie poziomu ekspresji reduktazy tioredoksyny

Pomiar poziomu ekspresji TrxR w lizatach komórkowych przeprowadzono metodą ELISA zgodnie z instrukcją producenta, stosując następujący zestaw: Thioredoxin Reductase 1 (TXNRD1) Human SimpleStep ELISA® kit (ab192150, Abcam, Cambridge, UK). Test wykorzystuje znakowane przeciwciało wychwytyjące i drugorzędowe przeciwciało skoniugowane z enzymem (HRP).

Przebieg oznaczenia: do wykreślenia krzywej wzorcowej zastosowano następujące stężenia roztworów wzorcowych: 0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 ng/mL. Supernatanty komórkowe wirowano przez 20 minut, 1000 x g, w temperaturze 2°C. Do wyznaczonych dołków 96-dołkowej mikropłytki nanoszono po 50 μ l prób badanych oraz po 50 μ l mieszaniny przeciwciał wychwytyjących, a następnie po przemyciu przeciwciał wykrywających. Płytkę inkubowano 1 godzinę na wytrząsarce w temp. pokojowej. W końcowym etapie nanoszono po 100 μ l substratu TMB, inkubowano przez 10 minut

w ciemności, w temp. pokojowej, na wytrząsarce (400 rpm), po czym dodawano roztwór zatrzymujący reakcję i natychmiast oznaczano absorbancję przy długości fali 450 nm, przy użyciu czytnika mikroplatek UV-Vis (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Niemcy: czytnik mikroplatek UV-Vis SPECTROstar Nano). Stężenie TXNRD1 w próbkach badanych określono na podstawie uzyskanych absorbancji i krzywej wzorcowej.

8.6. Metody oznaczania procesów śmierci komórkowej z wykorzystaniem markerów apoptozy i senescencji

8.6.1. Pomiar odsetka komórek apoptotycznych metodą cytometrii przepływowej

Jednym z wczesnych zdarzeń apoptotycznych jest eksternalizacja fosfatydyloseryny (PS) na zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Aneksyna V sprzężona z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) służy, jako czuła sonda do analizy zachodzącej w komórkach apoptozy metodą cytometrii przepływowej. Jednoczesne barwienie aneksyną V (FITC) i jodkiem propidyny (PI), który wiąże się z DNA, umożliwia wykrycie komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Zastosowana metoda pozwala na wyróżnienie różnych populacji fibroblastów: (1) żywe (nie wiążące ani aneksyny, ani PI), (2) wczesnoapoptotyczne (wiążące w różnym stopniu aneksynę), (3) późnoapoptotyczne i nekrotyczne (wiążące oba barwniki), (4) nekrotyczne (barwiące się PI).

Przebieg doświadczenia – Komórki wysiewano na jałowe, przezroczyste 6-dołkowe mikroplatek w liczbie 400000 komórek na dołek (4×10^5 , 400000 kom/mL), przeznaczone do naświetlania na jedną płytkę, natomiast komórki nienaświetlane na drugą płytkę, w co najmniej 3 powtórzeniach. Przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze (37°C, 5% CO₂ i 90% wilgotności), w celu utworzenia monowarstwy. Po inkubacji usunięto medium nad komórek, dodano świeże medium bez dodatku FBS oraz badane związki roślinne. Inkubowano przez 24 godziny w analogicznych warunkach, po czym usuwano medium, monowarstwę przemywano dwukrotnie DPBS (w/o Ca²⁺, w/o Mg²⁺). Dodawano DPBS oraz naświetlano płytki dawką promieniowania równą 8 J/cm². Po 24-godzinnej inkubacji poddano komórki procedurze odklejania roztworem 15mM EDTA z 1% BSA w PBS. Probówki z kontrolami: dodatnimi, negatywną, kontrolę niebarwioną i próby badane odwirowano (200 x g, 5 min., temperatura pokojowa) a uzyskane osady zawieszono w 0,5 ml buforu do wiązania aneksyny V. Następnie dodano odpowiednie znaczniki, czyli po 5 µl aneksyny V i 5 µl PI. Zawiesinę komórek delikatnie zworteksowano i inkubowano próbki w ciemności przez 15 min., temperatura pokojowa. Do

próbówek dodano po 500 μ l buforu do wiązania, przeniesiono zawiesinę do próbek cytometrycznych. Analizę przeprowadzono przy pomocy cytometru przepływowego BD™ LSR II (Becton Dickinson; San Diego, Stany Zjednoczone), zliczając minimum 10 000 obiektów (komórki Hs68 znakowane aneksyną V-FITC/PI) przy długości fali FITC (ex/em = 488/518 nm; kanał FL1) oraz PI (ex/em = 488-540/617 nm; kanał FL2). Otrzymane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo_v.10.7.2 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Część badań wykonano także na cytometrze CyFlow Cube 6 (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Niemcy), przy długości fali wzbudzenia lasera 488 nm i filtrze emisyjnym 530 nm. Dane analizowano za pomocą oprogramowania FCM CyFlow opartego na systemie Windows™. Wyniki przedstawiono jako odsetek żywych komórek oraz jako „indeks apoptotyczny”, wyrażony przez iloraz liczby komórek apoptotycznych oraz liczby komórek żywych.

8.6.2. Pomiar aktywności kaspaz -8, -9 i -3

Aktywność kaspazy -3, -8 i -9 oznaczano w lizatach komórkowych stosując komercyjne zestawy firmy BioVision: Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit # K106-100; FLICE/Caspase-8 Colorimetric Assay Kit #K113-100 oraz Caspase-9 Colorimetric Assay Kit #K119 -100.

Zasada metody – kaspazy -8, -9

Do lizatu dodawano specyficzny substrat dla badanej proteazy skoniugowany z p-nitroaniliną (pNA). Proteolityczne cięcie peptydu (IETD-pNA lub LEHD-pNA), w wyniku aktywności odpowiednio kaspazy -8 lub kaspazy-9, powoduje uwolnienie pNA, co objawia się pojawieniem żółtego zabarwienia. Absorbancję odczytuje się przy długości fali $\lambda = 405$ nm.

Przebieg oznaczenia – kaspazy -8, -9

Komórki wysiewano na sterylne, 96-dołkowe mikropłytki w liczbie 2×10^6 komórek/ml. Płytki inkubowano 24-godziny, w celu utworzenia monowarstwy, po tym czasie dodawano badane ekstrakty roślinne. Inkubacja komórek wraz z ekstraktami trwała 24 godziny. Po etapie inkubacji komórki naświetlano promieniowaniem UVA (dawka 8 J/cm^2), ponownie poddając 6-godzinnej inkubacji. Po ukończonej inkubacji próby poddawano 10-minutowej homogenizacji na lodzie, odwirowywano w 4°C , 10000 obr./min, 1 minuta. Pobierano po 50 μ l supernatantu i наносzono na czarną, jałową płytkę 96-dołkową. Do każdego dołka dodawano mieszaninę reakcyjną (bufor reakcyjny, DTT, substrat odpowiedni dla badanej

kaspazy -8/-9), inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C, chroniąc przed dostępem światła. Dokonywano odczytu absorpcji przy długości fali $\lambda = 405$ nm.

Zasada metody – kaspaza-3

Oznaczenia aktywności kaspazy-3 wykonywano w lizatach komórkowych. Do lizatu dodawano specyficzny substrat DEVD-pNA. Obecna kaspaza-3 prowadzi do proteolitycznego cięcia substratu, w wyniku czego uwolniony zostaje chromofor pNA. Produkt hydrolizy oznacza się przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

Przebieg oznaczenia – kaspaza-3

Komórki wysiewano na sterylne, 96-dołkowe mikropłytki w liczbie 2×10^6 komórek/ml. Płytki inkubowano 24-godziny, w celu utworzenia monowarstwy. Po zakończonej inkubacji dodawano badane ekstrakty roślinne. Inkubacja komórek wraz z ekstraktami trwała 24 godziny. Po etapie inkubacji komórki naświetlano promieniowaniem UVA (dawka 8 J/cm^2), ponownie poddając 6-godzinnej inkubacji. Po ukończonej inkubacji komórki poddawano 10-minutowej homogenizacji na lodzie, odwirowywano w 4°C, 10000 obr./min, 1 minuta. Do 50 μl supernatantu dodawano 50 μl buforu reakcyjnego (zawierającego 10 mM DTT) i наносono na czarną, jałową płytkę 96-dołkową. Do każdego dołka dodawano po 5 μl 4 mM DEVD-pNA, inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C, chroniąc przed dostępem światła. Dokonywano odczytu absorpcji przy długości fali $\lambda = 405$ nm.

8.6.3. Oznaczanie aktywności β -galaktozydazy (SA- β -gal)

Zasada metody: Starzenie komórkowe charakteryzuje się zdefiniowanym fenotypem, komórki zwiększają swój rozmiar, przyjmują charakterystyczną płaską morfologię, gromadzone są ziarnistości lipofuscyny, dochodzi do zmian w ekspresji genów oraz wzrostu aktywności β -galaktozydazy (SA- β -gal). Proces ten odzwierciedla zmiany zachodzące podczas starzenia się organizmów, jednak liczne badania wskazują, że podobne zmiany są indukowane w odpowiedzi na wewnętrzne i zewnętrzne sygnały stresowe, w tym promieniowanie UV. Do określenia fenotypu starzenia się komórek, posłużył komercyjny test Cellular Senescence Assay KIT (KAA002), firmy Chemicon (USA), oparty na aktywności SA- β -gal, która obecna jest tylko w komórkach starzejących się, a brak jej w komórkach nieaktywnych lub proliferujących. W teście SA- β -gal katalizuje hydrolizę substratu X-gal, co powoduje nagromadzenie charakterystycznego niebieskiego koloru w starzejących się komórkach.

Przebieg oznaczenia: Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe w ilości 1×10^4 komórek/ml, inkubowano 24 godz. w inkubatorze (37°C , 5% CO_2) w celu wytworzenia monowarstwy. Dodawano badane ekstrakty roślinne, w określonych stężeniach i pozostawiano na kolejną 24-godziną inkubację (37°C , 5% CO_2). W kolejnym etapie poddano komórki napromieniowaniu UVA w dawce 8 J/cm^2 , inkubowano w inkubatorze (37°C , 5% CO_2), przez 24 godziny. Zbierano pożywkę wzrostową z nad komórek, przemywano dwukrotnie 1XPBS. Dodawano do wszystkich studzienek 1 ml roztworu utrwalającego 1X, inkubowano w temp. pokojowej przez 15 min. Usuwno roztwór utrwalający, przemywano komórki dwukrotnie 1XPBS. Nanoszono po 2 ml świeżo przygotowanego roztworu detekcyjnego 1X SA- β -gal. Komórki inkubowano przez całą noc, w 37°C , bez CO_2 , chroniąc przed światłem. Następnie usuwno roztwór detekcyjny SA- β -gal, przemywano dwukrotnie 1XPBS. Zliczano wybarwione komórki pod mikroskopem świetlnym kontrastowo-fazowym o odwróconej optyce model Primo Vert firmy Carl Zeiss z kamerą AxioCam 105 color.

8.7. Oznaczanie stężenia MMP-1, MMP-3 i MMP-9 (test immunoenzymatyczny ELISA)

Zasada metody: Metaloproteinazy to główna grupa endopeptydaz, enzymów odpowiadających za regulację składu ECM. Narażenie na promieniowanie UV zwiększa produkcję MMPs w ludzkiej skórze, implikując światło słoneczne jako główny czynnik fotostarzenia. Oznaczenie poziomu MMPs produkowanych przez naświetlane fibroblasty przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych immunoenzymatycznych testów podwójnego wiązania (sandwich ELISA) firmy FineTest (Wuhan Fine Biotech, Wuhan, Hubei, China). Mikro płytką jest wstępnie opłaszczona przeciwciałami wychwytyjącymi określoną metaloproteinazę, natomiast biotynylowane przeciwciała stanowią przeciwciała wykrywające. Następnie nanosi się kompleks streptawidyna-peroksydaza chrzanowa (ang. Horseradish Peroxidase, HRP), a do wizualizacji reakcji enzymatycznej stosuje się substrat TMB. Po zatrzymaniu reakcji kwasowym roztworem odczytuje się absorbancję przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do zawartości MMP w próbie.

Przebieg doświadczenia – MMP-1/MMP-3: Wykreślono krzywe wzorcowe, dodając do poszczególnych studzienek 96-dołkowej mikro płytki wzorcowy roztwór w stężeniach końcowych 0; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 ng/ml.

Do doświadczeń wykorzystywano wcześniej przygotowane supernatanty komórkowe. Supernatanty przed wykonaniem testu wirowano przez 20 minut, 1000 x g, w temperaturze 2°C . Do odpowiednich dołków 96-dołkowej mikro płytki nanoszono po 100 μl prób badanych,

inkubowano 90 minut, w temp. 37°C. W dalszym etapie dodawano przeciwciało znakowane biotyną w objętości 100 µl/dołek, poddawano inkubacji przez 60 minut, w temp. 37°C. Po zakończonym okresie inkubacji наносono po 100 µl/dołek koniugatu HRP-streptawidyna. Inkubowano 30 minut, po czym dodawano po 90 µl na każdy dołek substratu TMB. Płytkę przechowywano w ciemności, w temp. 37°C, po odpowiednim czasie zatrzymano przebieg reakcji za pośrednictwem roztworu zatrzymującego. Natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

Przebieg doświadczenia –MMP-9: Do studzienek 96-dołkowej mikropłytki dodawano roztwór wzorcowy w stężeniach końcowych 0; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5;10; 20 ng/ml. Supernatanty komórkowe wirowano przez 20 minut, 1000 x g, w temperaturze 2°C. Do wyznaczonych dołków 96-dołkowej mikropłytki наносono po 100 µl prób badanych, inkubowano 16 godzin, w temp. 4°C. Po zakończonym etapie inkubacji dodawano po 100 µl przeciwciała znakowanego biotyną. Inkubowano 60 minut, w temp. 37°C. Następnie dodawano po 100 µl koniugatu HRP-streptawidyna, na każdą studzienkę mikropłytki, inkubowano 30 minut. W końcowym etapie наносono po 90 µl substratu TMB, inkubowano przez właściwy czas, w ciemności, w temp. 37°C. Reakcja została zatrzymana poprzez dodawanie roztworu zatrzymującego. Dokonywano pomiaru intensywności absorbancji przy długości fali $\lambda=450$ nm, natychmiast po zatrzymaniu przebiegu reakcji.

8.8. Oznaczanie poziomu ekspresji wybranych białek sygnałowych (czynników transkrypcyjnych)

8.8.1. Pomiar stężenia supresora nowotworu, białka p53

Zasada metody: W odpowiedzi na różne czynniki stresowe, m.in. promieniowanie UV, białko p53 prowadzi do aktywacji transkrypcji genów regulujących cykl komórkowy, naprawę DNA lub w ostateczności zaangażowanych w proces apoptozy. W celu oznaczenia poziomu ekspresji białka p53 wykonano test immunoenzymatyczny firmy FineTest (Wuhan Fine Biotech, Wuhan, Hubei, China). Płytkę opłaszczoną przeciwciałami specyficznymi dla badanego białka, inkubuje się z antygenem. Do wytworzonego kompleksu przeciwciało-antygen dodaje się przeciwciała znakowane biotyną, a następnie kompleks streptawidyna-HRP. W celu wizualizacji reakcji enzymatycznej dodaje się substrat TMB. HRP katalizuje TMB z wytworzeniem niebieskiego produktu, który zmienia kolor na żółty po zatrzymaniu reakcji kwasowym roztworem. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do ilości p53 w próbie.

Przebieg doświadczenia: Wykreślono krzywe wzorcowe, dodając do poszczególnych studzienek 96-dołkowej mikropłytki wzorcowy roztwór standardowy w stężeniach końcowych 0; 78,125; 156,25; 312,5; 625; 1250; 2500; 5000 pg/ml.

Do doświadczeń wykorzystywano wcześniej przygotowane lizaty komórkowe. Do odpowiednich dołków 96-dołkowej mikropłytki nanoszono po 100 μ l prób badanych, inkubowano 90 minut, w temp. 37°C. W dalszym etapie dodawano przeciwciało znakowane biotyną w objętości 100 μ l/dołek, poddawano inkubacji przez 60 minut, w temp. 37°C. Po zakończonym okresie inkubacji nanoszono po 100 μ l/dołek koniugatu HRP-streptawidyna. Inkubowano 30 minut, po czym dodawano po 90 μ l na każdy dołek substratu TMB. Płytkę przechowywano w ciemności, w temp. 37°C, po odpowiednim czasie zatrzymano przebieg reakcji za pośrednictwem roztworu zatrzymującego. Natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

8.8.2. Pomiar stężenia czynnika transkrypcyjnego NF κ B

Zasada metody: Czynniki transkrypcyjne κ B, (nuclear factor- κ B) to kompleks białkowy odpowiedzi na bodźce, w tym promieniowanie UV, wolne rodniki, czy też cytokiny. Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego testu firmy Qayee-bio (Qayee-bio For Life Science, Szanghaj, China). Jednoetapowy test immunoenzymatyczny z wykorzystaniem dwóch rodzajów przeciwciał detekcyjnych: pierwszorzędowego, skierowanego przeciw NF κ B oraz drugorzędowego, skniugowane z kompleksem streptawidyna-HRP. Po dodaniu roztworów chromogenu A i B, enzym katalizuje reakcję tworząc barwny produkt, którego absorbancja odczytywana jest spektrofotometrycznie.

Przebieg doświadczenia: Wykreślono krzywą wzorcową, dodając do wyznaczonych dołków 96-dołkowej mikropłytki wzorcowy roztwór standardowy w stężeniach końcowych 0; 18,7; 37,5; 75; 150; 300 ng/ml.

W celu wykonania oznaczenia używano wcześniej przygotowanych lizatów komórkowych. Do studzienek 96-dołkowej mikropłytki nanoszono po 10 μ l próby oraz 40 μ l specjalnego roztworu do rozcieńczania prób badanych. Kolejnym etapem było nanoszenie po 50 μ l roztworu peroksydazy chrzanowej (HRP) i inkubacja 60 minut, w temp. 37°C. Po zakończonym okresie inkubacji nanoszono po 50 μ l/dołek chromogenu A oraz taką samą ilość chromogenu B. Inkubowano 10 minut, bez dostępu światła. Po tym czasie zatrzymano

przebieg reakcji za pośrednictwem roztworu zatrzymującego. Natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

8.8.3. Pomiar stężenia białka KLOTHO

Białko Klotho (KL) jest białkiem transbłonowym o plejotropowym działaniu, kodowanym przez gen supresorowy starzenia. Wszelkie mutacje w genie kodującym KL skutkują przedwczesnym lub przyspieszonym starzeniem się komórek. Aktywność biologiczna przypisywana jest głównie formie wydzielniczej, działającej jako czynnik humoralny. Do określenia poziomu białka KL w fibroblastach Hs68 wykorzystano komercyjny test PicoKine (EK1688), (Boster Biological Technology, Valley Ave, Pleasanton, USA). W zestawie przeznaczonym do pomiaru poziomu ludzkiego białka Klotho znajduje się płytka wstępnie opłaszczona przeciwciałami I-rzędowymi, specyficznymi dla KL. Przeciwciałem wykrywającym jest biotynylowane przeciwciało poliklonalne, połączone z kompleksem awidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa (ABC-HRP). Substratem w tej reakcji jest TMB. Absorbancja utworzonego barwnego produktu jest liniowo proporcjonalna do stężenia białka Klotho.

Przebieg doświadczenia: Została wykreślona krzywa wzorcowa, poprzez zastosowanie szeregu stężeń roztworu wzorcowego w stężeniach końcowych 0; 156,25; 312,5; 625; 1250; 2500; 5000; 10000 pg/ml.

Lizaty komórkowe zostały wykorzystane jako materiał badawczy. W wyznaczonych studzienkach 96-dołkowej mikropłytki nanoszono po 100 μ l prób badanych, inkubowano 90 minut, w temp. 37°C. W następnym kroku dodawano przeciwciało anty-KL, znakowane biotyną w objętości 100 μ l/dołek, poddawano inkubacji przez 60 minut, w temp. 37°C. Po okresie inkubacji nanoszono po 100 μ l/dołek koniugatu HRP-streptawidyna. Inkubowano 30 minut, po czym dodawano po 90 μ l na każdy dołek substratu TMB. Płytkę przechowywano w ciemności, w temp. 37°C, po odpowiednim czasie zatrzymano przebieg reakcji za pośrednictwem roztworu zatrzymującego. Natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

8.8.4. Pomiar stężenia czynnika transkrypcyjnego AP-1

Rodzina czynników transkrypcyjnych AP-1 (AP-1, ang. activating protein-1) odpowiada za swoistą regulację transkrypcji genów, zawierających w regionach promotorowych sekwencje CRE lub TRE (TGA(C/G)TCA). W celu określenia poziomu ekspresji białka AP-1

wykorzystywano komercyjnie dostępny test immunoenzymatyczny Human Transcription Factor/Activator Protein 1 (AP-1) ELISA Kit (Glory Science Co., Ltd, USA). Mikropłytką opłaszczoną jest przeciwciałami skierowanymi przeciwko AP-1, natomiast przeciwciała II-rzędowe skoniugowane z HRP. Po dodaniu roztworów chromogenu A i B, enzym katalizuje reakcję, tworząc barwny produkt, którego absorbancja odczytywana jest spektrofotometrycznie. Intensywność zabarwienia produktu jest proporcjonalna do stężenia białka AP-1.

Przebieg doświadczenia: Początkowym etapem było wykreślenie krzywej wzorcowej, poprzez naniesienie do określonych dołków 96-dołkowej mikropłytki wzorcowego roztworu w stężeniach końcowych 0; 20; 40; 80; 160; 320 pg/ml.

Do studzienek 96-dołkowej mikropłytki наносono po 10 µl przygotowanych wcześniej lizatów komórkowych oraz po 40 µl specjalnego roztworu do rozcieńczania prób badanych. Następnie dodawano po 100 µl roztworu HRP i inkubowano 60 minut, w temp. 37°C. Po zakończonym okresie inkubacji наносono po 50 µl chromogenu A oraz po 50 µl chromogenu B. Inkubowano w ciemności przez kolejne 15 minut. Natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ nm. Na podstawie krzywej wzorcowej odczytywano aktywność białka AP-1 w próbach badanych.

8.9. Metody oceny właściwości przeciwwzapalnych ekstraktów roślinnych

8.9.1. Izolacja PBMCs z kożuszków leukocyтарно-пłytkowych

Kożuszek nawarstwiano na Histopaque-1077 w stosunku objętościowym 1:1, następnie wirowano przy prędkości 540 x g przez 30 min, w temperaturze 25°C (Böyum, 1968). Zebrano warstwę komórek jednojądrzastych, przemywano stosując 10 mM PBS (10 mM bufor fosforanowy z 0,9% NaCl, pH 7,4). PBMCs zawieszono w medium RPMI 1640 bez dodatku glutaminy. Po izolacji komórki barwiono błękitem trypanu (1:1) i oznaczano żywotność komórek przy użyciu automatycznego licznika komórek model TC20™ (Bio-Rad, Hercules, USA). Żywotność izolowanych komórek mieściła się w zakresie 99±5%.

Żywotność PBMCs oznaczano także metodą opartą na spektrofotometrycznym oznaczaniu liczby komórek aktywnych metabolicznie, przy użyciu barwnika resazuryny. Resazuryna jest słabo fluorescencyjnym niebieskim barwnikiem wskaźnikowym, który pod wpływem komórkowych dehydrogenaz ulega redukcji do wysoce fluorescencyjnej różowej rezorufiny. Tempo redukcji, monitorowane zmianą zabarwienia, odzwierciedla liczbę żywych

komórek. W pracy wykorzystano zestaw komercyjny (In Vitro Toxicology Assay Kit Resazurin based, Catalog No. R-689) - zgodnie z procedurą określoną przez producenta (Sigma-Aldrich).

Przebieg oznaczenia:

Komórki jednojązaste krwi obwodowej wysiewano na sterylne, przezroczyste 96-dółkowe mikropłytki w liczbie 100000 komórek na dółek (1×10^5), wraz z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych. PBMCs poddawano preinkubacji przez 60 min w inkubatorze CO₂ (37°C, 5% stężenie CO₂, 90% wilgotność). Naświetlano komórki dawką promieniowania równą 8 J/cm², równolegle przygotowywano analogiczny zestaw komórek, które nie zostały poddane naświetlaniu UV. Komórki inkubowano przez 20 godzin w inkubatorze CO₂ (37°C, 5% stężenie CO₂, 95% wilgotność). Do zawiesiny PBMCs dodawano roztwór resazuryny w proporcji 10% w stosunku do objętości pożywki hodowlanej i inkubowano w standardowych warunkach. Po 4-godzinnej inkubacji wykonano pomiar spektrofotometryczny w czytniku mikropłytek (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Niemcy: czytnik mikropłytek UV-Vis SPECTROstar Nano). Monitorowano spadek absorbancji przy 600 nm (absorbancję mierzono przy referencyjnej długości fali 690 nm, odejmowano od pomiaru przy 600 nm).

8.9.2. Inkubacja z ekstraktami i przygotowanie próbek do immunodetekcji cytokin (IL-2 i TNF α)

Komórki zawieszono w RPMI 1640 wzbogaconym 0,1% antybiotykiem (penicillin-streptomycin, P4333, Sigma-Aldrich) oraz 10% FBS, uzyskując zawiesinę PBMCs o gęstości $1,5 \times 10^6$ komórek/ml. W probówkach tyu Eppendorf rozporcjonowano po 5 μ l badanych ekstraktów roślinnych oraz związki referencyjne. Następnie dodano po 495 μ l przygotowanej zawiesiny komórkowej, łagodnie wymieszano. Nanoszono po 196 μ l zawiesiny do odpowiednich studzienek na płycie mikrotitracyjnej (2 powtórzenia z każdej próbki). Przeprowadzono inkubację przez 60 minut w inkubatorze (37°C, 5% stężenie CO₂, 95% wilgotność). Po tym czasie odpowiednie próby naświetlano lub też dodawano po 4 μ l roztworu konkanawaliny A, celem uzyskania stężenia końcowego 10 μ l/ml (Con A; Sigma-Aldrich C0412). Jednocześnie przygotowano próby kontrolne (nienaświetlane oraz nietraktowane Con A). Płytki inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze (37°C, 5% stężenie CO₂, 95% wilgotność). Po zakończonej inkubacji płytki odwirowano (2600 obr./min,

15 min, wirówka MPW 260R). Zebrano supernatant, który wykorzystywano w dalszych oznaczeniach.

8.9.3. Oznaczanie stężenia IL-2

Zasada metody: Interleukina-2 (IL-2) to cytokina prozapalna odgrywająca kluczowe znaczenie w promowaniu proliferacji i dojrzewania komórek T. IL-2 stymuluje wzrost i różnicowanie komórek B, NK, komórek LAK, monocytów oraz oligodendocytów. Rekombinowana ludzka IL-2 to białko o masie 15,5 kDa zawierające 134 reszty aminokwasowe, w tym jedno wewnątrzłańcuchowe wiązanie disiarczkowe. Do oznaczenia poziomu IL-2 wydzielanej przez pobudzone PBMCs, pod wpływem promieniowania UVA, wykorzystano komercyjny, immunoenzymatyczny test Human IL-2 GENLISA™ ELISA (KB1064) firmy Krishgen BioSystems (USA).

Przebieg oznaczenia: w celu wykreślenia krzywej wzorcowej, nanoszono do właściwych studzienek 96-dółkowej mikropłytki po 50 µl przeciwciała wykrywającego, a następnie roztwór wzorcowy IL-2 w stężeniach końcowych: 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 pg/ml.

W celu oznaczenia IL-2 dodawano po 50 µl przeciwciała wykrywającego oraz po 100 µl supernatantów, poddano inkubacji na czas 2 godzin, w temp. 37°C. W kolejnym etapie dodawano po 100 µl roztworu streptawidyny-HRP, inkubowano 30 minut. Po zakończonej inkubacji do każdego z dołków dodawano substratu TMB, a po odpowiednim czasie zatrzymano reakcję za pomocą roztworu zatrzymującego reakcję. W celu określenia stężenia cytokiny dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

8.9.4. Oznaczanie stężenia TNF α

Zasada metody: Cytokina TNF α charakteryzuje się plejotropowym działaniem, bierze udział w prawie wszystkich etapach odpowiedzi zapalnej, m.in. inicjacji syntezy cytokin, zwiększaniu ekspresji cząstek adhezyjnych, indukcji produkcji mediatorów zapalenia i innych prozapalnych cytokin. Do oznaczenia stężenia TNF α wydzielanego przez pobudzone PBMCs (pod wpływem promieniowania UVA lub konkanawaliny A) wykorzystano komercyjny test immunoenzymatyczny Human TNF α GENLISA™ ELISA (KB1145) firmy Krishgen BioSystems (USA).

Przebieg oznaczenia: W pierwszym etapie wykonano krzywą wzorcową, dodawano do wyznaczonych dołków płytki 96-dołkowej standardu TNF α uzyskując dane stężenia końcowe: 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 pg/ml.

Na 96-dołkową mikropłytkę наносono po 100 μ l supernatantu, inkubowano 2 godz., w 37°C. Po zakończonej inkubacji dodawano do każdej studzienki roztworu przeciwciała wykrywającego w objętości 100 μ l. Inkubowano 1 godz., 37°C. Następnie dodawano 50 μ l odczynnika komercyjnie oznaczonego jako „B” oraz 100 μ l koniugatu awidyna-HRP, poddawano inkubacji przez okres 1 godz., 37 °C. W końcowych etapach наносono po 100 μ l substratu TMB, inkubowano w ciemności przez określony czas, po czym zatrzymano przebieg reakcji (doszło do zmiany zabarwienia z niebieskiego na żółty w studzienkach z wynikiem pozytywnym). Odczytywano absorbancję przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

8.10. Wyznaczenie wskaźnika ochrony przeciwsłonecznej (SPF) metodą spektrofotometrii w ultrafiolecie

Zasada metody: metoda opracowana przez Mansur i wsp. (Mansur i wsp.,1986) z zastosowaniem spektrofotometrii UV. Określenie SPF w ekstraktach roślinnych oparte jest na rejestracji absorbancji w zakresie 290-320 nm za pomocą spektrofotometru UV-Vis, a następnie oszacowaniu za pomocą równania Mansura:

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda),$$

gdzie CF = współczynnik korygujący (=10), EE (λ) = efektywność wywoływania rumienia dla danej długości fali λ , I – natężenie światła słonecznego, Abs (λ) = absorbancja przy określonej długości fali λ . Wartości EE x I (λ) są stałymi wyznaczonymi przez Sayre i wsp. (Sayre i wsp., 1979) i są pokazane w tabeli 3.

Tabela 3. Standardowe wartości iloczynów $I(\lambda)$ i wielkości $EE(\lambda)$ dla światła słonecznego w zakresie 290–320 nm (Sayre i wsp., 1979).

$(\lambda \text{ nm})$	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Łącznie	1

Przebieg oznaczenia:

Ekstrakty roślinne rozpuszczono w etanolu, otrzymując roztwory o stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$. Oznaczono widma absorpcyjne uzyskanych roztworów w zakresie od 290 do 380 nm przy użyciu 1 cm kuwety kwarcowej grubości warstwy 1 cm, wobec etanolu jako ślepej próby. Pomiaru dokonywano, co 5 nm, przy użyciu spektrofotometru UV/VIS T60. Wartości SPF obliczono stosując równanie Mansur'a.

8.12. Analiza statystyczna

Dane uzyskane w doświadczeniach przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (ang. SD, Standard Deviation). Każde doświadczenie przeprowadzono w minimum trzech niezależnych powtórzeniach – liczbę „n” odpowiadającą dokładnej liczbie zamieszczono w opisach rycin i tabel. Wstępne opracowanie danych wykonano za pomocą programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Stany Zjednoczone): obliczenie średnich arytmetycznych oraz SD.

Analizę statystyczną wyników wykonano za pomocą programu Statistica v.13.1 (StatSoft Inc, Stany Zjednoczone). W pierwszej kolejności sprawdzono normalność rozkładu zmiennych, przy użyciu testu Shapiro-Wilk'a oraz Kołmogorowa-Smirnowa. Dla danych wykazujących

normalność rozkładu sprawdzano jednorodność wariancji, stosując test Levene'a. Następnie dokonano analizy danych metodą wariancji jednoczynnikowej ANOVA z post-hoc: test Tukey'a (gdy $p > 0,05$ w teście Levene'a) lub ANOVA rang Kruskal'a-Wallis'a z post-hoc: test Dunna (gdy $p \leq 0,05$ w teście Levene'a). Wartość $p \leq 0,05$ uznano jako poziom istotny statystycznie. Test t-Studenta wykorzystano w celu sprawdzenia różnic między otrzymanymi wynikami dla prób naświetlanych promieniowaniem UVA, a próbkami nienaświetlanymi. Wykresy umieszczone w pracy przygotowano przy użyciu programu GraphPad Prism 5.0 Software.

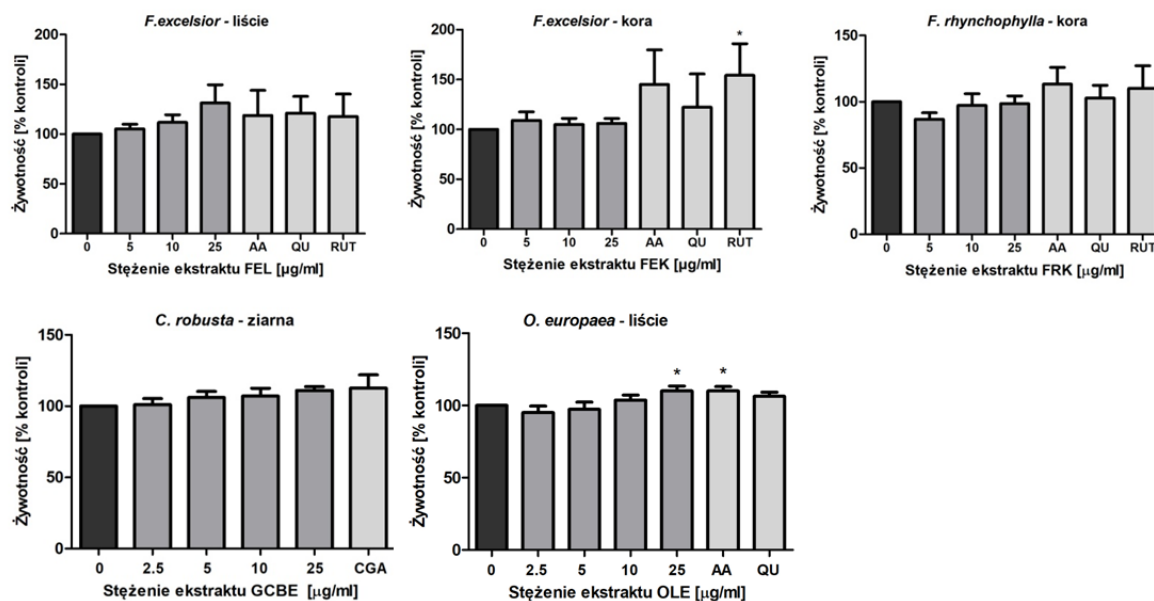
9. Wyniki

9.1. Analiza fitochemiczna

Wyniki analizy profilu fitochemicznego przedstawiono w rozdziale 13 – Suplement.

9.2. Cytotoksyczność ekstraktów roślinnych

Cytotoksyczność ekstraktów roślinnych określono na podstawie zdolności proliferacji komórek inkubowanych z badanymi związkami w zakresie stężeń 5-25 $\mu\text{g/ml}$. Jako związki referencyjne zastosowano antyoksydanty, takie jak kwas askorbinowy, kwercetynę oraz rutynę. Żywotność komórkową wyznaczono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem WST-8. Odsetek żywych komórek przeliczano w odniesieniu do komórek kontrolnych (fibroblasty inkubowane w DMEM z dodatkiem DMSO), niepoddanych działaniu promieniowania UVA. Stężenie końcowe DMSO wynosiło 0,125%, nie wykazano istotnego wpływu DMSO przy tym stężeniu w porównaniu z kontrolą (fibroblasty inkubowane z DMEM).



Ryc. 7. Ocena cytotoksyczności ekstraktów wobec fibroblastów (Hs68). Wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjmowano żywotność komórek kontrolnych (bez związków roślinnych); (n=6); średnia \pm SD; * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą (0).

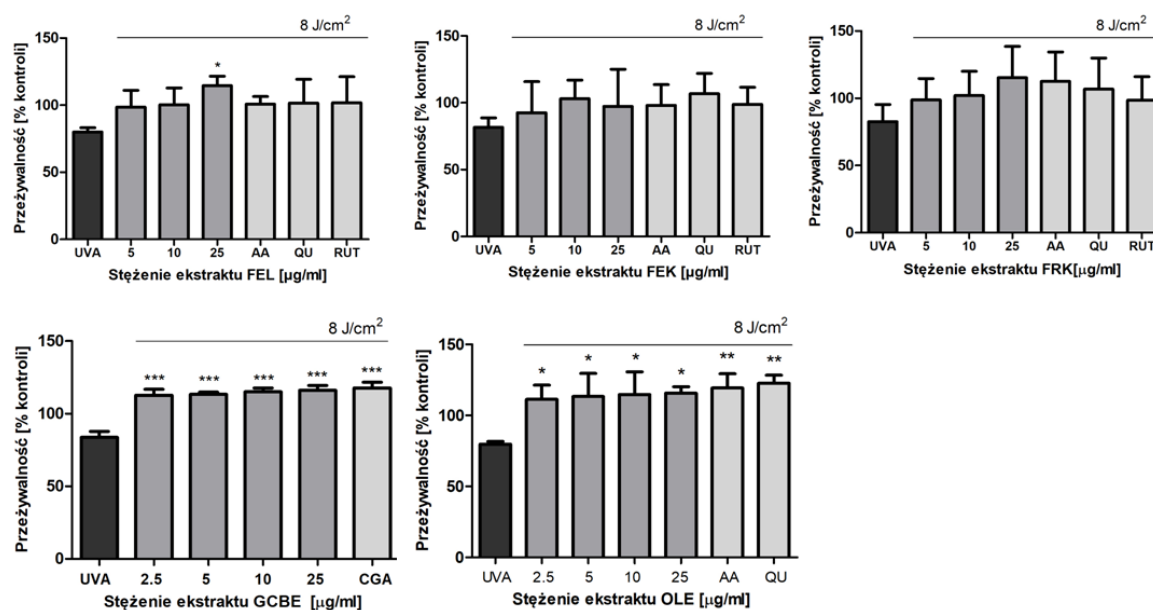
Wyniki przedstawiające przeżywalność ludzkich fibroblastów skóry linii Hs68 eksponowanych na 48-godzinne działanie badanych ekstraktów roślinnych (Ryc. 7) wskazują, że żaden z badanych ekstraktów, nawet w najwyższym zastosowanym stężeniu (25 $\mu\text{g/ml}$), nie wykazał istotnych właściwości cytotoksycznych w odniesieniu do komórek ($p > 0,05$). Cytotoksyczność we wszystkich przypadkach nie przekraczała granicznej wartości 15%, określonej na podstawie polskiej i europejskiej normy (ISO 10993-5:2009). Brak właściwości cytotoksycznych związków roślinnych pozwoliło na prowadzenie dalszych badań z wykorzystaniem badanych surowców.

9.3. Wpływ ekstraktów roślinnych na żywotność naświetlanych fibroblastów i na parametry stresu oksydacyjnego

9.3.1. Żywotność komórek Hs68

Żywotność fibroblastów skóry linii Hs68 określono metodą spektrofotometryczną z WST-8. Ocena wpływu badanych ekstraktów na żywotność komórek uwzględniała 24-godzinna preinkubację z ekstraktami (w zakresie stężeń 5-25 $\mu\text{g/ml}$), a następnie naświetlanie; po 48h wykonywano test CCK-8. Wykazano, że promieniowanie UVA w zastosowanej

doświadczalnej dawce (8 J/cm^2) powoduje zmniejszenie odsetka żywych komórek o ok. 20% ($\pm 5\%$) (Ryc. 8). Natomiast w obecności ekstraktów z liści *O. europaea* oraz ziaren *C. robusta*, podobnie jak i kontrolnych antyoksydantów, zanotowano istotny wzrost żywotności komórek do około 100% (niezależnie od stężenia ekstraktu roślinnego), co wskazuje na zdolność tych ekstraktów do ochrony komórek skóry przed promieniowaniem. Brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem żywych fibroblastów pre-inkubowanych z ekstraktami z kory i liści jesionów, a kontrolnymi po naświetleniu (z wyjątkiem ekstraktu z liści *F. excelsior* przy stężeniu $25 \mu\text{g/ml}$; $p < 0.5$), pomimo widocznej tendencji wzrostu przeżywalności komórek, może wynikać ze zbyt niskiej czułości metody. Ze względu na brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami absorbancji pomiędzy fibroblastami inkubowanymi w medium DMEM, a medium DMEM zawierającym 0,125% DMSO, ostatecznie za kontrolę w doświadczeniach przyjęto próby pozbawione ekstraktów roślinnych, czyli inkubowane tylko w medium DMEM.



Ryc. 8. Przeżywalność fibroblastów (Hs68) (po 48 godzinach) inkubowanych z ekstraktami roślinnymi i ekspozowanych na działanie promieniowania UVA (8 J/cm^2). Wyniki przedstawiono jako odsetek żywych fibroblastów po naświetleniu, za 100% przyjęto absorbancję odpowiedniej próbki kontrolnej (nienaświetlonej); ($n=6$); średnia \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w porównaniu z UVA.

9.3.2. Całkowity potencjał antyoksydacyjny

Zdolność antyoksydacyjna ekstraktów roślinnych z *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* i *C. robusta* oraz związków referencyjnych została określona za pomocą trzech metod, tj. metodą redukcji kationorodnika ABTS⁺ i rodnika DPPH oraz metodą FRAP. Uzyskane wyniki zostały przedstawione odpowiednio jako zdolność zmiatania kationorodnika ABTS⁺ i rodnika DPPH oraz jako zdolność redukcji jonów żelaza (średnie wartości FRAP w mmolach jonów Fe²⁺/g suchego ekstraktu) (Tabela 4).

Tabela 4. Całkowita zdolność antyoksydacyjna ekstraktów roślinnych

Ekstrakt/antyoksydant	ABTS [mM jednoelektronowych równoważników Troloksu - dla stężenia 5 µg/ml]	DPPH [% RSA]	FRAP [mmol/g]
<i>F. excelsior</i> – liście (FEL)	0,255 ± 0,027	8,413 ± 0,311	14,634 ± 2,666
<i>F. excelsior</i> – kora (FEK)	0,252 ± 0,024	10,141 ± 0,312	25,16 ± 4,901
<i>F. rhynchophylla</i> – kora (FRK)	0,450 ± 0,029	10,143 ± 0,310	27,392 ± 5,892
<i>O. europaea</i> – liście (OLE)	0,527 ± 0,041	16,034 ± 0,765	25,750 ± 4,084
<i>C. robusta</i> – nasiona (GCBE)	0,582 ± 0,058 ^A	25,661 ± 3,880 ^E	52,371 ± 6,322 ^I
Kwas askorbinowy (AA)	0,787 ± 0,054 ^B	24,812 ± 2,391 ^F	123,881 ± 9,711 ^J
Kwercetyna (QU)	4,754 ± 0,029 ^C	118,110 ± 4,581 ^G	219,930 ± 37,130 ^K
Rutyna (RUT)	1,063 ± 0,121 ^D	37,432 ± 1,683 ^H	51,971 ± 10,061 ^L

^A – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK

^B – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK

^C – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, OLE, GCBE

^D – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, OLE, GCBE

^E – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, OLE

^F – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, OLE

^G – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, GCBE, OLE

^H – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, OLE

^I – p < 0,05 w porównaniu z FEL

^J – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, GCBE, OLE

^K – p < 0,05 w porównaniu z FEL, FEK, FRK, GCBE, OLE

^L – p < 0,05 w porównaniu z FEL

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zdolność badanych ekstraktów do zmiatania kationorodnika ABTS⁺ jest niższa w porównaniu ze związkami referencyjnymi (kwercetyna i rutyna). Statystycznie istotną niższą zdolność zmiatania kationorodnika ABTS⁺ uzyskano też dla ekstraktów z *Fraxinus sp.* ($p < 0,01$) w odniesieniu do kwasu askorbinowego. Porównując badane ekstrakty roślinne, wyższą zdolność antyoksydacyjną wykazuje ekstrakt z *C. robusta* w odniesieniu do ekstraktu z liści i kory *F. excelsior* ($p < 0,05$).

Wyniki uzyskane metodą FRAP wskazują, iż ekstrakty (o stężeniu 10 µg/ml) z *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* w porównaniu z dwoma związkami referencyjnymi – kwasem askorbinowym oraz kwercetyną wykazują niższą zdolność redukcji jonów żelaza (Tab. 4). Natomiast wartości FRAP ekstraktów roślinnych oraz rutyny są porównywalne, z wyjątkiem ekstraktu z liści *F. excelsior*, co wskazuje na mniejsze właściwości antyoksydacyjne wskazanego ekstraktu. Statystycznie istotna różnica w wartościach FRAP występuje jedynie w wartościach uzyskanych dla ekstraktu z *C. robusta* oraz rutyny w porównaniu do ekstraktu z liści *F. excelsior* ($p < 0,05$).

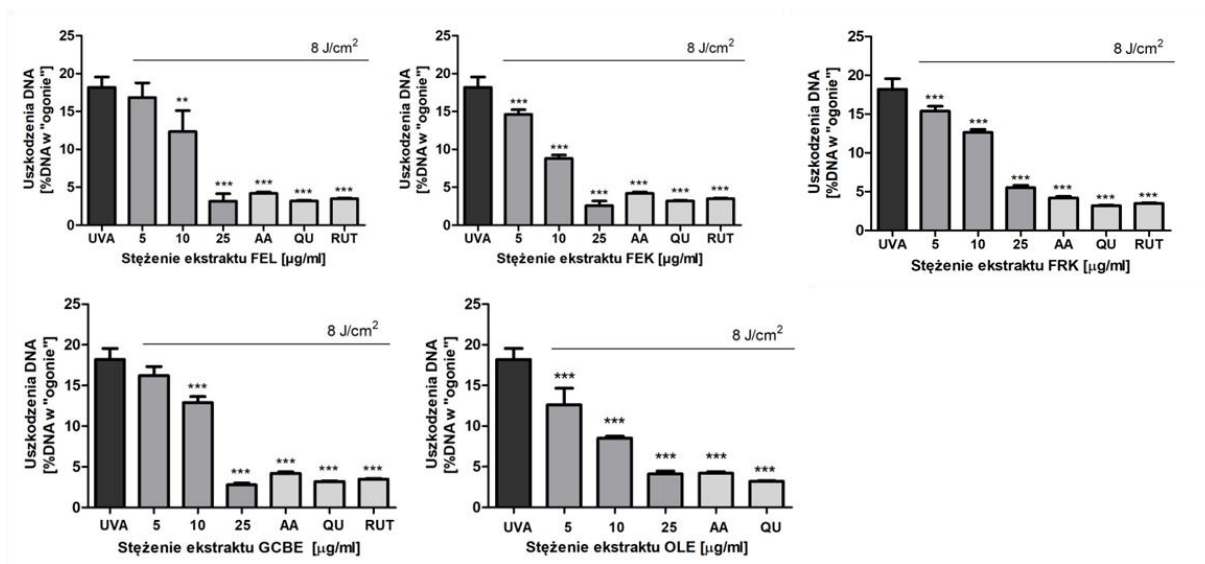
Tabela 4 przedstawia również wyniki interakcji badanych ekstraktów roślinnych z syntetycznym rodnikiem DPPH. Wyniki otrzymane dla poszczególnych stężeń ekstraktów przeliczone zostały na RSA [%] dla stężenia 5 µg/ml. Najwyższą zdolność zmiatania rodnika DPPH wyznaczono dla związku referencyjnego, tj. kwercetyny ($118,11 \pm 4,58$ % RSA). Natomiast porównując badane ekstrakty roślinne najwyższą zdolnością przeciwutleniającą cechuje się ekstrakt z *C. robusta* ($25,66 \pm 3,88$ % RSA, $p < 0,05$). Dodatkowo zaobserwowano następującą tendencję - nieco większą zdolność do zmiatania rodnika DPPH przez ekstrakt z *O. europaea*, aniżeli ekstrakty z kory *F. rhynchophylla* oraz z kory i liści *F. excelsior*. Zazwyczaj rodniki DPPH reagują szybko i całkowicie z obecnymi przeciwutleniaczami (w przypadku polarnych rozpuszczalników). W obecności słabych antyoksydantów (z małą ilością grup –OH, bądź spolimeryzowanych), reakcja zachodzi dużo wolniej. Stąd możliwe rozbieżności w otrzymanych wynikach. Niemniej jednak, wszystkie badane ekstrakty wykazują działanie przeciwutleniające.

Punktem odniesienia w interpretacji wyników uzyskanych za pomocą 3 różnych metod powinna być ich czułość. Wszystkie składniki ekstraktów oraz interakcje pomiędzy nimi wpływają na ich całkowity potencjał antyoksydacyjny. Różnice w otrzymanych wartościach zależne są w znacznym stopniu od pH środowiska zachodzącej reakcji (właściwości przeciwutleniające głównych związków, zależą od pH środowiska).

9.3.3. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową

Promieniowanie UVA, w przeciwieństwie do promieniowania UVB, jest w niewielkim stopniu absorbowane przez DNA, dlatego też tylko w niewielkim stopniu wywołuje uszkodzenia DNA w sposób bezpośredni. Natomiast powoduje wzmożoną produkcję ROS, co przyczynia się do modyfikacji oksydacyjnych zasad azotowych i innych uszkodzeń DNA (pęknięcia pojedynczych i podwójnych nici DNA czy miejsca apurynowe/pirymidynowe). Nienaprawione uszkodzenia DNA mogą prowadzić do mutacji i aberracji chromosomowych albo do śmierci komórkowej. Genotoksyczne działanie promieniowania UVA oceniono za pomocą alkalicznej wersji testu kometowego, który wykrywa wszystkie wymienione powyżej uszkodzenia DNA.

Całkowity poziom uszkodzeń DNA, został wyrażony jako zawartość DNA w „ogonie”, w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów roślinnych z: *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta*. Promieniowanie UVA wywołało znaczący wzrost całkowitego poziomu uszkodzeń DNA. Po naświetleniu obserwowano ponad 11-krotny wzrost poziomu uszkodzeń DNA, od wartości $1,61 \pm 0,317\%$ w fibroblastach kontrolnych (K(-)) do $19,82 \pm 1,668\%$ w komórkach naświetlonych (K(+)). Jednak pre-inkubacja fibroblastów Hs68 z ekstraktami roślinnymi spowodowała zależne od stężenia zmniejszenie odsetka DNA w „ogonie” (Ryc. 9). Wszystkie badane ekstrakty, przy najwyższym badanym stężeniu ($25 \mu\text{g/mL}$) w znacznym stopniu zmniejszają poziom uszkodzeń DNA (do wartości $\leq 5\%$, ($p < 0.001$)).

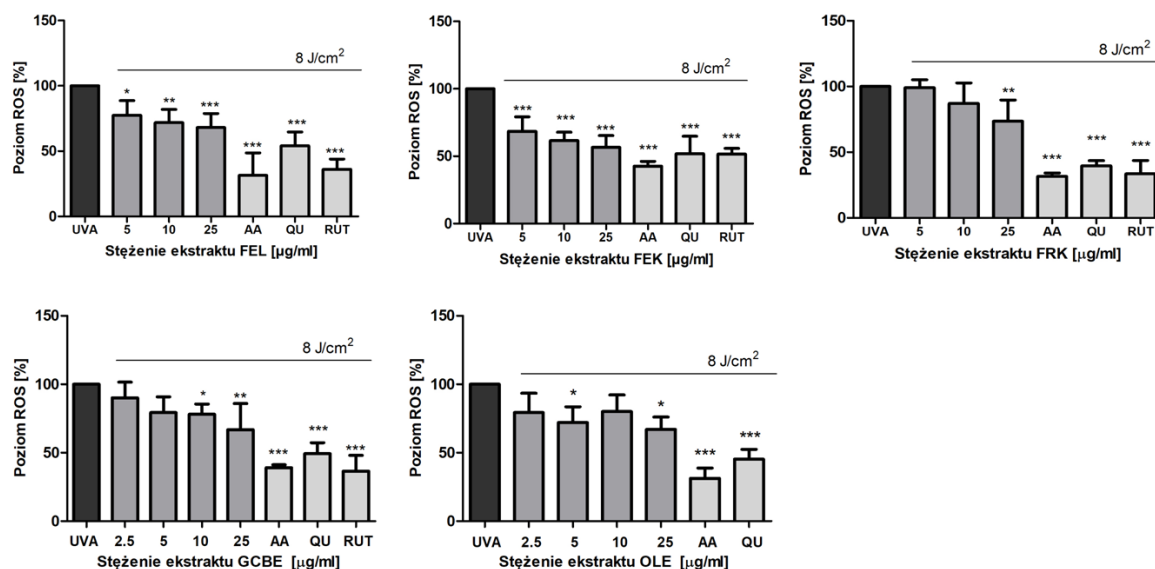


Ryc. 9. Poziom uszkodzeń DNA, wyrażony jako procentowa zawartość DNA w „ogonie” (po odjęciu uszkodzeń endogennych), w fibroblastach Hs68 poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów, zliczano po 100 komet dla każdej próbki; ($n=12$); średnia \pm SD; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ w porównaniu z UVA.

9.3.4. Poziom ROS (metoda z H_2DCFDA)

Geno- i cytotoksyczne działanie promieniowania UVA wynika przede wszystkim ze zdolności do generowania ROS, które reagując z białkami, lipidami i DNA prowadzą do powstawania modyfikacji oksydacyjnych w tych molekułach i w następstwie do uszkodzenia struktur komórkowych. ROS powstają na skutek pochłaniania promieniowania przez substancje endogenne, do których zaliczyć można melaniny, porfiryny, czy flawiny. Poziom wewnątrzkomórkowych ROS jest możliwy do oznaczania za pomocą sondy fluorescencyjnej $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Metoda posłużyła ocenie poziomu stresu oksydacyjnego w fibroblastach poddanych działaniu UVA, bez i w obecności ekstraktów. Fibroblasty inkubowano z ekstraktami z: *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta* w badanych stężeniach (5-25 $\mu\text{g/ml}$), a w kolejnym etapie naświetlano dawką promieniowania wynoszącą 8 J/cm^2 . Na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji DCF oceniono poziom ROS generowanych w fibroblastach, a wyniki przedstawiono jako % kontroli, przyjmując za 100% różnice w RFU (względne jednostki fluorescencji) pomiędzy kontrolą naświetlaną i nienaświetlaną. Badania wykazały, że naświetlanie promieniowaniem UVA generuje w przybliżeniu 4-krotny wzrost poziomu ROS w fibroblastach Hs68 ($\text{K}(-) = 0,505 \pm 0,057 \text{ RFU}$; $\text{K}(+) = 1,979 \pm 0,317 \text{ RFU}$). Ekstrakty roślinne posiadają zdolność zmiatania ROS, przy

czym najskuteczniejszym działaniem charakteryzuje się ekstrakt z kory *F. excelsior* o stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$, gdzie poziom ROS jest obniżany o 44% ($p < 0,001$) w porównaniu z kontrolą naświetloną (bez ekstraktów), zbliżone właściwości wykazuje ekstrakt z *C. robusta* ($p < 0,001$) (Ryc. 10).

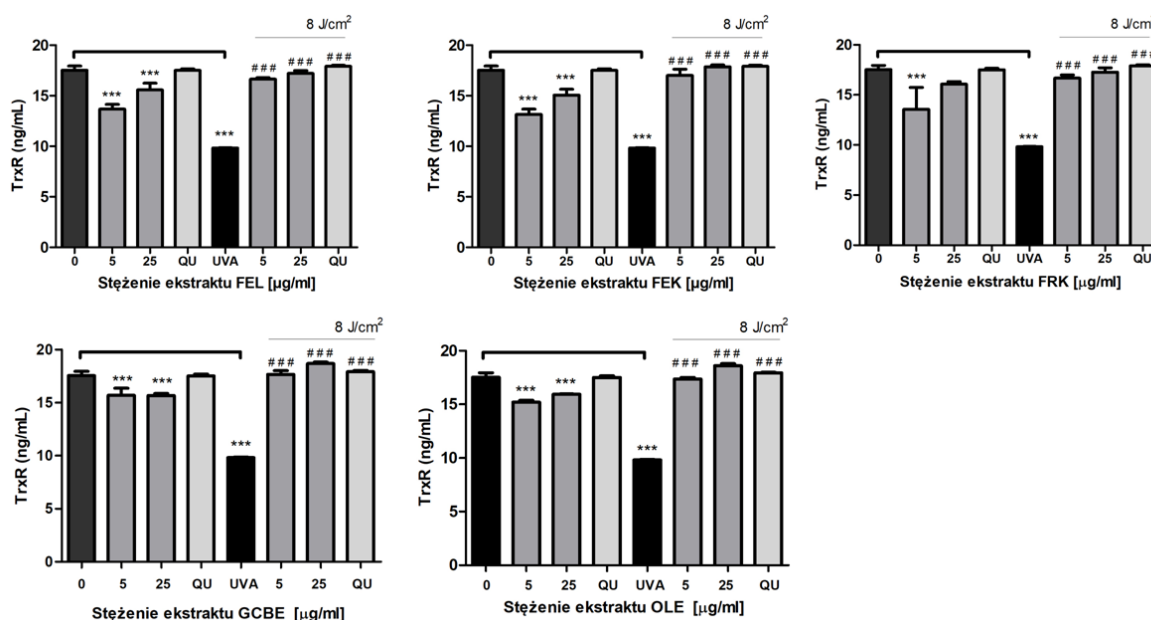


Ryc. 10. Poziom ROS określony za pomocą metody spektrofluorymetrycznej z sondą H_2DCFDA , w fibroblastach Hs68 poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów. Wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjmowano różnice w RFU (względne jednostki fluorescencji) pomiędzy próbką kontrolną naświetlaną i nienaświetlaną; ($n=6$); średnia \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w porównaniu z UVA.

9.3.5. Poziom ekspresji reduktazy tioredoksyny

Utrzymanie równowagi redoks w komórce jest możliwe poprzez funkcjonowanie systemu antyoksydacyjnego. Jednym z takich układów jest układ złożony z tioredoksyny (Trx), reduktazy tioredoksyny (TrxR) oraz peroksydazy tioredoksyny (TPx), zdolnych do redukcji utlenionych składników komórkowych, przy udziale NADPH (fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego). TrxR odpowiada za redukcję utlenionej postaci Trx, reduktaza oddziałując z peroksydazą bierze udział w redukcji powstałych nadtlenuków. Układ ten chroni komórki przed procesem apoptozy, wywołanym przez ROS, które generowane są między innymi pod wpływem promieniowania UVA. Oznaczenie poziomu reduktazy tioredoksyny wykonano dla formy cytozolowej – TrxR1.

Uzyskane wyniki wskazują, iż poziom ekspresji TrxR w fibroblastach poddanych działaniu promieniowania UVA uległ znacznemu obniżeniu (o około 45% w porównaniu z kontrolą; $p < 0,001$) (Ryc. 11). Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że każdy z badanych ekstraktów roślinnych, jak również związek referencyjny (kwercetyna), spowodowały istotny statystycznie wzrost poziomu TrxR w naświetlanych fibroblastach ($###p < 0,001$). Wzrost poziomu ekspresji TrxR po traktowaniu komórek badanymi ekstraktami i poddanych działaniu promieniowania UVA wskazuje na fotoprotekcyjne działanie ekstraktów. Same ekstrakty roślinne zmniejszały w niewielkim stopniu poziom ekspresji TrxR ($p < 0,001$) w nienaświetlonych fibroblastach w przeciwieństwie do QU, gdzie nie odnotowano takiego efektu (Ryc. 11).



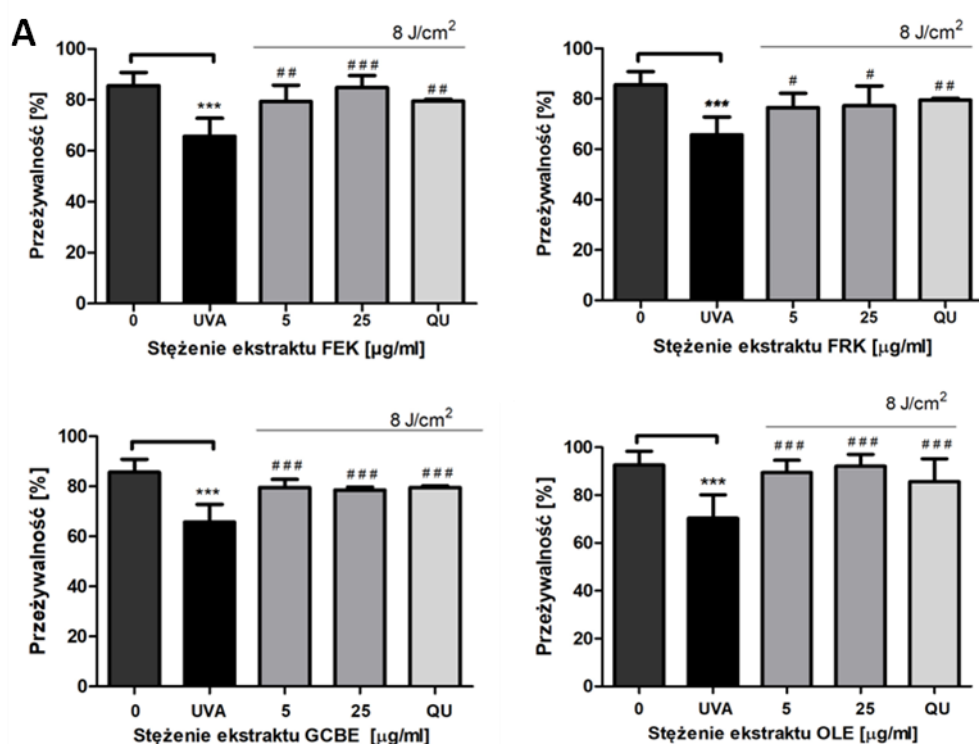
Ryc. 11. Poziom ekspresji TrxR-1 w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów; ($n=12$); średnia \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli nienaświetlanej (0); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli naświetlanej (UVA).

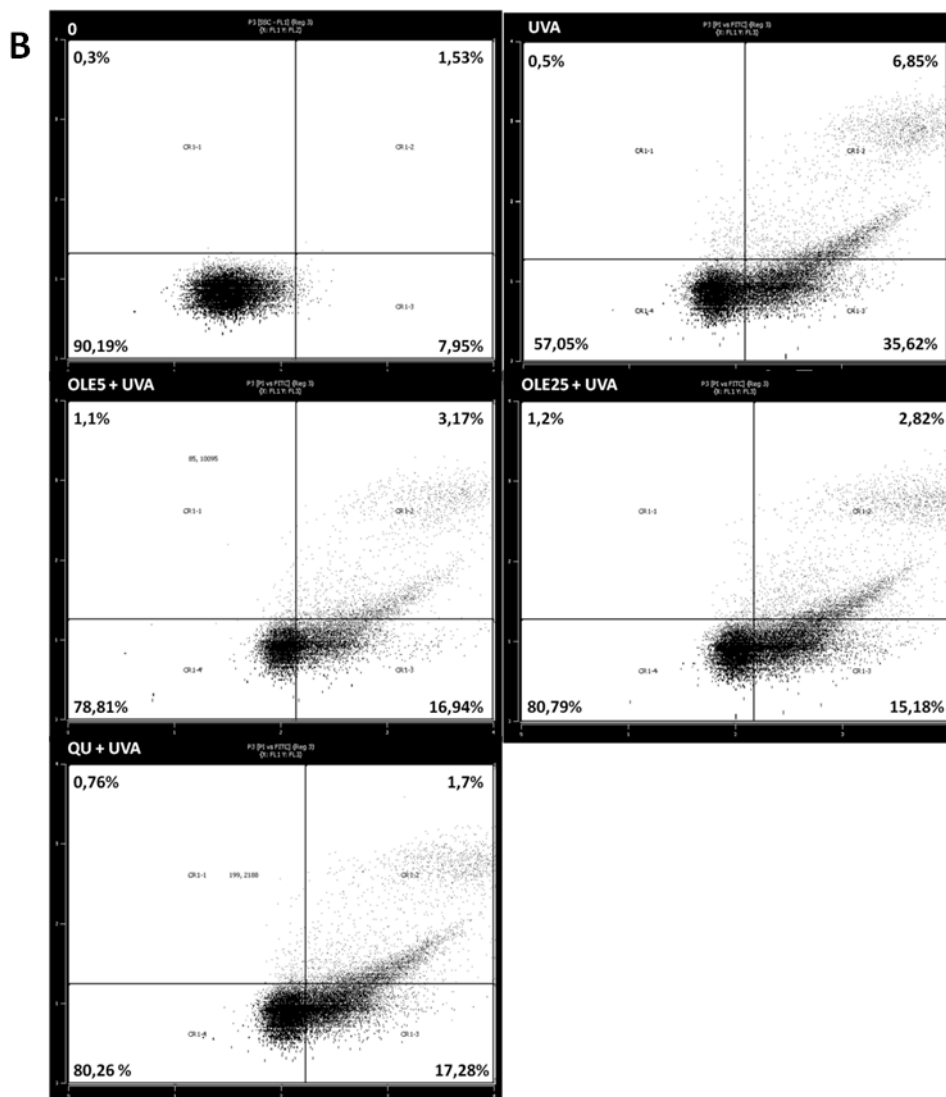
9.4. Wpływ ekstraktów roślinnych na drogi śmierci komórkowej indukowanej promieniowaniem UVA

9.4.1. Odsetek populacji żywych fibroblastów w hodowli po naświetleniu

Metodą cytometrii przepływowej określono odsetek populacji żywych fibroblastów po naświetleniu. Jednoczesne barwienie aneksyną V sprzężoną z FITC i PI pozwala na wykrycie

komórek żywych oraz komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Wyniki przedstawione na rycinie 12 wskazują, że promieniowanie UVA w zastosowanej doświadczalnej dawce (8 J/cm^2) powoduje zmniejszenie odsetka żywych komórek o około 20% względem fibroblastów kontrolnych ($***p < 0,001$). Preinkubacja fibroblastów z ekstraktami, w stężeniach zastosowanych w doświadczeniu ($5\text{-}25 \text{ }\mu\text{g/ml}$) przeciwdziała cytotoksyczności promieniowania UVA, utrzymując w tych populacjach poziom żywych komórek w hodowli, który charakteryzuje populację komórek kontrolnych. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami przedstawionymi na rycinie 7, gdzie żywotność fibroblastów oceniano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem testu CCK-8.



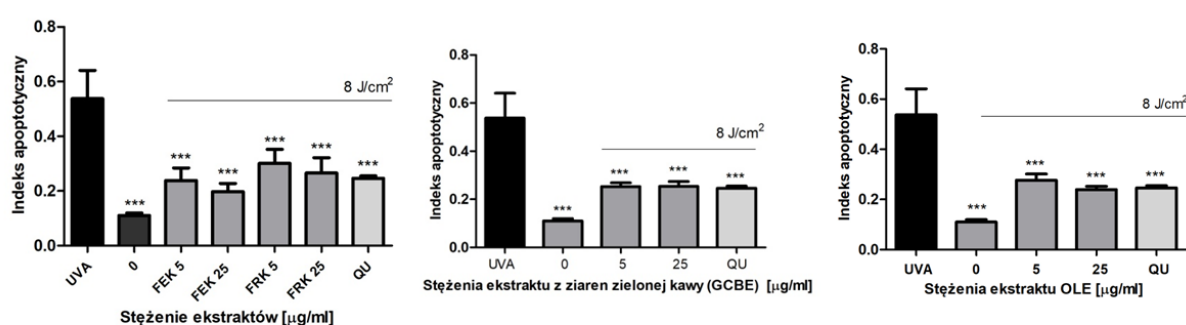


Ryc. 12. Odsetek populacji żywych fibroblastów Hs68 po działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów oznaczony metodą cytometrii przepływowej; ($n=6$), średnia \pm SD; *** $p<0,001$ w porównaniu z kontrolą nienaświetlaną (0); # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ w porównaniu do kontroli naświetlanej (UVA) (A) oraz przykładowe reprezentatywne wykresy dot plot (fibroblasty inkubowane z OLE); populacje komórek w kwadrantach IV, I i II/III reprezentują odpowiednio żywe, nekrotyczne i przechodzące apoptozę komórki Hs68 (B).

9.4.2. Właściwości anty-apoptyczne ekstraktów roślinnych

Apoptoza jest procesem zaprogramowanej śmierci komórki, który obejmuje szereg zmian morfologicznych (m.in. oddzielenie komórki od pozostałych, kurczenie się komórki i fragmentację jądrowego DNA) i zmian biochemicznych. Eksternalizacja fosfatydyloseryny to cecha charakterystyczna komórek apoptotycznych. Podwójne barwienie aneksyną V-FITC

i jodkiem propidyny umożliwia wykrycie komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Ocena stopnia wiązania aneksyny V-FITC z fosfatydyloseryną, wykonana została metodą cytometrii przepływowej. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, iż naświetlanie promieniowaniem UVA powoduje istotnie statystyczny wzrost (prawie 5-krotny) odsetka fibroblastów apoptotycznych, charakteryzujących się eksternalizacją PS (Ryc. 13). Preinkubacja z ekstraktami roślinnymi w znacznym stopniu zapobiegała apoptotycznej śmierci fibroblastów skóry (we wszystkich badanych przypadkach zanotowano spadek odsetka fibroblastów ulegających apoptozie o ponad 50% w porównaniu z komórkami naświetlanymi, nietraktowanymi ekstraktami, $p < 0,001$).

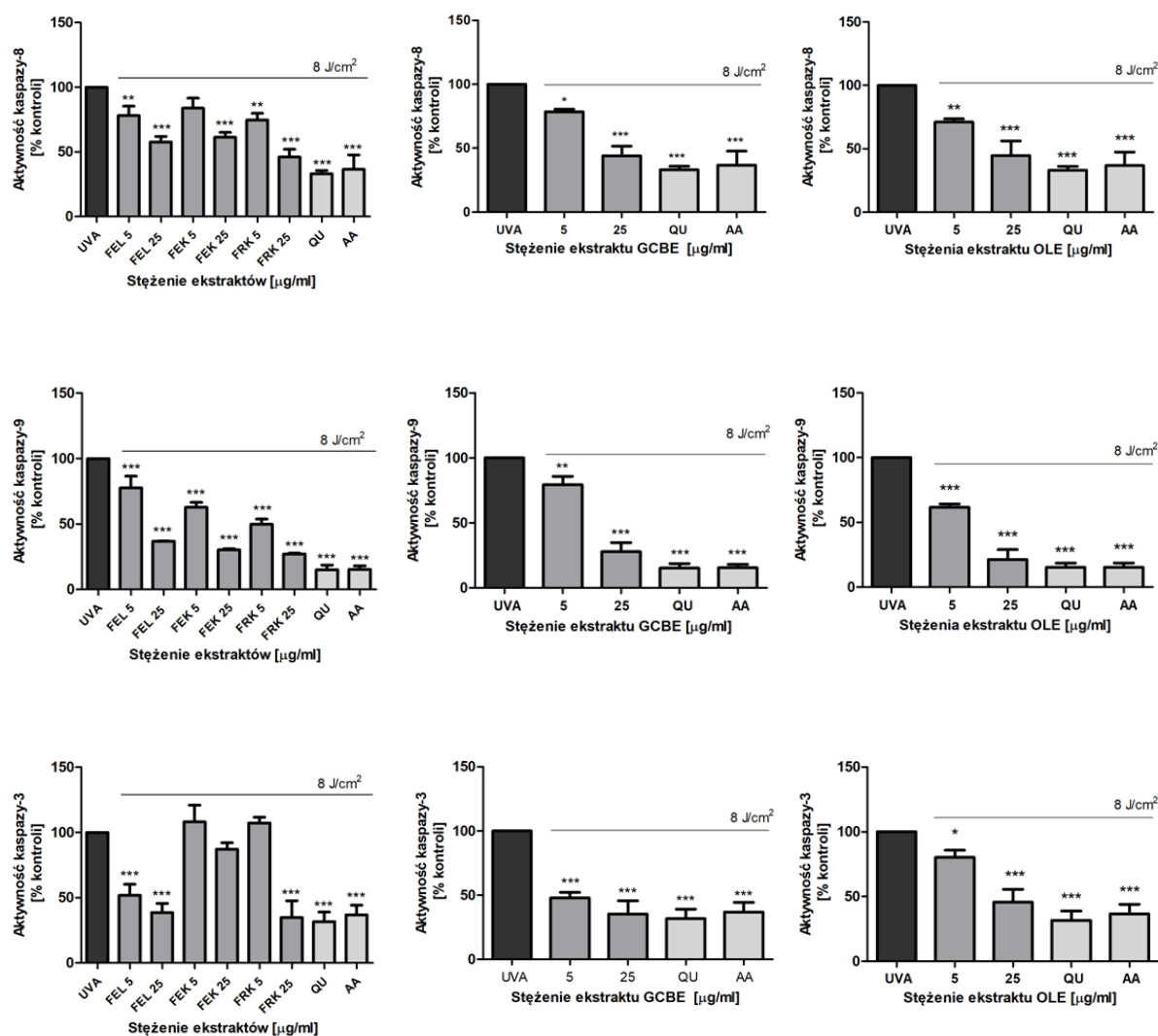


Ryc. 13. Wpływ ekstraktów roślinnych na indukowaną promieniowaniem UVA apoptozę komórek Hs68. Wyniki przedstawiono jako „indeks apoptotyczny”, wyrażony przez iloraz – liczba komórek apoptotycznych w stosunku do liczby żywych komórek; (n=6); średnia±SD; *** $p < 0,001$ w porównaniu z UVA.

9.4.3. Aktywacja kaspazy -8,-9 i -3

Celem określenia udziału kaspaz inicjatorowych (kaspaza 8 i 9) i kaspazy-3 (wykonawczej) w przebiegu apoptozy zachodzącej po 48 godzinach w naświetlanych fibroblastach skóry (kontrolnych i pre-inkubowanych z ekstraktami roślinnymi) zastosowano komercyjne testy z substratami chromogennymi (specyficznym dla każdej kaspazy peptydem skoniugowanym z p-nitroaniliną). Porównanie absorbancji p-nitroaniliny uwolnionej przez kaspazę (A_{405}) w próbce naświetlanej (fibroblasty apoptotyczne) z kontrolą nieindukowaną pozwoliło określić stopień wzrostu aktywności badanych kaspaz. Odnotowano, że zastosowana w doświadczeniach dawka promieniowania UVA (8 J/cm^2) spowodowała 4-krotny wzrost aktywnej kaspazy-8 (K (-) $A_{405} = 0,049 \pm 0,007$; K (+) $A_{405} = 0,200 \pm 0,0096$) i prawie 6-krotny wzrost aktywnej kaspazy-9 (K (-) $A_{405} = 0,065 \pm 0,0147$; K (+) $A_{405} = 0,385 \pm 0,0465$) oraz 4,5-krotny wzrost aktywnej kaspazy-3 (K (-) $A_{405} = 0,054 \pm 0,006$; K (+) A_{405}

= 0,241 ± 0,010). Wyniki przedstawione na rycinie 14 wykazały, że w znacznym stopniu hamowana jest przez wszystkie badane ekstrakty aktywność inicjatorowej proteazy serynowej (kaspazy-8), zaangażowanej we wczesne etapy apoptozy przebiegającej na szlaku receptorowym (zewnątrzpochodnym). Apoptoza na tym szlaku hamowana jest najsilniej przez ekstrakty z *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta* (o około 50%, przy najwyższym zastosowanym stężeniu ekstraktów), natomiast dla tego samego stężenia ekstraktów z kory i liści *F. excelsior* wykazano hamowanie o około 40% w odniesieniu do kontroli. W przypadku kaspazy-9 (kaspaza inicjatorowa, szlak mitochondrialny) ekstrakt z *O. europaea* (25 µg/ml) hamował aktywność aż prawie o 80% (p<0,001) w odniesieniu do komórek kontrolnych naświetlanych UVA, natomiast pozostałe ekstrakty o tym stężeniu powodowały spadek aktywności kaspazy-9 w zakresie 60-70%. Aktywność kaspazy-3 obniżana jest przez badane ekstrakty roślinne w granicach 50-65%.

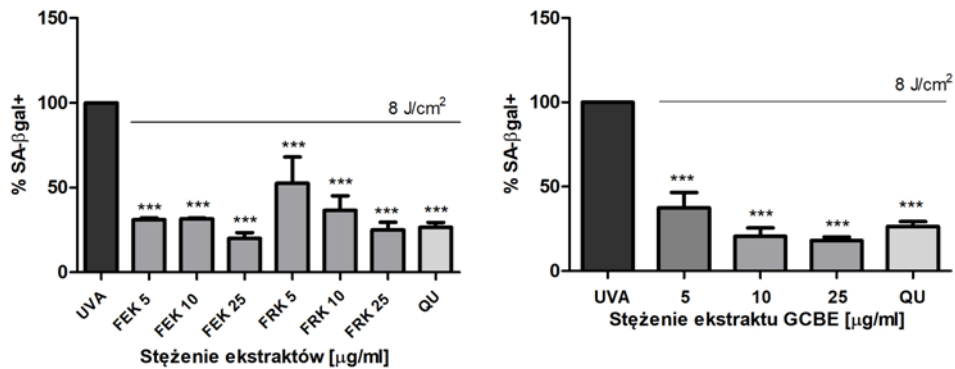


Ryc. 14. Ocena aktywności kaspazy-3;-8 i-9 w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów. Wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto aktywność odpowiedniej kaspazy w nietraktowanych komórkach stymulowanych UVA (8 J/cm^2); ($n=3$); średnia \pm SD; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ w porównaniu z UVA.

9.4.4. Ocena procesu starzenia komórkowego na podstawie aktywności β -galaktozydazy

Celem sprawdzenia wpływu promieniowania UVA na przyspieszone starzenie się komórek skóry dokonano pomiaru aktywności β -galaktozydazy, uwalnianej z lizosomów do cytoplazmy. β -galaktozydaza związana ze starzeniem (SA- β -galaktozydaza), będąca znacznikiem zachodzącej w komórkach senescencji, jest ważnym wskaźnikiem fotostarzenia się komórek w modelach eksperymentalnych. Zatem komórki starzejące charakteryzują się podwyższoną aktywnością tego enzymu. Dodanie do pożywki komórkowej substratu, jakim jest X-gal, w pH równym 6,0 sprawia, że cytozolowa forma β -galaktozydazy zdolna jest do rozkładu substratu do niebieskiego produktu widocznego pod mikroskopem świetlnym.

Analiza mikroskopowa wykazała, że promieniowanie UVA w zastosowanej, doświadczalnej dawce 8 J/cm^2 , ponad 4-krotnie zwiększa aktywność SA- β -galaktozydazy. Preinkubacja fibroblastów z ekstraktami roślinnymi: *F. excelsior*, *F. rhynchophylla* oraz *C. robusta*, prowadzi do znacznego zmniejszenia liczby komórek podlegających procesowi przyspieszonego starzenia, obserwowane jako pojedyncze komórki o niebieskim zabarwieniu, bez znacznych zmian morfologicznych komórek. Porównanie preparatów z komórkami kontrolnymi (nietraktowanych ekstraktami oraz promieniowaniem UVA), świadczy o tym, że starzenie komórek jest wynikiem działania promieniowania UVA, natomiast badane ekstrakty roślinne wykazują działanie ochronne. Najefektywniejszym działaniem charakteryzuje się ekstrakt *C. robusta*, gdzie zaobserwowano spadek odsetka komórek SA- β -gal-pozytywnych do ok. 15%, w porównaniu z kontrolą (UVA) (Ryc. 15). W przypadku ekstraktów z jesionów: *F. excelsior* (kora) i *F. rhynchophylla*, jak i związku referencyjnego (odsetek fibroblastów SA- β -gal+ utrzymuje się na poziomie 20-25%. Istotne statystycznie różnice w wartościach występują również w przypadku najniższego ($5 \mu\text{g/ml}$) i najwyższego ($25 \mu\text{g/ml}$) badanego stężenia w przypadku ekstraktu z kory *F. rhynchophylla* oraz ekstraktu *C. robusta* ($p<0,001$).

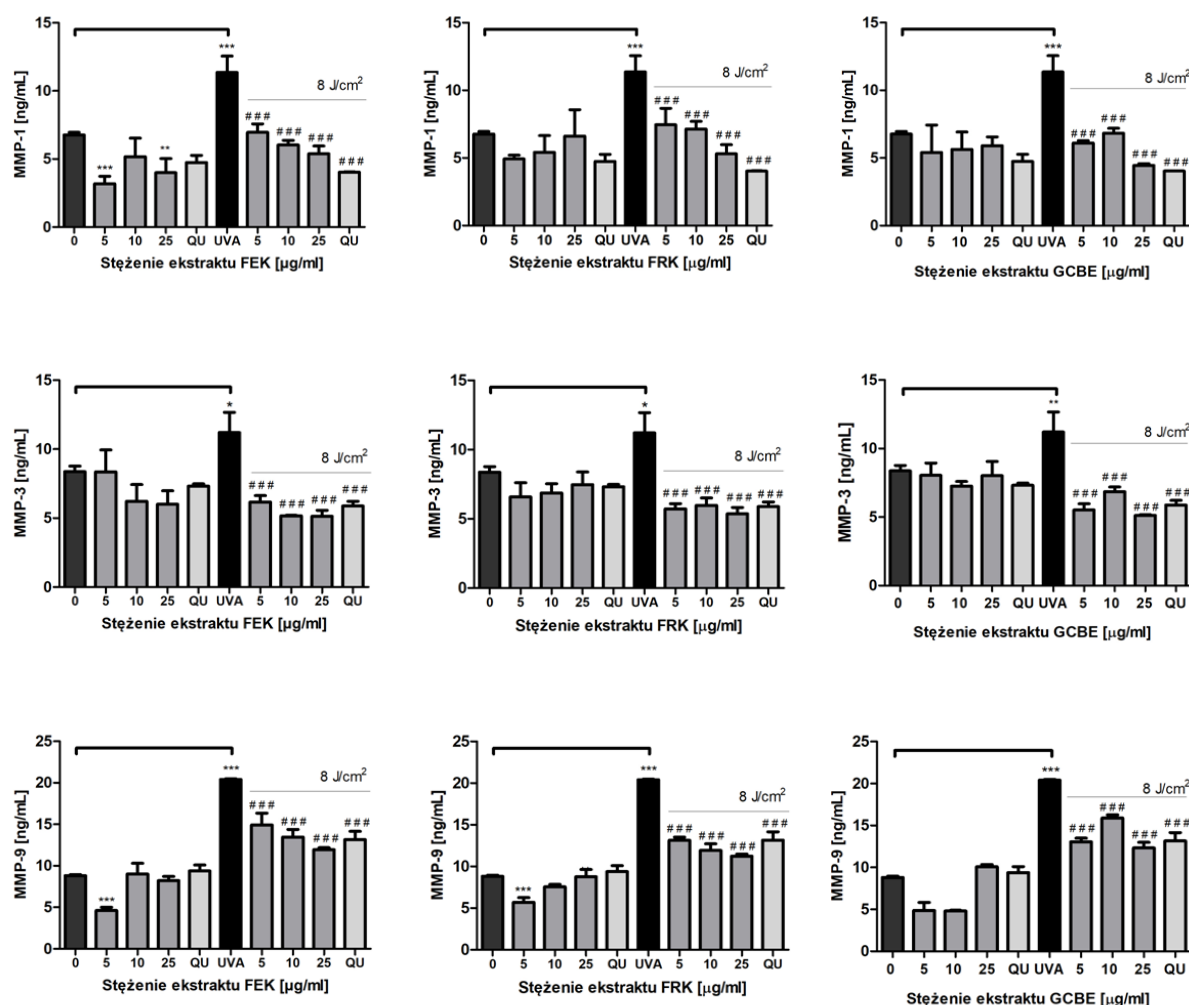


Ryc. 15. Poziom β -galaktozydazy (SA- β -gal) związanej ze starzeniem, będącej znacznikiem zachodzącej w komórkach senescencji. Wyniki przedstawiono jako % zawartość komórek starzejących się SA- β -gal-pozytywnych (SA- β -gal+) w przeliczeniu na 100 zliczanych komórek; (n=6); średnia \pm SD; ***p<0,001 w porównaniu z UVA.

9.5. Analiza poziomu ekspresji metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej

Metaloproteiny uczestniczą w wielu ważnych biologicznie procesach, jak embriogeneza, morfogeneza, angiogeneza, gojenie ran, apoptoza. Jednak najważniejszą rolę odgrywają w procesie degradacji macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej, która stanowi nie tylko konstrukcję pozakomórkową, ale w niej zawarte są także substancje aktywne, jak czynniki wzrostu, uwalniane pod wpływem metaloproteinaz. Równowaga pomiędzy aktywacją metaloproteinaz, m.in. pod wpływem działania promieniowania UVA, a inhibicją metaloproteinaz determinują ich aktywność. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-1/-3/-9 odgrywają kluczową rolę w fotostarzeniu skóry, wywołanym promieniowaniem UVA. W eksponowanych na działanie UVA fibroblastach Hs68 dochodzi do wzrostu poziomu MMP-1/-3/-9 (zaobserwowano wzrost ekspresji odpowiednio: MMP-1: 1,6-krotny [K(-) = 6,770 \pm 0,187; K(+) = 11,352 \pm 1,209 ng/mL]; MMP-3: 1,3-krotny [K(-) = 8,373 \pm 0,390; K(+) = 11,201 \pm 1,471 ng/mL]; MMP-9: 2,3-krotny [K(-) = 8,813 \pm 0,138; K(+) = 20,401 \pm 0,099 ng/mL]) (Ryc. 16). Wszystkie badane ekstrakty, z *C. robusta*, kory *F. excelsior* i *F. rhynchophylla*, istotnie i w sposób zależny od stężenia, zmniejszają poziom MMP-1 w fibroblastach Hs68 poddanych działaniu promieniowania UVA, w porównaniu do kontroli (naświetlane Hs68, nietraktowane ekstraktem). Efektywnym działaniem cechuje się ekstrakt z *C. robusta*, który zmniejsza prawie 3-krotnie poziom MMP-1, (biorąc pod uwagę najwyższe badane stężenie (25 μ g/ml; p<0,001, w porównaniu z UVA). Ekstrakty z kory *Fraxinus sp*, wykazują zbliżone właściwości, zmniejszając

2,5-krotnie poziom MMP-1 ($p < 0,001$). Biorąc pod uwagę MMP-3, wszystkie trzy analizowane ekstrakty w podobny sposób hamują uwalnianie tej metaloproteinazy (około 2-krotnie obniżają poziom MMP-3 przy najwyższym stężeniu, $p < 0,001$). Ekstrakt z *C. robusta* w znacznym stopniu wpływa na uwalnianie MMP-9 (spadek o około 35%, w porównaniu z naświetloną kontrolą; $p < 0,001$). Podobnie, ekstrakty z *Fraxinus sp.*, ograniczają ekspresję MMP-9 o około 40% przy stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$). Skuteczność działania fotochronnego badanych ekstraktów jest porównywalna ze związkiem referencyjnym, tj. kwercetyną.

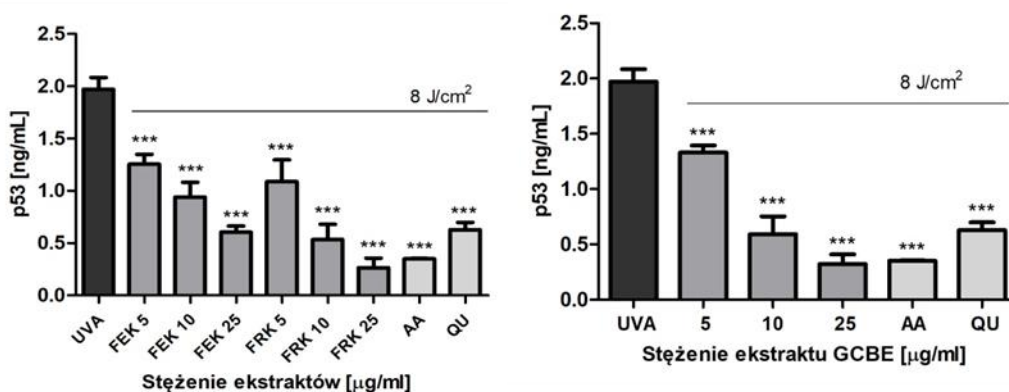


Ryc. 16. Ekspresja metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP-1;MMP-3; MMP-9) w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów; ($n=3$); średnia \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli nienaświetlanej (0) oraz # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli naświetlanej (UVA).

9.6. Udział ekstraktów roślinnych w modulacji głównych szlaków sygnałowych biorących udział w odpowiedzi na promieniowanie UVA

9.6.1. Poziom ekspresji supresora nowotworu, białka p53

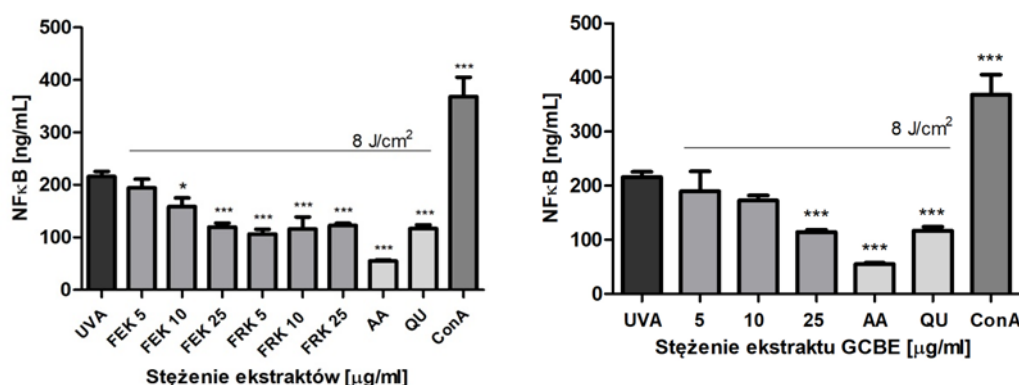
Uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem UVA mogą prowadzić do zmiany ekspresji onkogenów i genów supresorowych nowotworów, takich jak p53. Określono poziom ekspresji białka p53 w fibroblastach skóry za pomocą testu immunoenzymatycznego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że naświetlanie komórek promieniowaniem UVA (8 J/cm^2), ponad 4-krotnie zwiększa poziom ekspresji białka p53 [K(-) $0,589 \pm 0,0169$; K(+) $2,562 \pm 0,099 \text{ ng/ml}$]. Już pojedyncza dawka promieniowania UVA wywołała szybką akumulację białka p53 w fibroblastach skóry. Jednak preinkubacja fibroblastów z badanymi ekstraktami roślinnymi powoduje znaczny i istotny statystycznie spadek poziomu ekspresji białka p53. Obserwowana jest także zależność zmniejszania poziomu p53 wraz ze wzrostem stężenia badanych ekstraktów, przy czym zbliżoną zdolność redukcji wykazuje ekstrakt z kory *F. rhynchophylla* [$0,266 \pm 0,0918 \text{ ng/ml}$] oraz ekstrakt z *C. robusta* [$0,322 \pm 0,0867 \text{ ng/ml}$], w najwyższym badanym stężeniu $25 \mu\text{g/ml}$ (Ryc. 17). Prawdopodobnie związane jest to ze zdolnością ekstraktów do regulowania równowagi oksydoredukcyjnej w komórkach. Wiadomo, że p53 promuje ekspresję wielu genów antyoksydacyjnych, co odpowiada za zdolność p53 do kontrolowania stresu oksydacyjnego. Kwestią wartą podkreślenia jest uzyskany dla poszczególnych ekstraktów efekt porównywalny z wynikami uzyskanymi dla badanych związków referencyjnych [kwas askorbinowy $0,352 \pm 0,004$; kwercetyna $0,624 \pm 0,072 \text{ ng/ml}$]. Istotne statystycznie różnice w wartościach występują również w przypadku najniższego ($5 \mu\text{g/ml}$) i najwyższego ($25 \mu\text{g/ml}$) badanego stężenia w przypadku wszystkich badanych ekstraktów ($p < 0,001$).



Ryc. 17. Ekspresja białka p53 w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów; kontrola „UVA” przedstawia wzrost ekspresji p53 po naświetleniu; ($n=3$); średnia \pm SD; *** $p<0,001$ w porównaniu do UVA.

9.6.2. Poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF κ B

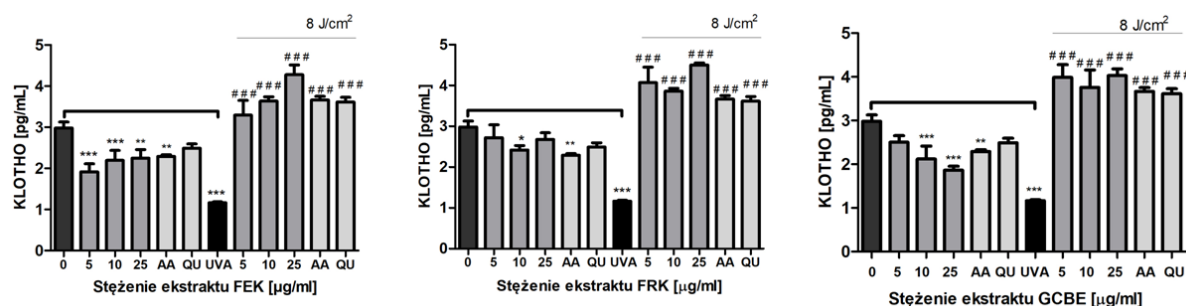
Rodzina czynników NF κ B reguluje ekspresję licznych genów komórkowych, które odgrywają ważną rolę w odpowiedziach immunologicznych i stresowych, zapaleniu i apoptozie. Białka NF κ B są aktywowane przez różne bodźce (cytokiny, infekcje bakteryjne i wirusowe, różne rodzaje promieniowania). Między innymi wzrost ROS wpływa na aktywację NF κ B, który to po przemieszczeniu do jądra, prowadzi do aktywacji transkrypcji białek odpowiedzi zapalnej. Działanie samego promieniowania UVA na fibroblasty skóry linii Hs68 powoduje istotny wzrost poziomu NF κ B ($p<0,05$), (kontrola „UVA” ($215,841\pm9,925$) przedstawia wzrost ekspresji NF κ B po naświetleniu, gdzie K(-) $907,870\pm11,226$; K(+) $1123,711\pm2,094 \text{ ng/ml}$), chociaż wzrost ten jest mniejszy niż w przypadku konkanawaliny A (Ryc. 18). Obserwowany jest spadek stężenia NF κ B w fibroblastach poddanych działaniu promieniowania UVA, preinkubowanych z badanymi ekstraktami. Wszystkie badane ekstrakty w stężeniu $25 \mu\text{g/ml}$ w przybliżonym stopniu hamują ekspresję badanego białka, ekstrakt z kory *F. excelsior* ($119,630\pm7,460 \text{ ng/ml}$), *F. rhynchophylla* ($122,569\pm4,226 \text{ ng/ml}$) oraz *C. robusta* ($114,352\pm4,243 \text{ ng/ml}$).



Ryc. 18. Ekspresja NF κ B w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów; kontrola „UVA” przedstawia wzrost ekspresji NF κ B po naświetleniu; ($n=3$); średnia \pm SD; * $p<0,05$; *** $p<0,001$ w porównaniu do UVA.

9.6.3. Poziom ekspresji białka KLOTHO

Klotho to związane z błoną lub rozpuszczalne białko przeciwstarzeniowe, którego działanie ochronne jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania wielu narządów. Jak wynika z dotychczasowych badań, zwierzęce modele badawcze pozbawione tego genu starzeją się przedwcześnie, z tego względu określany jest „genem młodości”, a jego aktywacja może wpływać na spowolnienie procesów starzenia. Zaobserwowano 2,5-krotny spadek poziomu ekspresji białka Klotho pod wpływem działania promieniowania UVA [K(-) $2,980 \pm 0,147$; K(+) $1,166 \pm 0,018$ pg/ml] (Ryc. 19). Obserwowany wzrost poziomu ekspresji białka Klotho w fibroblastach pre-inkubowanych z ekstraktami z *C. robusta*, *F. excelsior* oraz *F. rhynchophylla*, w porównaniu z komórkami naświetlanymi (nietraktowanymi ekstraktami) ($p < 0,001$) wskazuje na ich działanie fotoochronne.

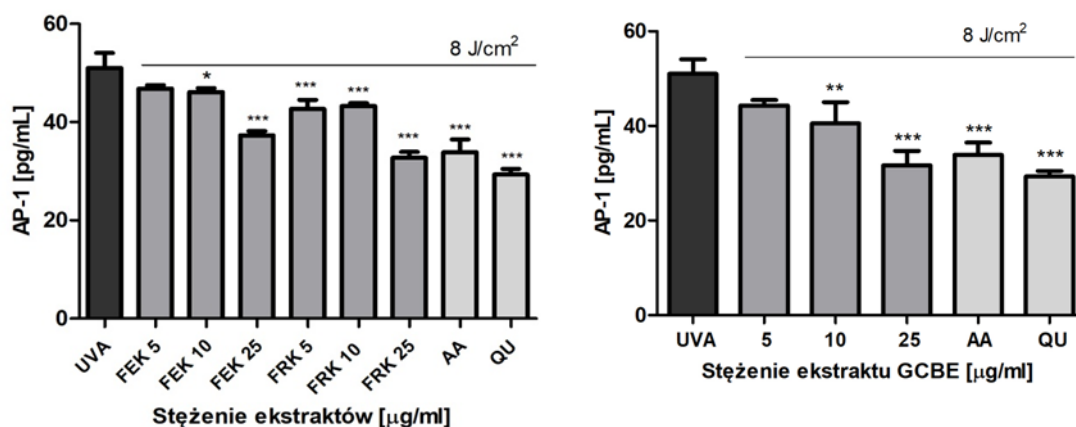


Ryc. 19. Ekspresja białka KLOTHO w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm^2), bez i w obecności ekstraktów; ($n=3$); średnia \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli nienaświetlanej (0) oraz # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli naświetlanej (UVA).

9.6.4. Poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego AP-1

Ekspresja białka AP-1 indukowana, m.in., pod wpływem działania UVA, służy jako marker odpowiedzi komórkowej na stres. Wiele bodźców, głównie ROS, są w stanie stymulować AP-1 do wiązania się z regionami promotorowymi wielu genów, które odgrywają istotną rolę w modulowaniu stanu zapalnego, proliferacji komórek, apoptozie i karcynogenezie. Wiadomo, że wzrost aktywności AP-1 jest związany z transformacją nowotworową i działaniem czynników promujących nowotworzenie, takich jak czynniki wzrostu, promieniowanie ultrafioletowe i onkogeny. Biorąc pod uwagę poziom ekspresji białka AP-1 po naświetlaniu komórek Hs68, jest on ponad 2-krotnie wyższy w odniesieniu do komórek

niczym nietraktowanych [K(-) 20,936±0,499; K(+) 71,953±3,492 pg/ml]. Widoczny jest istotny statystycznie spadek poziomu białka AP-1 w komórkach poddanych działaniu promieniowania (Ryc. 20), ale wcześniej traktowanych badanymi ekstraktami roślinnymi. Również w tym przypadku obserwowana jest zależność między spadkiem stężenia AP-1 oraz wzrostem stężenia ekstraktów. Ekstrakty w najwyższym badanym stężeniu (25 µg/ml) powodują spadek poziomu białka AP-1: *F. excelsior* (37,306±0,872 pg/ml), *F. rhynchophylla* (32,745±1,194 pg/ml) oraz *C. robusta* (31,672±3,031 pg/ml). Obniżony poziom ekspresji białka AP-1 może świadczyć o zwiększonej przeżywalności komórek, zmniejszony poziom czynników stresowych nie kieruje komórek na szlaki apoptozy.

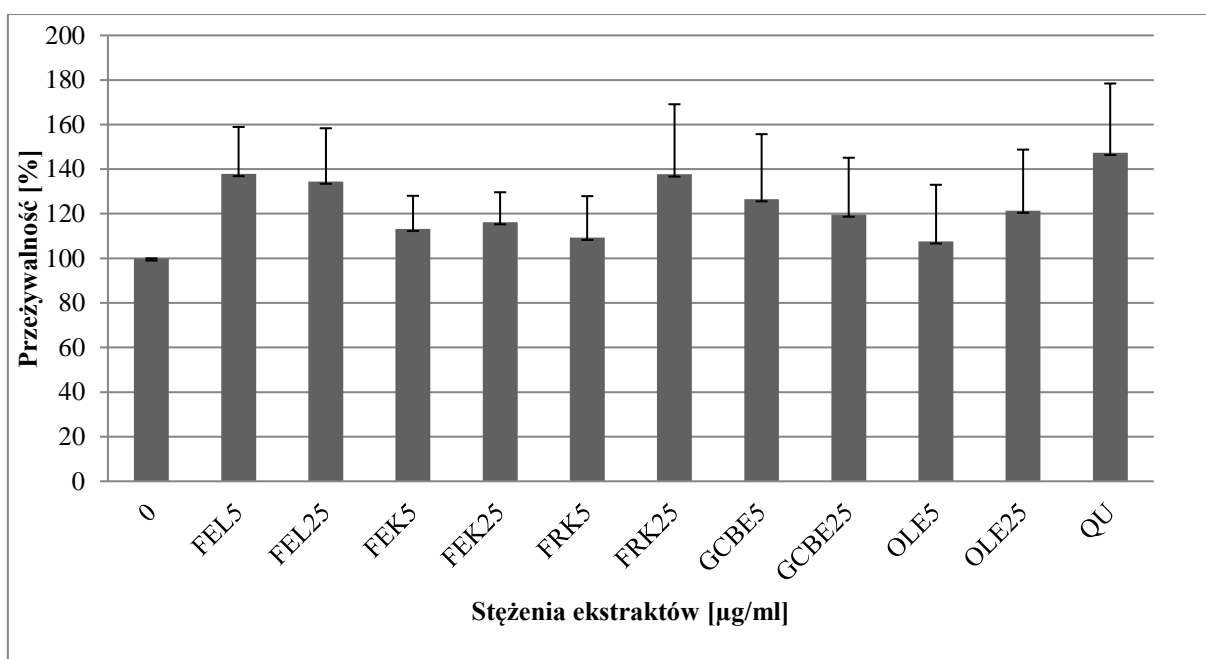


Ryc. 20. Ekspresja AP-1 w fibroblastach Hs68, poddanych działaniu promieniowania UVA (8 J/cm²), bez i w obecności ekstraktów; (n=3); średnia±SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 w porównaniu do UVA.

9.7. Ocena przeciwzapalnego działania ekstraktów poprzez pomiar stężenia wydzielanych cytokin prozapalnych IL-2 i TNF α (metoda ELISA)

9.7.1. Żywotność PBMC

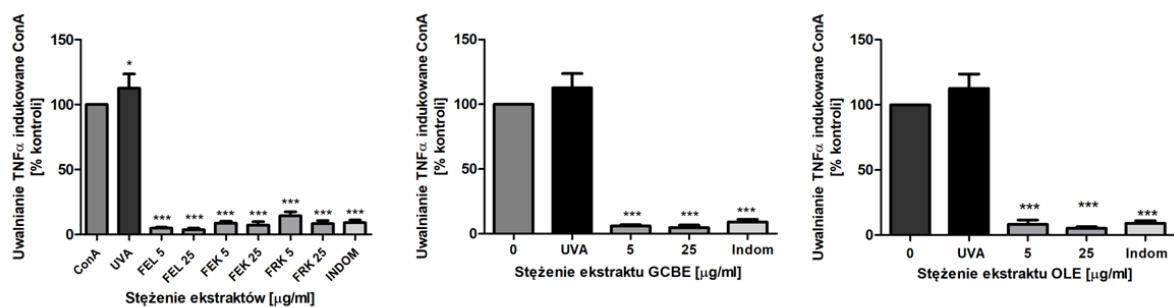
W początkowym etapie tej części badań oceniono wpływ ekstraktów z: *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta* na przeżywalność PBMCs (Ryc. 21). Wyniki wskazują, że badane ekstrakty (przy zastosowanych stężeniach 5 i 25 µg/ml), jak i kwercetyna (25 µg/ml) nie wpływają istotnie na zmniejszenie przeżywalności PBMCs po 4 godzinach inkubacji, (p> 0,05).



Ryc. 21. Przeżywalność PBMCs inkubowanych z ekstraktami i eksponowanych na działanie promieniowania UVA (8 J/cm^2). Wyniki przedstawiono jako odsetek żywych PBMC po naświetleniu, za 100% przyjęto absorbancję odpowiedniej próbki nienaświetlonej; (n=3); średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic w porównaniu do kontroli.

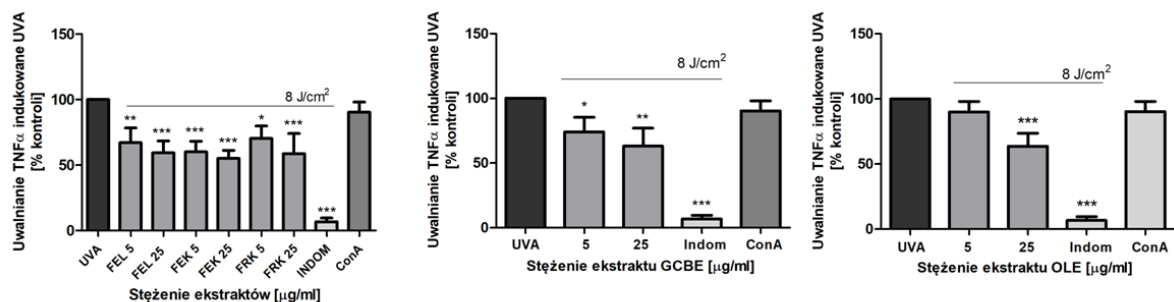
9.7.2. Ocena aktywności prozapalnej czynnika martwicy nowotworów – TNF α

Pośrednia stymulacja cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworu TNF- α w fibroblastach i keratynocytach, które to wzmacniają ekspresję MMPs, zachodzi pod wpływem działania promieniowania UVA. Na wytwarzanie cytokin, w tym IL-2 i TNF- α , w znacznym stopniu wpływa wytwarzanie ROS (w tym właśnie pod wpływem promieniowania UVA). Cytokiny, takie jak prozapalny TNF- α i interleukina 2 (IL-2) odgrywają istotną rolę odpowiednio w ostrej i przewlekłej odpowiedzi zapalnej. W pierwszym etapie badań określono poziom wydzielanego TNF- α przez PBMCs stymulowane konkanawaliną A, czyli znanym czynnikiem mitogennym. Jak przedstawiono na rycinie 22, wszystkie badane ekstrakty, jak również indometacyna należąca do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, w zbliżonym stopniu (o ponad 90%, $p < 0,001$) hamowały wydzielanie TNF- α przez PBMCs stymulowane konkanawaliną A.



Ryc. 22. Uwalnianie TNF α w PBMCs stymulowanych Con A. Wyniki wyrażono jako % kontroli, gdzie poziom cytokin uwalnianych z nietraktowanych komórek stymulowanych Con A (10 μ g/ml) przyjęto jako 100%. Rycina przedstawia średnie wyniki z 3 niezależnych eksperymentów. Słupki błędów oznaczają \pm SD. *** p <0,001 w porównaniu do komórek stymulowanych Con A (nietraktowanych). Jako odniesienie zastosowano indometacynę (25 μ g/ml). * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 w porównaniu do Con A.

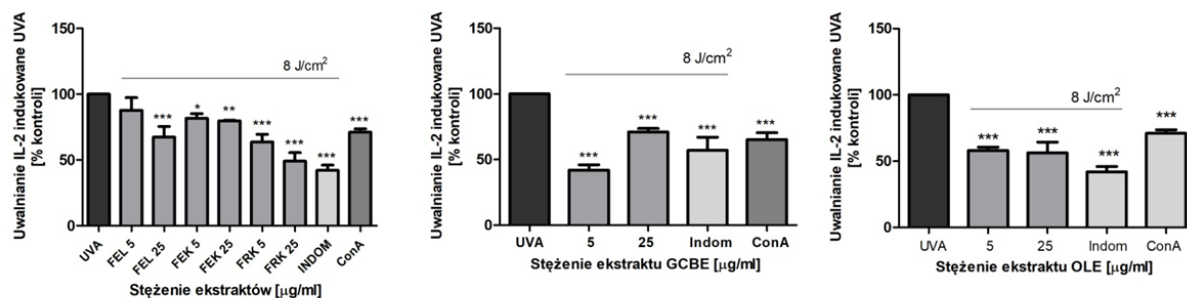
Następnie PBMCs stymulowano poprzez naświetlanie promieniowaniem UVA (8 J/cm²). Zaobserwowano wydzielanie TNF α pod wpływem promieniowania UVA na zbliżonym poziomie jak po działaniu ConA (Ryc. 22 i 23). Działanie promieniowania UVA w dawce 8 J/cm², powoduje 5,5-krotny wzrost stężenia wydzielanego TNF- α przez PBMCs [K(-) = 82,374 \pm 9,113; K(+) = 450,571 \pm 29,153 pg/mL]. Preinkubacja komórek z ekstraktami roślinnymi: *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta*, wpływa na zmniejszenie sekrecji TNF- α w PBMCs stymulowanych promieniowaniem UVA (o ok. 40% względem kontroli) (Ryc. 23). Potwierdza to zdolność ekstraktów do przeciwdziałania indukowanej UVA stymulacji reakcji zapalnej.



Ryc. 23. Uwalnianie TNF α z PBMCs stymulowanych UVA. Wyniki wyrażono jako % kontroli, gdzie poziom cytokiny w nietraktowanych komórkach stymulowanych UVA (8 J/cm²) przyjęto jako 100%. Rycina przedstawia średnie wyniki z 3 niezależnych eksperymentów. Słupki błędów oznaczają \pm SD. ***p<0,001 w porównaniu do komórek stymulowanych UVA (nietraktowanych). Jako odniesienie zastosowano indometacynę (25 μ g/ml). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 w porównaniu do UVA.

9.7.4. Ocena działania przeciwzapalnego badanych ekstraktów na podstawie enzymatycznego testu IL-2

IL-2 wytwarzana jest głównie przez limfocyty T po stymulacji antygenowej, limfocyty B oraz pozostałe jednostki układu odpornościowego, jak limfocyty NK, komórki dendrytyczne, monocyty i komórki tuczne. Promieniowanie UVA stymuluje makrofagi do produkcji cytokin, takich jak interleukina (IL)-2, czy czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α). W wyniku działania promieniowania UVA na PBMCs, obserwowany jest ponad 2-krotny wzrost poziomu wydzielanej IL-2 [K(-) = 115,636 \pm 21,145 pg/mL; K(+) = 248,924 \pm 6,9 pg/mL]. Biorąc pod uwagę poziom IL-2, wydzielanej pod wpływem promieniowania UV jest on znacznie wyższy aniżeli pod wpływem działania czynnika mitogennego, jakim jest konkanawalina A (w stężeniu końcowym 10 μ g/ml; p<0,001) (Ryc. 24). Wszystkie badane ekstrakty hamują wydzielanie IL-2 w odniesieniu do kontroli, przy czym ekstrakty (25 μ g/ml) z *F. rhynchophylla*, *O. europaea* wykazują największy wpływ, porównywalny z działaniem indometacyny, na zmniejszenie sekrecji IL-2 (w przybliżeniu o 50%, p<0,001). Wyniki te wskazują na działanie przeciwzapalne badanych ekstraktów roślinnych.



Ryc. 24. Uwalnianie IL-2 w PBMCs stymulowanych UVA. Wyniki wyrażono jako % kontroli, gdzie poziom cytokiny w nietraktowanych komórkach stymulowanych UVA (8 J/cm^2) przyjęto jako 100%. Rycina przedstawia średnie wyniki z 3 niezależnych eksperymentów. Słupki błędów oznaczają \pm SD; *** $p < 0,001$ w porównaniu do komórek stymulowanych UVA (nietraktowanych). Jako odniesienie zastosowano indometacynę (25 $\mu\text{g/ml}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w porównaniu do UVA.

9.8. Wyznaczenie wskaźnika ochrony przeciwsłonecznej (SPF) metodą spektrofotometrii w ultrafiolecie

Skuteczność ochrony przeciwsłonecznej opisuje współczynnik ochrony przeciwsłonecznej. SPF służy do ilościowego pomiaru skuteczności preparatów przeciwsłonecznych. Produkty przeznaczone do ochrony przeciwsłonecznej powinny charakteryzować się zdolnością absorpcji promieniowania w szerokim zakresie długości fali 290-400 nm (obejmującym zakres promieniowania UVA). SPF dla ekstraktów roślinnych z: *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta* wyznaczono metodą *in vitro* (spektrofotometrii w ultrafiolecie). Absorbancję próbek mierzono w zakresie 290-380 nm, przy każdym przyroście długości fali o 5 nm. SPF dla poszczególnych ekstraktów został wyliczony na podstawie przyjętego równania Mansur'a, według Mazumder i wsp., 2018.

Obliczone wartości SPF wahają się w zakresie 4,16 – 11,30 (Tabela 5) przy czym ekstrakty z kory *F. excelsior* i *C. robusta* wykazują najwyższy SPF i jest on porównywalny z wartością oznaczoną dla związku referencyjnego – kwercetyny. Wysoką wartością współczynnika charakteryzują się także ekstrakt z kory *F. rhynchophylla* (SPF=10,21). Należy jednak podkreślić, że równanie Mansur'a pozwala na ocenę skuteczności ochrony przeciwsłonecznej w zakresie odpowiadającym promieniowaniu UVB (280-320 nm), natomiast nie jest reprezentatywne dla zakresu UVA. System oceny SPF dla filtrów przeciwsłonecznych metodami *in vivo* opiera się na rumieniu jako punkcie końcowym. Skuteczność wywoływania rumienia przez promieniowanie UV gwałtownie spada wraz

z długością fali; aby wywołać taką samą reakcję rumieniową potrzeba około 1000 razy większej dawki UVA w porównaniu z UVB. SPF jest definiowany jako energia UV wymagana do wytworzenia minimalnej dawki rumienia (MED, ang. minimal erythema dose) na chronionej skórze, podzielona przez energię UV wymaganą do wytworzenia MED na skórze niechronionej (Kullavanijaya i Lim, 2005; Donglikar i Deore, 2016).

Tabela 5. Wyznaczone współczynniki SPF.

Ekstrakt/antyoksydant	SPF
<i>F. excelsior</i> – liście (FEL)	7,80 ± 0,062
<i>F. excelsior</i> – kora (FEK)	11,30 ± 0,052
<i>F. rhynchophylla</i> – kora (FRK)	10,21 ± 0,024
<i>O. europaea</i> – liście (OLE)	4,16 ± 0,019
<i>C. robusta</i> – nasiona (GCBE)	11,27 ± 0,026
Kwas askorbinowy (AA)	0,47 ± 0,011
Kwercetyna (QU)	11,25 ± 0,053
Rutyna (RUT)	5,80 ± 0,031

10. Dyskusja

Światło słoneczne, docierające do Ziemi, zawiera znacznie większą ilość promieniowania UVA niż UVB, przypuszcza się, że względna immunosupresyjna odpowiedź na UVA jest trzykrotnie wyższa niż w przypadku UVB. Na podstawie dostępnych danych wiadomo, że nadmierna ekspozycja na UVB indukuje wcześniejszą, intensywną odpowiedź skóry (rumień, oparzenia słoneczne) natomiast główne, widoczne skutki promieniowania UVA pojawiają się dopiero po latach ekspozycji i udowodniono, że są one odpowiedzialne za oznaki fotostarzenia i fotokarcynogenezę (Battie i wsp., 2014, Salminen i wsp., 2022). UVA generuje uszkodzenia DNA w komórkach skóry, pośrednio poprzez wzmożoną produkcję ROS, ale także w sposób bezpośredni, indukując powstawanie dimerów cyklobutanopirymidynowych (Cadet i wsp., 2009). Uszkodzenia DNA oraz wzrost poziomu ROS inicjują kilka kaskad transdukcji sygnału, w tym szlaków sygnałowych z udziałem kinaz MAP, AP-1 i NFκB, co prowadzi do uwalniania cytokin prozapalnych i MMPs. Oksydacyjne uszkodzenia makrocząsteczek oraz struktur komórkowych prowadzą do śmierci komórkowej, głównie na drodze apoptozy, czy też do senescencji (Parrado i wsp., 2018). Stosowane filtry

przeciwsłoneczne nie zapewniają skutecznej ochrony przed uszkodzeniami makromolekuł komórek skóry, a niektóre syntetyczne filtry UV mogą powodować reakcje alergiczne skóry (Nunes i wsp., 2018) albo działać toksycznie na organizm człowieka, a po uwolnieniu do środowiska na ekosystemy morskie (Chu i wsp., 2022, Morocho-Jácome i wsp., 2020). To wskazuje na potrzebę prowadzenia badań nad identyfikacją i charakterystyką aktywności biologicznych nowych substancji o działaniu fotoochronnym celem zapobiegania genotoksyczności promieniowania UVA i jego skutkom w zakresie fotostarzenia i raka skóry (Salminen i wsp., 2022). Innowacyjnym rozwiązaniem w ochronie przeciwsłonecznej jest wprowadzanie obok filtrów przeciwsłonecznych, naturalnie występujących związków roślinnych, w tym wiele uwagi poświęcono ekstraktom roślinnym oraz związkom o właściwościach przeciwutleniających. Fibroblasty są pierwotnymi komórkami skóry właściwej, odpowiedzialnymi za wytwarzanie składników macierzy zewnątrzkomórkowej decydujących o właściwościach strukturalnych i mechanicznych skóry. Wiele badań wskazuje, że fibroblasty w hodowli mają zdolność odtwarzania różnych form fotouszkodzeń skóry wywoływanych promieniowaniem UVA na poziomie komórkowym (Oliveira i wsp., 2019), dlatego stanowią dogodny i bardzo często stosowany model komórek w badaniach mechanizmów działania promieniowania UVA oraz właściwości fotoochronnych substancji roślinnych.

Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej było zbadanie roli ekstraktów pochodzących z naturalnych surowców roślinnych, z rodziny *Oleaceae* i *Rubiaceae*, w odpowiedzi komórek skóry na promieniowanie UVA. Jako przedmiot badań wybrano 5 suchych ekstraktów (wodno-etanolowych lub metanolowych), z których dwa – z liści oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.) i z nasion nieprażonej kawy (*Coffea robusta*) – są popularnymi suplementami diety. Natomiast pozostałe ekstrakty zostały wyizolowane z surowców zielarskich, z kory i liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*) oraz z kory jesionu koreańskiego (*Fraxinus rhynchophylla*). Cel pracy zakładał ocenę potencjału fotoochronnego wobec fibroblastów ludzkiej skóry (Hs68) oraz określenie mechanizmów działania wytypowanych do badań ekstraktów w warunkach *in vitro*. Założeniem przeprowadzonych badań było wykazanie, że ekstrakty mogą wykazywać właściwości fotoochronne przed promieniowaniem UVA, co dotychczas nie było dokładnie zbadane. Zrealizowanie celu badawczego mogłoby w przyszłości stać się argumentem do zastosowania analizowanych ekstraktów roślinnych w produkcji nowoczesnych, bardziej skutecznych i bezpiecznych preparatów przeciwsłonecznych.

Suplementy diety zawierające w swoim składzie ekstrakty roślinne stanowią silnie rozwijającą się gałąź przemysłu spożywczego i farmaceutycznego, jednak ich jakość jest często kwestionowana ze względu na niewystarczające regulacje prawne (Dwyer i wsp., 2018). Parametry jakościowe komercyjnych suplementów diety z *O. europaea* i *C. robusta*, jak również wyizolowanych ekstraktów z kory i liści jesionów, zweryfikowano poprzez oznaczenie ich profilu fitochemicznego. W wyniku przeprowadzonej analizy UHPLC-PDA-ESI-MS³ w ekstrakcie z liści oliwki, stwierdzono występowanie składników należących do trzech grup, irydoidów i ich pochodnych, fenyloetanoidów oraz flawonoidów (Suplement, Tabela 6, Rycina 26), spośród których za dominujące składniki ekstraktu można uznać oleuropeinę i jej izomer oraz 7-glukozyd luteoliny. Oznaczona metodą HPLC-PDA (Tabela 6) sumaryczna zawartość tych związków wynosiła 261.8 mg/g s.m. ekstraktu, z wyraźną przewagą oleuropeiny (221.9 mg/g) i towarzyszącego jej izomeru (26.0 mg/g). Analiza UHPLC-PDA-ESI-MS³ ekstraktu z nasion „zielonej” kawy potwierdziła występowanie składników polifenolowych (Tabela 7, Rycina 27), które przyporządkowano do grup pochodnych kwasu kawowego, ferulowego oraz *p*-kumarowego. Spośród zidentyfikowanych związków wyróżniono dominujące składniki, w tym kwasy 3-, 4-, i 5- kawoilochinowe, kwas 5-feruilochinowy oraz kwasy 3,4-, 3,5- i 4,5-dikawoilochinowe. Jak pokazują wyniki analizy HPLC-PDA (Tabela 7), sumaryczna zawartość dominujących składników ekstraktu sięga wartości 461.2 mg/g s.m. ekstraktu, z przeważającym kwasem chlorogenowym (286.3 mg/g), którego udział stanowił ponad 60% sumy wszystkich oznaczonych ilościowo polifenoli. Analiza profilu fitochemicznego obu komercyjnych ekstraktów, z liści oliwki i nasion kawy, potwierdziła deklarowane przez producentów zawartości odpowiednio oleuropeiny (20 %) i kwasu chlorogenowego (50 %). Przeprowadzona analiza UHPLC-PDA-ESI-MS³ ekstraktów z kory i liści jesionu wyniosłego oraz kory jesionu koreańskiego ujawniła występowanie 61 związków należących do różnych klas chemicznych, w tym kumaryn, fenyloetanoidów, flawonoidów, lignanów, irydoidów oraz pochodnych prostych alkoholi i kwasów fenolowych (Tabela 8, Rycina 28). W przypadku ekstraktu z kory *F. excelsior* łączna zawartość 20 składników umożliwiających ich oznaczenie ilościowe wynosiła 361,9 mg/g, natomiast dominującą frakcją były kumaryny (168,29 mg/g), a wśród nich kalikantozyd i jego dwa izomery. Ekstrakt zawierał również stosunkowo dużą ilość fenyloetanoidów (82,72 mg/g) oraz sekoirydoidów (64,75 mg/g). W ekstrakcie z liści *F. excelsior* całkowita zawartość oznaczonych związków wynosiła 120,9 mg/g i był to jedyny ekstrakt, w którym zidentyfikowano flawonoidy (30,97 mg/g), stanowiące, obok fenyloetanoidów (61,87 mg/g), przeważającą frakcję. Ponad dwie trzecie frakcji fenyloetanoidów stanowił werbaskozyd,

natomiast we frakcji flawonoidów dominowała rutyna. Trzecie pod względem zawartości irydoidy (17,52 mg/g) reprezentowane były przede wszystkim przez oleuropeinę, ligstrozyd i oleoakteozyd. W ekstrakcie z kory *F. rhynchophylla* frakcją dominującą były kumaryny (238,95 mg/g), które stanowiły ponad 85% ogółu oznaczonych ilościowo metabolitów (278,23 mg/g). Głównymi składnikami tej grupy były eskulina i fraksyna.

Możliwy cytotoksyczny wpływ ekstraktów z *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta* na żywotność ludzkich fibroblastów skóry Hs68 oceniono za pomocą testu CCK-8 po 24-godzinnej inkubacji z badanymi ekstraktami w zakresie stężeń (2,5-25 µg/ml). Wyniki przeprowadzonych testów żywotności komórek (Ryc. 7) wskazują na brak właściwości cytotoksycznych badanych ekstraktów wobec fibroblastów Hs68. Efekt cytoprotekcyjny, obserwowany jako niewielki wzrost przeżywalności po naświetlaniu fibroblastów Hs68 preinkubowanych z ekstraktami roślinnymi (w porównaniu z kontrolą nienaświetloną) może być związany z wydłużeniem czasu przeżycia komórek, bez stymulacji podziałów komórkowych, albo bardziej prawdopodobnym mechanizmem działania badanych ekstraktów jest ich potencjał antyoksydacyjny – przeżywalność zwiększa się ze względu na większą liczebność komórek.

Następnie fibroblasty Hs68 pre-inkubowano z ekstraktami roślinnymi (2,5-25 µg/ml, 24 h) oraz związkami referencyjnymi (25 µg/ml, 24 h) przed naświetlaniem UVA (8 J/cm²) i analizowano żywotność komórek za pomocą testu CCK-8. Wcześniej eksperymentalnie ustalono optymalną dawkę promieniowania naświetlając fibroblasty dawkami w zakresie 2-20 J/cm². Stwierdzono, że naświetlanie UVA istotnie zmniejszyło żywotność fibroblastów do około 80% (p<0,05) (Ryc. 8), co spełniało zakładane kryteria, stąd dawka promieniowania UVA 8 J/cm² była następnie zastosowana we wszystkich przeprowadzonych badaniach. Zaobserwowany wzrost żywotności komórek traktowanych ekstraktami (w porównaniu z kontrolnymi) oraz naświetlanych promieniowaniem UVA (Ryc. 8) wyraźnie wskazuje, że 24-godzinna ekspozycja komórek Hs68 na badane ekstrakty daje znaczący efekt ochronny przed promieniowaniem UVA. Porównywalny efekt cytotoksycznego działania wybranej dawki promieniowania UVA uzyskano na podstawie jednoczesnego barwienia aneksyną V sprzężoną z FITC i PI, a następnie analizie metodą cytometrii przepływowej, która potwierdziła zmniejszenie odsetka żywych komórek Hs68 o około 20% względem fibroblastów kontrolnych (Ryc. 12A). Podobnie jak w przypadku wyników testu CCK8, zastosowane ekstrakty utrzymują żywotność komórek na poziomie komórek kontrolnych (nietraktowanych, nienaświetlanych). Według danych literaturowych fibroblasty położone w górnej warstwie skóry zanikają w ciągu 48 godzin po ekspozycji na promieniowanie UVA

(25 J/cm²) na skutek śmierci w procesie apoptozy. Z drugiej strony, struktura i organizacja naskórka nie ulegają znaczącym zmianom, co wskazuje, że przeżywalność fibroblastów skóry po ekspozycji na promieniowanie UVA jest mniejsza w porównaniu z keratynocytami naskórka. Dane te potwierdzają, że fibroblasty skóry są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny wywołany promieniowaniem UVA niż keratynocyty (Battie i wsp., 2014) i uzasadnia zastosowanie fibroblastów skóry człowieka (Hs68) w badaniach własnych. Podobne badania przeprowadzone przez Sulistiawati i wsp. wykazały, iż traktowanie ekstraktem z kawy (*Coffea robusta*) indukuje wzrost fibroblastów nabłonka dziąsła szczurów (*Rattus norvegicus*). Autorzy efekt ten przypisują obecności saponin, które działają na syntezę czynników wzrostu fibroblastów (Sulistiawati i wsp., 2022).

Przeprowadzona analiza potencjału antyoksydacyjnego wskazuje, że ekstrakty z *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta* charakteryzują się mniejszą całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w odniesieniu do związków referencyjnych (kwercetyny i rutyny), przy czym kwercetyna wykazuje najsilniejsze działanie przeciwutleniające (w trzech wariantach metod, redukcji syntetycznych rodników ABTS i DPPH oraz FRAP, uzyskano najwyższe wartości dla kwercetyny) (Tabela 4). Spośród wszystkich badanych ekstraktów roślinnych na wyróżnienie zasługuje ekstrakt z nasion *C. robusta*, który wykazuje najwyższą zdolność redukcji jonów żelaza, jak i rodnika DPPH, obie porównywalne z kwasem askorbinowym. GCBE charakteryzuje się również największą spośród badanych ekstraktów, porównywalną z rutyną, zdolnością do redukcji jonów żelaza. Wysoki potencjał antyoksydacyjny GCBE wynika przede wszystkim z dużej sumarycznej zawartości pochodnych kwasu kawowego, ferulowego i *p*-kumarowego (461.2 mg/g s.m. ekstraktu), z przeważającym kwasem chlorogenowym (inaczej 5-O-kawoilochinowym), którego udział stanowił ponad 60% sumy wszystkich oznaczonych ilościowo polifenoli. Wyniki badań innych autorów także wskazują na wysoki potencjał antyoksydacyjny GCBE, który wynika z synergistycznego działania zawartych w nim związków fenolowych, przede wszystkim kwasu chlorogenowego, ferulowego, epikatechin (Saewan i Jimtaisong, 2022). Wśród nich kwas 5-O-kawoilochinowy (5-CQA/CGA), który jest jednym z najlepiej przebadanych estrów kwasu chlorogenowego jest odpowiedzialny w dużej mierze za silne antyoksydacyjne działanie GCBE (Farias-Pereira i wsp., 2018; Nikpayam i wsp., 2018; Bosso i wsp., 2021). Podobnie badania, w których porównywano potencjał antyoksydacyjny kilku gatunków kawy prażonej i nieprażonej, wykazały, że ekstrakt z ziaren „zielonej” kawy (*C. arabica*) najskuteczniej, aż o 89,5%, zmiatał rodnik DPPH (Pratiwi, 2021). Oleuropeina wykazała również silną aktywność zmiatania rodnika DPPH z wartością IC₅₀, 40,4 μM,

efektywniejszą niż kwas askorbinowy (IC₅₀, 50,3 μM) (Oh i wsp., 2003). Oceniono, że zdolność antyoksydacyjna OLE jest wyższa niż witaminy C i E, czy czystego hydroksytyrozolu, który jest silnym antyoksydantem. (Özcan i Matthäus, 2017; Abaza i wsp., 2015). Antyoksydacyjne właściwości oleuropeiny i hydroksytyrozyny wynikają ze zdolności chelatowania metali i zmiatania wolnych rodników. Związki te hamują łańcuch propagacji podczas procesu utleniania poprzez oddanie wodoru rodnikowego do rodników peroksyłowych i tworzenie stabilnych pochodnych podczas tych reakcji, zapobiegają także powstawaniu rodników hydroksyłowych (Nunes i wsp., 2022; Castejón i wsp., 2020). Katecholowa struktura eskuletyny wiąże się ze zdolnością bezpośredniego wygaszania/zmiatania wolnych rodników, na przykład syntetycznego rodnika DPPH oraz rodnika hydroksyłowego (Kim i wsp., 2008). Także według innych autorów zawarta w ekstraktach z *Fraxinus sp.*, eskuletyna wykazuje silne działanie zmiatające rodniki DPPH i anionorodniki ponadtlenkowe, co przyczynia się do efektu fotoprotekcyjnego (Rahman i wsp., 2021). Dodatkowo kumaryny z fenolowymi grupami hydroksyłowymi wykazały zdolność wygaszania ROS ze względu na ich zdolność wychwytywania niesparowanych elektronów. Sekwestracja jonów metali jest również uważana za modelowy mechanizm aktywności przeciwutleniającej kumaryn (Thuong i wsp., 2009).

Celem określenia zdolności ekstraktów roślinnych do ochrony komórek Hs68 przed genotoksycznością promieniowania UVA dokonano oceny poziomu uszkodzeń DNA za pomocą testu kometowego. Różnorodne uszkodzenia DNA, jak SSB i DSB lub miejsca AP można wykryć przy zastosowaniu alkalicznej wersji testu kometowego. Uszkodzenia DNA, głównie DSB, które są uważane za najbardziej cytotoksyczne uszkodzenia wywołane promieniowaniem, jeśli nie zostaną odpowiednio naprawione prowadzą do śmierci komórkowej. Naświetlanie UVA wywołało znaczny wzrost całkowitego poziomu uszkodzeń DNA (Ryc. 9). Jednak preinkubacja fibroblastów z ekstraktami skutkowała zależnym od stężenia zmniejszeniem zawartości DNA w „ogonie”, przy najwyższym badanym stężeniu do poziomu poniżej 5% ($p < 0.001$), podobnie jak dla związków referencyjnych, QU i AA. Promieniowanie UVA powoduje nadmierne wytwarzanie ROS, takich jak tlen singletowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik hydroksyłowy. Stres oksydacyjny (wzrost ROS i zaburzenia enzymatycznego i nieenzymatycznego systemu obrony antyoksydacyjnej) jest przyczyną uszkodzeń genomowego i mitochondrialnego DNA, ale też peroksydacji lipidów i utleniania białek (Montes de Oca i wsp., 2017, Bocheva i wsp., 2022). Zatem głównym mechanizmem fotoochronnego działania związków roślinnych powinno być zmniejszanie stresu oksydacyjnego. W celu określenia zdolności przeciwutleniających

ekstraktów określono ich wpływ na wewnątrzkomórkową produkcję ROS indukowaną przez UVA w komórkach Hs68 za pomocą sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA. W naszych warunkach eksperymentalnych, UVA zwiększyło produkcję ROS w fibroblastach ponad 4-krotnie (Ryc. 10). Wszystkie badane ekstrakty hamowały produkcję ROS, chociaż nie w stopniu jakiego oczekiwano, ekstrakty z liści *F. excelsior*, kory *F. rhynchophylla* i *O. europaea* o stężeniu 25 µg/ml o około 25% w porównaniu z kontrolą naświetloną (bez ekstraktów) ($p < 0,05$), natomiast nieco silniejszą aktywność wykazały ekstrakty z kory *F. excelsior* i z nasion *C. robusta* (Ryc. 10). Mimo że analizowane ekstrakty mają mniejszą zdolność antyoksydacyjną oznaczoną za pomocą testów bezkomórkowych, w porównaniu z kwercetyną ((kilkakrotnie (GCBE) lub więcej (OLE, FRK, FEK, FEL)) (tabela 4) ich skuteczność w zmiataniu ROS oraz hamowaniu powstawania uszkodzeń DNA w naświetlanych fibroblastach Hs68 jest porównywalna z działaniem ochronnym tego antyoksydanta, co może wynikać z synergistycznego działania składników ekstraktów, albo też z mniejszej fotostabilności kwercetyny. Na przykład, ekstrakt z liści *Olea europaea*, miał silniejsze działanie przeciwutleniające niż sama oleuropeina ze względu na synergizm z innymi związkami fenolowymi obecnymi w ekstrakcie (Melguizo-Rodríguez i wsp., 2022). Zgodnie z dostępną wiedzą aktywność przeciwutleniająca OLE w fibroblastach naświetlanych promieniowaniem UVA została zbadana jedynie przez Czerwińską i wsp., (2016), którzy ustalili, stosując taką samą metodę jak w naszym badaniu (DCFH₂-DA), że wodne i etanolowe ekstrakty z liści *O. europaea* nie wykazywały istotnego hamowania produkcji ROS. Przyczyną tych rozbieżności mogą być różnice w składzie ekstraktów, ale też, co bardziej prawdopodobne, różnice w stabilności ich składników w obecności UV (Czerwińska i wsp., 2016). Podczas, gdy niskie stężenia ROS w komórkach pełnią istotną rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych, regulację proliferacji i różnicowania komórek, a także inicjowanie i utrzymywanie procesów przebudowy i regeneracji, wzrost stężenia ROS jest cytotoksyczny i indukuje apoptozę (Chen i wsp., 2019b). Zarówno w keratynocytach linii HaCaT, jak i w fibroblastach linii HPF obserwowano wyraźne zachwianie równowagi redoks natychmiast po naświetlaniu, przy użyciu dawek promieniowania UVA 10 i 50 J/cm², jednocześnie wykazano wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach fibroblastów w porównaniu z keratynocytami (Souza i wsp., 2020). Analiza uzyskanych w badaniach własnych wyników wskazuje, że skuteczność fotoochronnej aktywności ekstraktów (w zakresie redukcji poziomu ROS i uszkodzeń DNA, ale także innych badanych parametrów) jest porównywalna pomiędzy nimi. Mimo że poszczególne ekstrakty charakteryzowały się różnym składem, a

przede wszystkim obecnością różnych klas związków, które były w nich dominujące, przedstawiciele głównych grup dominujących (oleuropeina i luteolina, kwas chlorogenowy, kumaryny) posiadają grupy hydroksylowe w pozycji *orto*., co przynajmniej częściowo może wyjaśniać brak istotnych statystycznie różnic w aktywności fotoochronnej analizowanych ekstraktów. Związki aktywne, jak kwas kawowy i chlorogenowy zawarte w ekstrakcie *C. robusta* (Sulistiwati i wsp., 2022), oleuropeina zawarte w ekstrakcie z *Olea europaea* (Qabaha i wsp., 2017) oraz kumaryny z fenolowymi grupami hydroksylowymi w ekstraktach pochodzących z *Fraxinus sp.*, (Thuong i wsp., 2009), działają jako przeciwutleniacze, neutralizując ROS, chronią komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Castejón i wsp., 2020; Sulistiwati i wsp., 2022). Jako związki zawierające grupy hydroksylowe mają zdolność tworzenia wiązań z wolnymi rodnikami, dzięki czemu hamują ciąg reakcji rodnikowych wywołanych przez ROS. Skuteczność działania polifenoli jest skorelowana zarówno z liczbą jak i z położeniem grup -OH, przy czym najbardziej aktywne są związki, w których grupy -OH występują w pozycjo *orto* bądź *para* (Rice-Evans i wsp., 1996, Finotti i Di Majo, 2003). W podobnych badaniach, oleuropeina przeciwdziałała generowaniu ROS w komórkach śródbłonna, co wykazano w badaniach nad kontrolowaniem stresu oksydacyjnego po ekspozycji na H₂O₂ gdzie oleuropeina wykazywała aktywność wychwytywania rodników metodami z użyciem sondy fluorescencyjnej (H₂DCFDA) (Castejón i wsp., 2020). Badania przeprowadzone przez Nunes i wsp., w których komórki HaCaT traktowano ekstraktami wyizolowanymi z kilku produktów ubocznych przemysłu oliwy z oliwek, a następnie poddawano działaniu H₂O₂ lub promieniowaniu UVB wykazały, że ekstrakty te wykazują silne działanie antyoksydacyjne (Nunes i wsp., 2021). W obu warunkach stresu oksydacyjnego ekstrakty z oliwki redukowały produkcję ROS o ponad 80%. Należy jednak znów uwzględnić, że zawartość związków fenolowych i hydroksytyrozolu nie jest taka sama stąd różnice w wynikach otrzymywanych przez różne grupy badawcze (Nunes i wsp., 2021). Warto podkreślić, że silne hamowanie tworzenia uszkodzeń DNA przez wszystkie ekstrakty, jak i związki referencyjne (Ryc. 9), wynikające bezpośrednio z ich zdolności do zmiatania i/lub neutralizowania ROS, mogą także zależeć od ich oddziaływania na procesy naprawy DNA. W literaturze można znaleźć doniesienia, że niektóre polifenole chronią enzymy naprawy DNA przed utlenianiem, co zwiększa skuteczność mechanizmów naprawy DNA (Saewan i Jimtaisong, 2015).

Nadmierna produkcja ROS aktywuje w fibroblastach różne mechanizmy obronne kontrolujące status redoks w celu ochrony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Należą do nich małe cząsteczki wychwytyjące wolne rodniki, tj. witaminy A, C, E, tirole i enzymy

przeciwutleniające. Tioredoksyna jest białkiem zlokalizowanym głównie w cytoplazmie, które w odpowiedzi na stres oksydacyjny szybko przemieszcza się do jądra komórkowego. Ponadto w ludzkiej skórze wykazano obecność kilku reduktaz tioredoksyny, które należą do rodziny białek homodimerycznych, gdzie każdy monomer zawiera grupę prostetyczną FAD i miejsce wiązania NADPH. TrxR redukuje nadtlenek wodoru, nadtlarki lipidów i chinony. A także TrxR jest jednym z wielu celów transkrypcyjnych genu supresorowego guza p53 (Schallreuter i Wood, 2001). Badania własne wykazały, że promieniowanie UVA istotnie zmniejsza ekspresję TrxR1 (cytozolowej formy TrxR), natomiast ekspresja tego białka w fibroblastach pre-inkubowanych z ekstraktami z *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta*, jak również z QU, a następnie naświetlanych istotnie wzrastała osiągając poziom taki jak w komórkach kontrolnych nienaświetlanych (Ryc. 11), co sugeruje istotną rolę tego enzymu w działaniu fotoochronnym ekstraktów roślinnych (podobnie jak QU). To odkrycie jest zgodne z ostatnimi badaniami przeprowadzonymi przez Huanga i wsp., którzy wykazali znacznie zmniejszoną aktywność Trx i TrxR w ludzkich keratynocytach po naświetlaniu UVB (Huang i wsp., 2020), a ponadto, że ekstrakt z bambusa, *Acidososa longiligula*, hamował apoptozę indukowaną promieniowaniem UVB i wytwarzanie ROS poprzez regulację aktywności Trx1. Już wcześniejsze badania sugerowały, że układ Trx/TrxR jest jednym z pierwszych mechanizmów obronnych skóry przed produkcją ROS w odpowiedzi na promieniowanie UV (Schallreuter i Wood, 2001). Badania *in vitro* wskazują na potencjalną rolę hydroksytyrozolu i oleuropeiny w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym, przy czym hydroksytyrozol wykazuje silną zdolność wychwytywania wolnych rodników i zdolność do zwiększania poziomu enzymów antyoksydacyjnych, w tym reduktazy tioredoksyny (Alkhatib i wsp., 2018). Wyniki badań Ji i wsp., wskazują, iż dawka paracetamolu (300 mg/kg) zmniejsza ekspresję TrxR, podczas gdy kwas chlorogenowy (40 mg/kg) zwiększa ekspresję TrxR (Ji i wsp., 2013). Kwas chlorogenowy odwracał indukowany przez paracetamol spadek ekspresji mRNA i białka Trx, a także zwiększył ekspresję mRNA i białka TrxR1.

Apoptoza jest najlepiej scharakteryzowaną formą programowanej śmierci komórki ze względu na jej znaczenie w rozwoju, homeostazie i patogenezie wielu chorób, w tym fotostarzenia i nowotworów skóry. Komórki reagują na określone sygnały apoptotyczne, inicjując procesy wewnątrzkomórkowe, które skutkują serią zmian morfologicznych i biochemicznych, takich jak kurczenie się komórek, utrata potencjału błony mitochondrialnej, kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA. Jednym z wczesnych zdarzeń apoptotycznych jest eksternalizacja fosfatydyloseryny (PS) na zewnętrznej stronie

błony plazmatycznej. Aneksyna V, zależne od Ca^{2+} białko wiążące fosfolipidy o wysokim powinowactwie do PS, wiąże się z eksponowaną apoptotyczną powierzchnią PS komórki. Dlatego aneksyna V skoniugowana z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) służy jako czuła sonda do analizy metodą cytometrii przepływowej zachodzących w komórkach apoptozy. W przeprowadzonym badaniu określono odsetek fibroblastów apoptotycznych, charakteryzujących się eksternalizacją PS i wykazano, że preinkubacja z ekstraktami roślinnymi w znacznym stopniu (o ponad 50% w porównaniu z komórkami nietraktowanymi ekstraktami) zapobiegała apoptotycznej śmierci fibroblastów Hs68 (Ryc. 13). W dalszym etapie zbadano udział kaspazy-3, -8 i -9 w hamowaniu przebiegu apoptozy indukowanej UVA w komórkach Hs68. Kaspazy to proteazy cysteinowe o podobnych sekwencjach aminokwasowych i II-rzędowych strukturach białkowych. Kaspazy mogą blokować cykl komórkowy, znakować komórki apoptotyczne, rozkładać białka strukturalne cytoszkieletu i dezaktywować białka biorące udział w naprawie DNA, prowadząc do apoptozy (Chen i wsp., 2020). Aktywacja kaspaz, w tym kaspazy-9/-8/-3 ma kluczowe znaczenie dla indukcji apoptozy w naświetlanych fibroblastach skóry (Hwang i wsp., 2019). Zgodnie z tym doniesieniem, nasze wyniki wykazały około 4-krotny wzrost aktywnej kaspazy-8 i -3 i prawie 6-krotny wzrost aktywnej kaspazy-9 w fibroblastach naświetlanych dawką 8 J/cm^2 . Wyniki te sugerują, że zarówno wewnętrzne, jak i zewnętrzne szlaki apoptozy wydają się być aktywowane po stymulacji UVA. Ponadto wyniki pokazują, że w fibroblastach wstępnie inkubowanych z ekstraktami, aktywność wszystkich trzech kaspaz była znacząco zahamowana, przy czym hamujący wpływ był zależny od stężenia. Co ciekawe, przy zastosowanym wysokim stężeniu ekstraktu z *O. europaea* ($25 \mu\text{g/ml}$) aktywność kaspazy-9, w przeciwieństwie do kaspazy -8, która była słabiej hamowana, została obniżona aż o 80% ($p < 0,001$) i porównywalnie działały pozostałe ekstrakty (Ryc. 14), a aktywność kaspazy-3 została zahamowana o ponad 60% ($p < 0,001$) w przypadku ekstraktu z *F. rhynchophylla*, *O. europaea* i *C. robusta*. Referencyjne przeciwutleniacze, kwercetyna i kwas askorbinowy, wykazywały porównywalne efekty. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest stwierdzenie, iż badane ekstrakty roślinne posiadają właściwości antyapoptotyczne, ograniczając proces apoptozy na obu szlakach z tym, że bardziej skutecznie na szlaku wewnątrzpochodnym (mitochondrialnym). Wcześniej Salucci i wsp. wykazali aktywację wewnętrznych i zewnętrznych szlaków apoptozy w ludzkich keratynocytach naświetlanych UVB oraz ich obniżenie, gdy komórki były preinkubowane z przeciwutleniaczami (tj. hydroksytyrozol) (Salucci i wsp., 2014) Wewnętrzny apoptotyczny szlak sygnałowy może być indukowany przez nadmierną produkcję ROS i jest odpowiedzialny za otwieranie porów

w błonie mitochondrialnej, co prowadzi do uwolnienia cytochromu c (Elmore, 2007). Zmniejszenie lub utrata potencjału błony mitochondrialnej jest wczesnym etapem apoptozy, a uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytozolu dodatkowo przyczynia się do indukcji apoptozy poprzez aktywację kaspaz, rozszczepiających białka krytyczne dla przeżycia i wzrostu komórek (Hwang i wsp., 2019). Wśród nich kaspaza-3 jest kaspazą wykonawczą, a jej aktywacja uważana jest za jedną z biochemicznych cech charakterystycznych apoptozy. W porównaniu z kontrolą, działanie UV znacznie zwiększyło aktywność kaspazy-3 w komórkach linii HDF (Hwang i wsp., 2019). Cytochrom c wraz z cytoplazmatycznym APAF-1 uczestniczy w aktywacji kaspazy-9. Na podstawie wyników badań własnych stwierdzono, że aktywność kaspazy-9 jest najbardziej hamowana, co jest uzasadnione, gdyż ekstrakty mogą zmniejszać szybkość apoptozy fibroblastów poprzez zmniejszanie poziomu uszkodzeń DNA i hamowanie wytwarzania ROS, dwóch głównych czynników odpowiedzialnych za indukcję apoptozy. W badaniach innych autorów ekstrakt fenolowy z oliwy z oliwek wyraźnie hamował aktywność kaspazy-9, indukowanej pod wpływem warunków stresowych (traktowanie H_2O_2). Zatem związki fenolowe są zdolne do zapobiegania uszkodzeniom DNA – działanie ochronne wynika głównie z antyoksydacyjnej aktywności związków fenolowych (Erol-Dayi i wsp., 2012). Komórki PC-12 wstępnie potraktowane kwasem kawoilochinowym (CQA, 10 mM) wykazywały znaczną supresję (około 50%) indukowanej przez H_2O_2 aktywacji kaspazy-9, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (traktowanymi H_2O_2). CQA może hamować aktywację kaspazy-9 poprzez ochronę integralności błony mitochondrialnej, chroniąc przed uwalnianiem cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (Park, 2013).

Komórki starzejące się wykazują powiększony i spłaszczony kształt oraz podwyższoną aktywność β -galaktozydazy (SA- β -gal) związanej ze starzeniem, która jest głównym markerem stosowanym do identyfikacji starzejących się komórek w hodowlach i tkankach. Ponieważ w starzejących się komórkach dochodzi do zatrzymania wzrostu, regulatory cyklu komórkowego, takie jak p16INK4a, p21CIP1 i p53, są też powszechnie stosowane do wykrywania starzejących się komórek (Wang i Dreesen, 2018). Komórki skóry (fibroblasty, keratynocyty) ekspozycje na promieniowanie UVB, wykazują wzrost poziomu uszkodzeń DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego i ekspresję biomarkerów starzenia, takich jak zwiększona aktywność SA- β -gal, aktywacja p16INK4a, p21CIP1, p53 i obniżenie poziomu lamin B1. *In vivo* przewlekła ekspozycja na niskie dawki UVB spowodowała nagromadzenie uszkodzeń DNA i starzejących się komórek w naskórku myszy, ale nie w skórze właściwej, zmniejszenie liczby komórek macierzystych w mieszkach włosowych

i akumulację p21CIP1 w naskórku i regionie komórek macierzystych mieszków włosowych (Wang i Dreesen, 2018). Poziom β -galaktozydazy związanej ze starzeniem wzrasta wraz z liczbą podziałów komórkowych, co wykorzystuje się do oceny starzenia komórkowego. Zaobserwowany ponad 4-krotny wzrost aktywności β -galaktozydazy (Ryc. 15) sugeruje, że komórki Hs68 wchodzą w proces fotostarzenia pod wpływem naświetlania UVA. Efektywnym działaniem fotoochronnym charakteryzowały się poddane analizie oba ekstrakty z kory jesionów, ale przede wszystkim ekstrakt z *C. robusta* w przypadku, którego odnotowano obniżenie odsetka komórek SA- β -gal-pozytywnych do ok. 15%, w porównaniu z kontrolą (UVA). Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie wykazały, że starzenie się może radykalnie zmienić funkcję komórki. Na przykład starzejące się komórki modulują swoje środowisko poprzez wydzielanie zapalnych cytokin, chemokin, MMPs i czynników wzrostu, zbiorczo określanymi jako fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem (SASP). Badania przeprowadzone ostatnio przez Jia i wsp., wykazały, że dawka promieniowania UVA 10 J/cm² prowadzi do 11-krotnego zwiększenia populacji starzejących się fibroblastów w odniesieniu do grupy kontrolnej (Jia i wsp., 2023). Porównując z badaniami własnymi, różnice w krotności wzrostu populacji starzejących się fibroblastów pod wpływem podobnej dawki promieniowania UVA mogą zależeć od stadium życiowego i metabolicznego komórek stosowanych w obu badaniach, jak i różnic w warunkach doświadczalnych. W badaniach cytowanych autorów naświetlanie UVA silnie indukowało wzrost odsetka komórek SA- β -gal-pozytywnych (23,07%), podczas gdy galusan epigallokatechiny (EGCG) redukował prawie 2-krotnie odsetek starzejących się fibroblastów (Jia i wsp., 2023). We wcześniejszych badaniach także wykazano, podobną metodą poprzez pomiar aktywności SA- β -gal, ochronną rolę hydroksytyrozolu w procesie starzenia fibroblastów skóry wywołanego promieniowaniem UVA (Jeon i Choi, 2018).

Widocznym skutkiem nadmiernej (najczęściej wieloletniej) ekspozycji skóry na promieniowanie UVA jest elastozą, definiowaną jako zaburzenia struktury i funkcji elastyny, która może być konsekwencją upośledzonej produkcji włókien elastyny i fibryliny, zwiększonej degradacji elastyny przez MMPs wydzielane przez naświetlane/starzejące się komórki lub bezpośrednią konsekwencją ekspozycji na promieniowanie UV (Wang i Dreesen, 2018). Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich kilku lat wykazały, że promieniowanie UV powoduje wzrost poziomu, co najmniej trzech różnych typów MMPs w ludzkiej skórze, tj. MMP-1, MMP-3 i MMP-9) (Pittayapruek i wsp., 2016). Ekspresja tych trzech MMPs jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny AP-1, który ulega aktywacji pod wpływem promieniowania UV. MMPs odgrywają kluczową rolę w degradacji ECM, przy czym

MMP-1, MMP-3 i MMP-9 rozkładają większość składników ECM w skórze właściwej, powodując utratę elastyczności skóry. MMP-1 jest główną przyczyną fotostarzenia, ponieważ enzym ten rozkłada kolagen typu I syntetyzowany przez fibroblasty (Mao i wsp., 2015). Wykazano, że eksponowane na działanie UVA fibroblasty Hs68 wykazują znaczący wzrost poziomu ekspresji wszystkich trzech analizowanych metaloproteinaz, przy czym największy wzrost ekspresji (2,3-krotny) wykazano dla MMP-9 (Ryc. 16). Ogólnie uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, gdzie po naświetlaniu komórek linii Hs68 promieniowaniem UVA o mniejszej dawce niż w badaniach własnych (5 J/cm²) znacząco wzrósł poziom MMP-1 do 223%, MMP-3 do 115% oraz MMP-9 do 185% (Lin i wsp., 2022). Niewielkie różnice pomiędzy badaniami (m.in. największy wzrost MMP-1 w badaniach Lin i wsp.) prawdopodobnie wynikają z zastosowania innych metod oznaczania poziomu MMPs, cytowani autorzy określali ekspresję enzymów półilościową metodą Western blottingu. Traktowanie fibroblastów ekstraktami roślinnymi, z *C. robusta* oraz kory *F. excelsior* i *F. rhynchophylla*, znacząco obniżyło produkcję analizowanych metaloproteinaz w fibroblastach Hs68 poddanych działaniu promieniowania UVA (Ryc. 16). Poszczególne ekstrakty działały z podobną skutecznością, porównywalną z kwercetyną, przy czym najsilniejsze hamowanie zaobserwowano w przypadku ekspresji MMP-1. Zdolności hamujące ekspresję MMPs przez ekstrakty z kory jesionów należy przypisać przede wszystkim obecności kumaryn, które w ekstrakcie z kory *F. rhynchophylla* były składnikiem dominującym (238,95 mg/g), gdzie stanowiły ponad 85% ogółu oznaczonych ilościowo metabolitów (Tabela 8). W badaniach Garg i wsp. stwierdzono, że wstępne traktowanie aktywowanych H₂O₂ komórek HaCaT eskuletyną, w stężeniu 5 µg/ml, hamowało ekspresję MMP-1 (Garg i wsp., 2020). Badania przeprowadzone przez Chiang i wsp., w których oceniano potencjał ekstraktów z liści kawy (*Coffea arabica*) i jej hydrolizatów na hamowanie ekspresji MMPs i elastazy w indukowanych promieniowaniem UVB w fibroblastach ludzkich (Chiang i wsp., 2011) wykazały zdolność do redukcji MMP-1, MMP-3 oraz MMP-9, podobnie jak w badaniach własnych. Co ciekawe, ekstrakty z liści kawy były w stanie przywrócić poziom prokolagenu typu I (prekursor kolagenu) aż w 60% w porównaniu z kontrolą UV. Podobne właściwości w warunkach *in vitro* obserwowano również przy użyciu ekstraktów z ziaren kawy i z fusów z kawy (Carvalho Neto i wsp., 2021). Te spostrzeżenia potwierdzają, że ekstrakty charakteryzujące się dużą zawartością kwasów chlorogenowych (w przypadku ekstraktu z *C. robusta* aż ponad 60%) skutecznie chronią przed promieniowaniem UV. Regulacja ekspresji MMPs indukowanych promieniowaniem UV i jej poprzedzających szlaków jest ważna w przeciwdziałaniu fotostarzeniu skóry (Noh,

2022). W związku z tym kontrolowana ekspresja MMPs i produkcji kolagenu może służyć zapobieganiu fotostarzeniu. Udokumentowane to zostało poprzez badania Karadeniz i wsp., którzy wykazali, że hamowanie czynnika transkrypcyjnego AP-1, hamuje wytwarzanie MMP-1 indukowane przez UVA (Karadeniz, 2020).

Kolejny etap badań, których celem było określenie udziału ekstraktów roślinnych w modulacji szlaków sygnałowych uczestniczących w odpowiedzi na promieniowanie UVA, przeprowadzono na wytypowanych trzech ekstraktach, z nasion kawy i z kory obu gatunków jesionów. Naświetlanie fibroblastów prowadzi do fosforylacji i aktywacji transkrypcyjnych czynników pro- i antyapoptotycznych, w tym p53 (Ivanov i Ronai, 2000). Jednocześnie wzrost poziomu ROS generuje uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA, m.in. wytworzenie 8-oksoGua, która promuje ekspresję białka p53, zwiększając tym samym ekspresję białek p21 i p16, co powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego (Jiang i wsp., 2020; Lee i wsp., 2022). Białko p53 bierze udział w procesach komórkowych, takich jak apoptoza, martwica, starzenie i autofagia, a także jest głównym elementem szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA. W naszym modelu naświetlaniu fibroblastów Hs68 promieniowaniem UVA towarzyszył znaczny wzrost ekspresji p53 (4-krotnie zwiększony poziom ekspresji białka p53) (Ryc. 17). Natomiast badane ekstrakty znacząco hamują ekspresję białka p53, aktywowanego pod wpływem UVA. Wyniki te wskazują na potencjał badanych ekstraktów do ochrony przed stresem oksydacyjnym oraz genotoksycznym. We wcześniejszych badaniach innych autorów zdolność hamowania ekspresji p53 w sposób zależny od stężenia wykazywał hydroksytyrozol (HT) (Carrara i wsp., 2021), także Utami i wsp., wykazali hamowanie ekspresji p53 przez HT w komórkach HaCaT, co może wynikać z tego, że związek ten zmniejszał ilość uszkodzeń DNA generowanych przez promieniowanie UV (Utami i wsp., 2020).

NFκB jest kompleksem białkowym, który może być aktywowany przez różne stymulatory, takie jak ROS i promieniowanie UV. Aktywowane podjednostki NFκB są przemieszczane do jądra i indukują ekspresję cytokin prozapalnych. Ponadto aktywacja NFκB może indukować ekspresję MMPs (Ding i wsp., 2020). W kolejnym etapie zbadaliśmy wpływ ekstraktów na ekspresję NFκB w komórkach Hs68 indukowanych UVA. Zaobserwowaliśmy, że traktowanie badanymi ekstraktami z kory *F. excelsior* i *F. rhynchophylla* oraz *C. robusta* w najwyższym badanym stężeniu znacząco hamowało indukowaną pod wpływem UVA aktywację NFκB. Wyniki te wskazują, że badane ekstrakty hamują ekspresję NFκB, powodując tym samym obniżenie poziomu cytokin prozapalnych i ekspresję MMPs. Wyniki sugerują, że mechanizm za pomocą, którego badane związki hamują fotostarzenie indukowane UVA w fibroblastach skóry linii Hs68, może być związany z regulacją szlaków

NFκB, AP-1 oraz p38. Ekstrakty roślinne modulują szlak zapalny poprzez hamowanie fosforylacji NFκB i zapobieganie jego translokacji do jądra, co jest niezbędne do transkrypcji mediatorów prozapalnych odpowiedzialnych za procesy zapalne. Dotychczasowe dane pokazują, że podczas stanu zapalnego czynnik jądrowy κB (NFκB), inicjuje transkrypcję genów wielu cytokin zapalnych. Wykazano, że HT hamuje ekspresję NFκB i p53 w komórkach HaCat. HT wpływając na regulatory NFκB (w tym IκBα oraz IKKβ), hamując ich aktywność indukowaną przez TNFα. To z kolei skutkuje wyłączeniem szlaku sygnałowego NFκB i ograniczenie produkcji cytokin prozapalnych (Utami i wsp., 2020). Podobnie Melguizo-Rodríguez i wsp. wykazali zmniejszony poziom jądrowego NFκB pod wpływem HT i oleuropeiny w naświetlonych fibroblastach (linia NHDF), podkreślając w ten sposób zdolność modulowania procesu zapalnego związanego ze starzeniem (Melguizo-Rodríguez i wsp., 2022). Różne stresory, w tym promieniowanie UV, mogą aktywować odpowiedź na uszkodzenie DNA, która może inicjować zatrzymanie cyklu komórkowego poprzez szlak p53/p21, obejmujący kaskadę p38/MAPK i szlak NFκB (Ansary i wsp., 2021). Wyniki przeprowadzonych badań korelują z danymi literaturowymi, wskazując na istotny wzrost poziomu NFκB pod wpływem działania promieniowania UV. Natomiast głównie działanie antyoksydacyjne badanych ekstraktów roślinnych/głównych związków wpływa na zdolność ochrony komórek poprzez modulowanie szlaku zapalnego związanego z czynnikiem NFκB.

Transbłonowe białko Klotho, znane również jako hormon przeciwstarzeniowy, chroni przed różnego rodzaju stresorami (Ansary i wsp., 2021). Zmniejszona produkcja tego białka obserwowana jest podczas procesu starzenia się. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w ludzkim genie Klotho są związane ze zmienioną długością życia, jednak molekularne podstawy tego procesu nie zostały jeszcze dokładnie określone (de Oliveira, 2006). Klotho jest białkiem transbłonowym, a jego funkcja jest prawdopodobnie zależna od szlaku sygnałowego TLR4/NFκB. Dodatkowo Klotho może zapobiegać translokacji NFκB, prowadząc do hamowania szlaku prozapalnego NFκB (Bocheva i wsp., 2022; Ansary i wsp., 2021). Celem oceny poziomu białka o działaniu przeciwstarzeniowym, określono wpływ promieniowania UVA oraz ekstraktów roślinnych na fibroblasty Hs68 pod kątem ekspresji białka Klotho. Przeprowadzone badania wskazują, że preinkubacja komórek Hs68 z badanymi ekstraktami wpływa na zwiększoną ekspresję białka Klotho, zapobiegając przedwczesnemu starzeniu się komórek skóry (Ryc. 19), wzrost ekspresji białka Klotho wskazuje na działanie fotoochronne ekstraktów. Promieniowanie UV powoduje spadek ekspresji mRNA i białka Klotho wraz ze zwiększoną ekspresją cytokin prozapalnych (IL1β

i IL-6, TNF α) w komórkach HaCaT. Co więcej nadekspresja Klotho w ludzkich keratynocytach zmniejszyła wywołane promieniowaniem UV uszkodzenia komórek i stan zapalny wywołany ROS (Ansary i wsp., 2021). Klotho skutecznie chroni komórki HaCaT przed uszkodzeniami powodowanymi przez promieniowanie UVB, m.in., przez hamowanie apoptozy. Badania mechanizmu molekularnego wykazało, że nadekspresja Klotho zmniejszała aktywność kaspazy-3. W ochronie komórek przed UVB przez nadekspresję Klotho najprawdopodobniej pośredniczy hamowanie aktywności NF- κ B. Zatem Klotho jest związane z aktywacją NF- κ B w różnych typach komórek, gdzie odgrywa ważną rolę w hamowaniu NF κ B (Zhang i wsp., 2018).

Wywołany przez promieniowanie UVA wzrost ekspresji MMP-1 jest regulowany w głównej mierze przez aktywację AP-1 i NF κ B, które to podlegają regulacji przez MAPK, przy czym ta pierwsza jest wynikiem odpowiedzi zapalnej skóry wywołanej promieniowaniem UV. Z drugiej strony, aktywność transkrypcyjna AP-1 jest regulowana za pośrednictwem p38, ERK i JNK, przez fosforylację c-Fos i c-Jun, które tworzą kompleks z AP-1. Dlatego kaskada sygnalizacyjna MAPK odgrywa kluczową rolę w ekspresji MMP indukowanej UVA (Oh i wsp., 2020). Przeprowadzone badania wykazały, że promieniowanie UVA powoduje 2-krotny wzrost ekspresji AP-1 w porównaniu do komórek kontrolnych, przy czym zastosowane ekstrakty roślinne istotnie obniżają poziom białka AP-1 (Ryc. 20). Zmniejszony poziom czynników stresowych nie kieruje komórek na szlaki apoptozy, co wpływa na przeżywalność komórkową. Sugerować to może, iż ekstrakty obniżają poziomy jądrowych, aktywowanych c-Fos i c-Jun, jako mechanizm hamowania indukowanych przez UVA aktywności transkrypcyjnych prowadzących do produkcji MMPs. Zdolność taką wykazuje, m.in. eskulina, co zostało potwierdzone przez Choi i wsp., którzy wykazali, że eskulina obniża aktywność AP-1 poprzez hamowanie tworzenia kompleksu heterodimeru c-Fos i c-Jun, w stymulowanych LPS komórkach RAW264.7 (Choi i wsp., 2012). Ponadto eskuletyna hamowała indukowaną przez H₂O₂ aktywację AP-1 (Zhen i wsp., 2019). Podobnie zostało wykazane wobec ekstraktu z *C. arabica*, w fibroblastach traktowanych promieniowaniem UVB, który posiadał zdolność hamowania AP-1, na skutek hamowania c-Fos i c-Jun (Chiang i wsp., 2011). Traktowanie komórek JB6 przed naświetleniem kwasem chlorogenowym hamowało aktywację AP-1 i NF κ B, wywołaną UVB. Dodatkowo kwas chlorogenowy posiada zdolność ograniczania fosforylacji JNK, p38 i ERK indukowanych promieniowaniem UV (Chiang i wsp., 2015). Zatem hamowanie aktywności transkrypcyjnej NF κ B i AP-1 uważa się za kluczową strategię zapobiegania zapaleniu i fotostarzeniu związanemu z promieniowaniem UVA (Balupillai, 2020). Podsumowując ten etap badań

wykazano, iż ekstrakty roślinne zwiększają przeżywalność komórek Hs68 po naświetlaniu ograniczając proces apoptozy poprzez hamowanie ekspresji białka p53 i AP-1 oraz czynnika transkrypcyjnego NFκB, a także poprzez aktywację białka Klotho, odpowiadającego za spowolnienie procesów fotostarzenia.

Promieniowanie UV inicjuje stan zapalny poprzez uwalnianie z warstwy rogowej naskórka cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, a także stymulację syntezy i uwalniania TNFα z keratynocytów. Te dwie podstawowe cytokiny mogą z kolei indukować syntezę innych cytokin prozapalnych w odpowiedzi na promieniowanie UV (Auh i Madhavan, 2021). Cytokiny prozapalne, takie jak TNFα, IL1β i IL-6, odgrywają ważną rolę w odpowiedzi zapalnej, a także indukują ekspresję MMP-1. Poziomy ekspresji TNFα, IL1β i IL-6, były znacząco zwiększone w komórkach HDF poddanych działaniu UVA (Ding i wsp, 2020; Leyva-Lópe i wsp., 2016). Do tego etapu badań wykorzystano PBMCs, a celem była analiza właściwości przeciwzapalnych ekstraktów roślinnych poprzez określenie ich wpływu na poziomy wydzielania TNF-α i IL-2. IL-2 nie jest zaliczana do cytokin prozapalnych, uczestniczących w inicjacji reakcji zapalnej, ale jest cytokiną istotną w odpowiedzi immunologicznej i najważniejszą cytokiną limfocytów T pobudzającą ich wzrost. W pierwszym etapie użyto konkanawaliny A (Con A) do stymulacji PBMCs. Con A jest mitogenem niezależnym od antygeny, często używanym jako substytut komórek prezentujących antygen w eksperymentach stymulacji limfocytów T. Zaobserwowaliśmy, że ekstrakty, podobnie jak indometacyna, referencyjny silny niesteroidowy lek przeciwzapalny, znacznie hamowały (o ponad 90%, $p < 0,001$) stymulowane przez Con A wydzielanie TNF-α (Ryc. 22). Promieniowanie UVA (8 J/cm^2) wyraźnie zwiększyło poziom wydzielanego TNF-α, a efekt stymulujący był porównywalny z działaniem Con A (Ryc. 22). Dalsze eksperymenty wykazały, że wydzielanie obu cytokin TNF-α (Ryc. 23) oraz IL-2 (Ryc. 24) było istotnie hamowane w PBMCs stymulowanych UVA (8 J/cm^2) przez traktowanie ekstraktami odpowiednio w stężeniu $25 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$). W przypadku IL-2 największy wpływ na zmniejszenie w przybliżeniu o 50% ($***p < 0,001$) sekrecji IL-2 w PBMCs, stymulowanych UVA wykazują ekstrakt z kory *F. rhynchophylla* oraz liści *O. europaea* (Ryc. 24). Przeprowadzone badania wykazały hamowanie sekrecji czynnika TNF-α w PBMCs o ok. 40% względem kontroli. Zauważalny efekt hamujący nie był jednak tak silny jak w przypadku stymulacji Con A, co może wynikać z różnych mechanizmów odpowiedzialnych za wydzielanie cytokin. Otrzymane wyniki dowodzą przeciwzapalnej aktywności analizowanych ekstraktów roślinnych. Można to wytłumaczyć synergicznym i addytywnym

działaniem głównych grup badanych ekstraktów, tj. saponin, flawonoidów, kwasów fenolowych i kumaryny (Kozachok i wsp., 2022).

Uważa się, że uwalnianie cytokin prozapalnych przez naświetlone komórki skóry jest spowodowane fotouszkodzeniami DNA charakterystycznymi dla promieniowania UV, CPD (UVA i UVB) i 6-4PP (UVB). W zależności od poziomu uszkodzeń DNA mechanizmy komórkowe mogą prowadzić do szlaków naprawy DNA bądź skierować komórkę na drogę apoptozy (Saewan, 2022; Bocheva i wsp., 2022; Ansary i wsp., 2021). Dodatkowo wiadomo, że ROS generowane przez promieniowanie UV stymulują uwalnianie interleukin i TNF α z komórek, które aktywują szlak MAPK i NF κ B, a tym samym wytwarzają MMPs, co powoduje degradację kolagenu (Shah i Mahajan, 2013; Saewan, 2022; Garg i wsp., 2020; Balupillai i wsp., 2020). Po ekspozycji na promieniowanie UV w keratynocytach oraz fibroblastach skóry gromadzą się interleukiny: IL-1 i IL-18, które przyczyniają się do stanu zapalnego oraz wzrostu poziomu innych interleukin zapalnych, jak IL-6, IL-8, IL-10, IL-15 i TNF α (Low i wsp., 2021; Saewan, 2022).

Ekstrakty roślinne, które cechuje wielocelowość działania ze względu na zawartość różnych grup składników, są silnymi modulatorami cytokin. Polifenole, główna i zróżnicowana grupa składników ekstraktów roślinnych hamują produkcję TNF α , IL1 β i IL-6, w której pośredniczy NF κ B (Ulrich-Merzenich i wsp., 2017). Dostępne dane wskazują, że eskuletyna hamowała ekspresję cytokin prozapalnych (TNF α , IL1 β i IL-6) w keratynocytach HaCaT (Jeong i wsp., 2018). Natomiast Calabriso i wsp., stwierdzili supresję TNF α pod wpływem działania HT na modelu komórkowym HUVEC oraz THP-1 (Calabriso i wsp., 2018). Odnotowano również hamowanie ekspresji interleukin (ILs) przez HT. Wykazano, że HT wykazuje działanie hamujące wytwarzanie IL-6 i IL-8 w indukowanych UVA fibroblastach skóry (Utami i wsp., 2020). W badaniach przeprowadzonych przez Ha i wsp. naświetlanie keratynocytów HaCaT promieniowaniem UVB (25 mJ/cm²) gwałtownie zwiększyło poziom TNF α w ciągu 48 godzin po naświetlaniu. Traktowanie komórek różnymi frakcjami wyizolowanymi z 80% ekstraktu etanolowego z liści oliwki wykazało najsilniejszy efekt hamujący wydzielanie TNF α (o ponad 55%) przez frakcję butanolową (o dużej zawartości oleuropeiny 32.47 \pm 0.25 mg/100g). Natomiast sam 80% ekstrakt etanolowy (zawierający tylko 4.21 \pm 0.57 mg oleuropeiny) nie hamował wydzielania TNF α (Ha i wsp., 2009). Również kwas chlorogenowy, główny składnik aktywny *C. robusta*, wykazuje działanie przeciwzapalne, poprzez hamowanie cytokin prozapalnych oraz zmniejszanie ekspresji COX-2 i iNOS. Obserwowano spadek poziomu wydzielanych czynników prozapalnych TNF α , IL1 β i IL-6, a także COX-2 i tlenu azotu

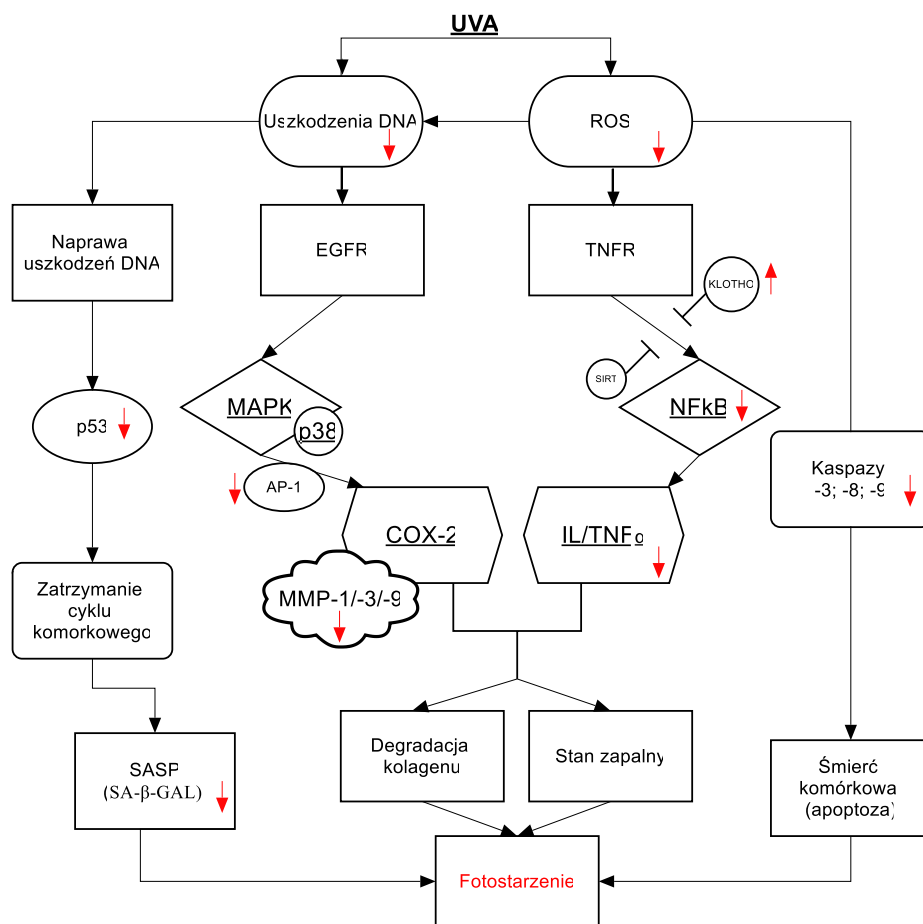
w komórkach makrofagów traktowanych CGA i stymulowanych LPS (Rodrigues i wsp., 2023).

Skuteczność ochrony preparatu przeciwsłonecznego przed promieniowaniem UV-B może być określona za pomocą współczynnika ochrony przeciwsłonecznej (SPF, ang. sun protection factor), który jest definiowany jako iloraz energii UV wymaganej do wytworzenia minimalnej dawki rumienia (MED, ang. minimal erythema dose) na chronionej skórze, do energii UV wymaganej do wytworzenia MED na skórze niechronionej. MED to dawka promieniowania UV powodująca wytworzenie rumienia (zaczernienie wynikające z obrzęku naczyń włosowatych) na skórze w okresie kilku godzin po ekspozycji. SPF może być oznaczany metodami *in vivo* lub *in vitro*, w tym drugim typie metod określa się właściwości absorpcyjne środków przeciwsłonecznych na podstawie analizy spektrofotometrycznej rozcieńczonych roztworów (Fourneron i in., 1999; Mansur i in., 1986; Pissavini i in., 2003; Walters i in., 1997). Analiza wartości SPF wykazała, że ekstrakty roślinne ze względu na zbyt niski SPF nie mogą pełnić roli filtrów przeciwsłonecznych samodzielnie, jednak ekstrakty z kory jesionów oraz nasion *C. robusta* wykazują pewien stopień ochrony, więc mogłyby funkcjonować jako mniej szkodliwe substancje zamiennie filtrów chemicznych razem z filtrami mineralnymi, co stanowi dodatkowy atut do wykazanych właściwości fotoochronnych przed promieniowaniem UVA.

Naturalne produkty pochodzenia roślinnego są interesującą alternatywą dla przemysłu kosmetycznego wykorzystującego głównie metody chemii syntetycznej przy produkcji produktów kosmetycznych (Sarfraz i wsp., 2017). Z ekonomicznego punktu widzenia wykorzystywanie wszelkich zasobów naturalnych, w tym produktów odpadowych, przez producentów branży kosmetycznej jest bardzo korzystne. Zarówno oliwka europejska (*O. europaea*) jak i jesiony (*F. excelsior*, *F. rhynchophylla*) są roślinami, które mają duże znaczenie gospodarcze, jednocześnie wykazują szereg korzyści zdrowotnych, jakie można uzyskać ze stosowania wszelkich ich produktów ubocznych (Ha i wsp., 2009, Martínez-Gil i wsp., 2018). Oliwka jest surowcem w produkcji oliwy, natomiast liście oliwki, które zawierają więcej polifenoli niż oliwa, są produktem odpadowym podczas zbioru oliwek i przycinania drzew oliwnych. Cenne właściwości drewna jesionów znajdują zastosowanie w przemyśle stolarskim (m.in. do fornirowania), w produkcji artykułów sportowych (uchwytów, lin, wiosł, części pojazdów, kijów bejsbolowych, kajaków), czy jako drewno bednarskie. Kora i liście jesionów to produkty odpadowe, które są już od dawna wykorzystywane jako surowiec zielarski. Kawa jest jednym z najpopularniejszych napojów i ważnym składnikiem diety, o czym świadczy wysoki poziom jej spożycia na całym świecie,

w skali globalnej jest jednym z najważniejszych towarów spożywczych. „Zielona” kawa i jej ekstrakt są źródłem przeciwutleniaczy o potwierdzonych właściwościach biologicznych (Bosso i wsp., 2021).

Korzyści zdrowotne ze stosowania ekstraktu z liści oliwki i ekstraktu z ziaren „zielonej” kawy są dość dobrze poznane, ale ich potencjał fotoochronny został w małym stopniu zbadany. Choć liczne badania wykazały korzystne działanie kwasów chlorogenowych oraz różnych pochodnych irydoidów i kumaryn (dominującej grupy związków w składzie ekstraktów z jesionów) w profilaktyce starzenia się skóry i fotostarzenia, w przedstawionych w tej pracy badaniach po raz pierwszy wykazano fotoochronne działanie ekstraktów z kory i liści *F. excelsior*, kory *F. rhynchophylla*, liści *O. europaea* oraz nasion niepalonej kawy (*C. robusta*) przed szkodliwymi skutkami działania promieniowania UVA. W świetle rosnących potrzeb opracowania ulepszonych strategii zapobiegania fotostarzeniu skóry oraz profilaktyki nowotworów skóry identyfikacja nowych, tanich surowców, które są źródłem cennych naturalnych składników roślinnych o udowodnionym działaniu fotoochronnym może pomóc w projektowaniu bardziej skutecznych i bezpiecznych preparatów przeciwsłonecznych. Synergistyczne działanie związków chemicznych występujących w ekstraktach roślinnych często nadaje im silniejsze działanie przeciwutleniające w porównaniu z wyizolowanym składnikiem (lub grupą związków dominujących), co czyni je wyjątkowo atrakcyjnym przedmiotem badań.



Ryc. 25. Wpływ analizowanych ekstraktów roślinnych na główne szlaki sygnałowe zaangażowane w fotostarzenie za pośrednictwem UVA (opracowanie własne na podstawie Ansary i wsp., 2021); (↑ – oznacza aktywację danego czynnika przez badane ekstrakty; ↓ – oznacza hamowanie danego czynnika przez badane ekstrakty).

11. Podsumowanie wyników

- Wszystkie analizowane ekstrakty roślinne (z kory i liści *F. excelsior*, kory *F. rhynchophylla*, liści *O. europaea* oraz nasion *C. robusta*) nie są cytotoksyczne wobec fibroblastów Hs68, w stężeniach stosowanych w doświadczeniach,
- ekstrakty z *F. excelsior*, *F. rhynchophylla*, *O. europaea* oraz *C. robusta* charakteryzują się mniejszą całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w odniesieniu do związków referencyjnych (kwercetyny i rutyny), ekstrakt z nasion kawy wykazuje najwyższą, spośród analizowanych ekstraktów, zdolność do redukcji jonów żelaza, jak i rodnika DPPH^{*},
- pre-inkubacja (24h) ze wszystkimi analizowanymi ekstraktami zmniejsza wewnątrzkomórkowy poziom ROS i poziom uszkodzeń DNA wpływając na zwiększoną przeżywalność fibroblastów Hs68 poddanych działaniu UVA (8 J/cm²),
- skuteczność zmiatania ROS oraz hamowania uszkodzeń DNA w naświetlanych fibroblastach Hs68 jest porównywalna z działaniem fotoochronnym kwercetyny, co może wynikać z synergistycznego działania składników ekstraktów, albo też z mniejszej fotostabilności kwercetyny,
- silne hamowanie tworzenia indukowanych promieniowaniem UVA uszkodzeń DNA przez wszystkie ekstrakty, jak i związki referencyjne, wynika bezpośrednio z ich zdolności antyoksydacyjnych, ale nie można wykluczyć innych mechanizmów (zgodnie z danymi literaturowymi mogą także zależeć od oddziaływania na procesy naprawy DNA),
- wzrost poziomu ekspresji TrxR po traktowaniu fibroblastów Hs68 badanymi ekstraktami i poddanych działaniu promieniowania UVA wskazuje na istotną rolę układu Trx/TrxR w mechanizmie działania fotoochronnego ekstraktów roślinnych, poprzez regulację procesów redox,
- wzrost aktywności β -galaktozydazy sugeruje, że komórki Hs68 wchodzą w proces fotostarzenia pod wpływem naświetlania UVA,
- badane ekstrakty roślinne istotnie zmniejszają aktywność SA- β -galaktozydazy (największy spadek odsetka komórek SA- β -gal-pozytywnych zaobserwowano w przypadku ekstraktu z nasion kawy), a także aktywność kaspaz (przede wszystkim kaspazy-9 i -3, a w mniejszym stopniu kaspazy-8) w fibroblastach eksponowanych na działanie promieniowania UVA, co świadczy o ich udziale w hamowaniu senescencji i apoptozy, szczególnie na szlaku mitochondrialnym,

- 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, wpływając na zwiększenie ich przeżywalności,
- ekstrakty zwiększają przeżywalność fibroblastów Hs68 po naświetlaniu ograniczając procesy apoptozy i senescencji poprzez modulację szlaków sygnalizacyjnych uczestniczących w odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny:
 - poprzez hamowanie poziomu ekspresji białek p53, AP-1 oraz czynnika transkrypcyjnego NFκB,
 - poprzez aktywację białka Klotho, odpowiadającego za spowolnienie procesów fotostarzenia,
- badane ekstrakty wpływają na zmniejszenie poziomu IL-2 oraz TNFα, wydzielanych przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej na skutek ekspozycji na promieniowanie UVA, co świadczy o ich działaniu przeciwzapalnym,
- analizowane ekstrakty roślinne ze względu na zbyt niski SPF nie mogą pełnić roli filtrów przeciwsłonecznych (przed UVB) samodzielnie, jednak ekstrakty z kory jesionów oraz nasion *C. robusta* ze względu na umiarkowaną wartość SPF mogłyby funkcjonować, jako mniej szkodliwe substancje zamiennie filtrów chemicznych razem z filtrami mineralnymi, co jest dodatkowym atutem do wykazanych właściwości fotochronnych przed promieniowaniem UVA.

12. Wnioski

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki upoważniają do sformułowania następujących wniosków:

1. Wszystkie analizowane ekstrakty roślinne wykazują skuteczne działanie fotoochronne wobec fibroblastów skóry naświetlanych promieniowaniem UVA,
2. Ochronne działanie ekstraktów wynika przede wszystkim z właściwości antyoksydacyjnych (chronią komórki skóry przed nadmiernym stresem oksydacyjnym) i ze zdolności do hamowania procesu senescencji i apoptozy
3. Ekstrakty roślinne modulują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne poprzez zmianę równowagi redox i przyczyniając się do hamowania kaskad, w które zaangażowane są białka p53, AP-1 oraz czynnik transkrypcyjny NFκB, a także powodując aktywację kaskady białka Klotho
4. Badane ekstrakty wykazują właściwości przeciwzapalne, co może mieć istotne znaczenie w ochronie przed szkodliwym wpływem promieniowania UVA

13. Supplement

13.1. Analiza fitochemiczna

13.1.1. Analiza jakościowa UHPLC-PDA-ESI-MS³ - metodyka

Jakościową analizę UHPLC-PDA-ESI-MS³ przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu UHPLC-3000 RS (Dionex, Dreieich, Niemcy) wyposażonego w pompę binarną, autosampler, termostat kolumnowy, detektor z matrycą diodową oraz spektrometr mas z pułapką jonową AmaZon SL ze źródłem jonów typu ESI (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). Rozdział przeprowadzono na kolumnie Kinetex XB-C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μm; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) w temperaturze 25°C z szybkością przepływu 0,3 ml/min. Faza ruchoma składała się z rozpuszczalnika A (woda/kwas mrówkowy, 100:0,1, v/v) i rozpuszczalnika B (acetonitryl/kwas mrówkowy, 100:0,1, v/v) o następującym profilu elucji: 0-0,5 min 6 % B w A, 0,5-45 min, 6-26% B; 45-55 min, 26-95% B; 55-60 min, 95% B; 60-63 min 95-6% B. Ekstrakty rozpuszczono w mieszaninie metanol-woda (7:3, v/v) do końcowego stężenia 10 mg/ml. Eluat LC wprowadzano bezpośrednio do interfejsu ESI bez rozdzielania i analizowano w trybie jonów ujemnych (zakres skanowania od m/z 70 do 2200). Ciśnienie nebulizatora, przepływ suchego gazu, temperatura i napięcie kapilarne wynosiły odpowiednio 40 psi, 9 l/min, 300°C i 4,5 kV. Amplituda fragmentacji MS/MS została ustawiona na 1,0 V i automatycznie dostosowywana przez system w zakresie 60-300% tej wartości. Wykryte w analizie UHPLC-PDA-ESI-MS³ związki porównano pod względem czasu retencji, widm UV-Vis i widm MS³ z autentycznymi standardami lub danymi literaturowymi.

13.1.2. Analiza ilościowa HPLC- metodyka

Ilościową analizę ekstraktu z liści oliwki oraz zielonej kawy przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu HPLC Waters 600 Multisolvent Delivery System (Waters Co., Milfold, MS, USA) wyposażonego w pompę poczwórną, ręczny zawór dozujący (5 μL, Rheodyne 7725i), termostat kolumnowy oraz detektor z matrycą diodową. Rozdziały przeprowadzono na kolumnie Ascentis Express C18 (75x4.6 mm, i.d. 2.7 μm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) z prekolumną C18 Ascentis C18 Supelguard (20 x 4 mm, i.d. 3μm; Supelco) przy temperaturze 25°C (liście oliwki) lub 30°C (zielona kawa) z szybkością przepływu 1,4 ml/min. Faza ruchoma składała się z rozpuszczalnika A (woda/kwas ortofosforowy, 99,5:0,5 obj./wag.) i rozpuszczalnika B (acetonitryl) z następującymi

profilami elucji: 0-16 min 15-30% B; 16-17 min 30-50% B; 17-19 min 50% B; 19-20min 50-15% B; 20-23 min 15% B (liście oliwki) oraz 0-1min 5% B; 1-16 min 5-30% B; 16-17 min 30-50% B; 17-19min 50% B; 19-20 min 50-5% B; 20-23 min 5% B (nasiona zielonej kawy).

Ilościową analizę HPLC-PDA ekstraktów z kory i liści jesionów przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu HPLC Hitachi Elite La Chrome (Merck, Darmstadt, Niemcy) wyposażonego w pompę poczwórną, autosampler, termostat kolumnowy oraz detektor z matrycą diodową. Rozdziały przeprowadzono na kolumnie C18 Ascentis® Express (150 × 4,6 mm, 2,7 μm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) z prekolumną C18 Ascentis® C18 Supelguard (20 × 4 mm, 3 μm; Supelco) z szybkością przepływu 1,4 ml/min. Faza ruchoma składała się z rozpuszczalnika A (woda/kwas ortofosforowy, 99,5:0,5 obj./wag.) i rozpuszczalnika B (acetonitryl) z następującym profilem elucji: 0-0,5 min, 3% B w A; 0,5-5 minut, 3-7%; 5-21 minut, 7-18%; 21-31 min 18-30%; 31-32,5 minuty, 30-50%; 32,5-37,5 minuty, 50%; 37,5-39 minut 50-8%; 39-45 min 8%.

Próbki we wszystkich analizach rozpuszczono w mieszaninie metanol-woda (7:3, obj./obj.). Dominujące składniki ekstraktów oznaczono ilościowo za pomocą zewnętrznych wzorców czystości HPLC. Związki, dla których standardy nie były dostępne, oznaczano ilościowo przy użyciu krzywej kalibracyjnej wzorca o bliskim podobieństwie strukturalnym.

13.1.3. Opis rezultatów

W wyniku przeprowadzonej analizy UHPLC-PDA-ESI-MS³ ekstraktu metanol-woda (7:3, v/v) z liści oliwki, stwierdzono występowanie 22 składników (Tabela 6, Rycina 26), należących do grupy irydoidów i ich pochodnych (**1-6**, **8-9**, **15-21**), fenyloetanoidów (**12-13**) oraz flawonoidów (**7**, **10**, **11**, **14**, **22**). Spośród zidentyfikowanych związków, jedynie tylko trzy z nich, tj. oleuropeina **19**, jej izomer **20** oraz 7-glukozyd luteoliny **11** można uznać za dominujące składniki badanego ekstraktu. Oznaczona metodą HPLC-PDA (Tabela 6) sumaryczna zawartość tych związków wynosiła 261.8 mg/g s.m. ekstraktu, z wyraźną przewagą oleuropeiny (221.9 mg/g) i towarzyszącego jej izomeru (26.0 mg/g). Poziom oleuropeiny aż 16-krotnie przewyższał zawartość składnika z grupy flawonów, tj. 7-glukozydu luteoliny (13.8 mg/g).

W wyniku przeprowadzonej analizy UHPLC-PDA-ESI-MS³ ekstraktu metanol-woda (7:3, v/v) z nasion zielonej kawy stwierdzono występowanie 16 składników polifenolowych (Tabela 7, Rycina 27), które przyporządkowano do grup pochodnych kwasu kawowego (**1**, **2**, **4**, **7**, **8**, **11-13**), ferulowego (**6**, **13-16**) oraz *p*-kumarowego (**5**, **9**, **10**). Spośród zidentyfikowanych związków oznaczeniom ilościowym HPLC-PDA poddano siedem

dominujących składników, w tym kwasy 3-, 4-, i 5- kawoilochinowe (**1, 4, 2**), kwas 5-feruilochinowy (**3**), oraz kwasy 3,4-, 3,5- i 4,5-dikawoilochinowe (**11, 12, 13**). Oznaczone stężenia pochodnych kwasów monokawoilo- i feruilochinowych przeliczono na zawartość kwasu chlorogenowego (**2**), natomiast kwasów dikawoilochinowych na zawartość cynaryny (kwas 1,3-dikawoilochinowy). Jak pokazują wyniki analizy HPLC-PDA (Tabela 7), sumaryczna zawartość dominujących składników ekstraktu sięga wartości 461.2 mg/g s.m. ekstraktu, z przeważającym kwasem chlorogenowym (286.3 mg/g), którego udział stanowił ponad 60% sumy wszystkich oznaczonych ilościowo polifenoli, Zawartość pozostałych sześciu kwasów mono- i dikawoilo- oraz feruilochinowych sumarycznie nie przekracza 60.0 mg/g.

W wyniku przeprowadzonej analizy UHPLC-PDA-ESI-MS³ ekstraktów z kory i liści jesionu pospolitego oraz kory jesionu koreańskiego stwierdzono występowanie 61 związków, z których 54 zostały w pełni lub wstępnie zidentyfikowane (Tabela 8, Rycina 28). Składniki obecne w badanych ekstraktach należą do różnych klas chemicznych, w tym kumaryn (**5, 6, 10, 12, 17, 18, 20, 21, 24-28, 35, 40**), fenyloetanoloidów (**1, 4, 9, 32-34, 36, 41, 42, 47, 51, 52, 54, 55**), flawonoidów (**44, 45, 48, 50, 53**), lignanów (**22, 30, 37-39, 49**), irydoidów (**13, 19, 46, 56, 57, 58, 59**) oraz pochodnych prostych alkoholi i kwasów fenolowych (**3, 7, 8, 11, 14-16**). Badania ilościowe ekstraktów przeprowadzono metodą HPLC-PDA (Tabela 28). W przypadku ekstraktu z kory *F. excelsior* 20 składników było obecnych w ilościach umożliwiających ich oznaczenie ilościowe, a ich łączna zawartość wyniosła 361,88 mg/g. Dominującą frakcją były kumaryny (168,29 mg/g), a wśród nich kalikantozyd i jego dwa izomery. Ekstrakt zawierał również stosunkowo dużą ilość fenyloetanoloidów (82,72 mg/g) oraz sekoirydoidów (64,75 mg/g). Fenyloetanoloidy reprezentowane były głównie przez dopaol-kawoiloheksozydy, werbaskozyd i izowerbaskozyd, podczas gdy ligstrozyd i jego 10-hydroksy-pochodna były głównymi składnikami sekoirydoidów. We frakcji lignanów, która stanowiła około 4% ekstraktu, dominował mono- i diglukozyd pinorezynolu. W ekstrakcie z liści *F. excelsior* można było ilościowo ocenić siedemnaście składników. Całkowita zawartość oznaczonych związków wyniosła 120,85 mg/g. Był to jedyny ekstrakt zawierający flawonoidy (30,97 mg/g), które obok fenyloetanoloidów (61,87 mg/g) stanowiły przeważającą frakcję. Ponad dwie trzecie frakcji fenyloetanoloidów stanowił werbaskozyd, natomiast we frakcji flawonoidów dominowała rutyna. Trzecie pod względem zawartości irydoidy (17,52 mg/g) reprezentowane były przede wszystkim przez oleuropeinę, ligstrozyd i oleoaktozyd. Ekstrakt z liści był również jedynym ekstraktem zawierającym pseudodepsydy kwasu kawowego, chociaż ich zawartość, poza kwasem chlorogenowym, była znikoma.

W ekstrakcie z kory *F. rhynchophylla* można było określić ilościowo 14 składników. W ekstrakcie dominowały kumaryny (238,95 mg/g), stanowiące ponad 85% ogółu oznaczonych ilościowo metabolitów (278,23 mg/g). Głównymi składnikami tej grupy były eskulina i fraksyna. W porównaniu z dwoma pozostałymi ekstraktami ekstrakt z kory *F. rhynchophylla* zawierał wymierne ilości glikozydu alkoholu koniferylowego i ponad 1% izomeru syringiny. Natomiast zawartość fenyloetanoloidów (15,29 mg/g) była znacznie mniejsza niż w ekstraktach z *F. excelsior*. Ponadto lignany i irydoidy były obecne w bardzo małych ilościach i były reprezentowane wyłącznie odpowiednio przez pinorezynol 4-O- β -D-glukopiranozydu i oleuropeinę.

Tabela 6. Wyniki analizy jakościowej i ilościowej głównych składników czynnych komercyjnego ekstraktu z liści *O. europaea*.

Nr	R _t [min]	UV λ (nm)	MS ³ [m/z]	Identyfikacja	Zawartość ± SE [mg/g]
<i>Sekoirydoidy</i>					
1	3.6	280	315 [M-H] ⁻ → 153(1.4), 123(1.2), 95(0.2)	Heksozyd hydroksytyrozolu	
2	4.2	235	389 [M-H] ⁻ → 345(20), 227 , 183(74), 165(60)	Oleozyd	
3	10.7	235	389 [M-H] ⁻ → 345 , 227(3.0), 209(32), 165(12)	Oleozyd izomer	
4	12.7	245, 280	403 [M-H] ⁻ → 371(21), 223 , 179(40), 121(4.0)	Heksozyd kwasu elenolowego izomer	
5	15.0	235, 280	377 [M-H] ⁻ → 197 , 153(11)	Oleuropeina aglikon	
6	18.8	245, 280	403 [M-H] ⁻ → 371 , 223(56), 179(37), 121(3.4)	Heksozyd kwasu elenolowego izomer	
8	24.5	235, 280	555 [M-H] ⁻ → 537 (100), 403(50), 223(17); 403 → 371(25), 223 , 179(52)	Hydroksyoleuropeina	
9	27.5	235, 280	701 [M-H] ⁻ → 539(32), 469(40), 437(21), 315	Diheksozyd oleuropeiny	
15	33.5	235, 280	701 [M-H] ⁻ → 593 , 377(14), 307(12), 275(12); 593 → 377(40), 307 , 275(76)	Diheksozyd oleuropeiny	
16	34.4	235, 280	539 [M-H] ⁻ → 403(37), 223 , 179(32)	Oleuropeina izomer	
17	35.0	235, 280	569 [M-H] ⁻ → 537 , 403(88), 223(13)	Metoksyoleuropeina	
18	35.9	235, 280	701 [M-H] ⁻ → 539 , 377(11), 307(10)	Diheksozyd oleuropeiny	
19	36.2	235, 280	539 [M-H] ⁻ → 377 , 345(11), 307(84), 275(74)	Oleuropeina ^a	221.93 ± 2.18
20	40.0	235, 280	539 [M-H] ⁻ → 377(44), 345(11), 307 , 275(99)	Oleuropeina izomer	26.03 ± 0.08
21	42.3	230, 280	523 [M-H] ⁻ → 361 , 291(40), 259(24)	Ligstrozyd	
<i>Fenyloetanoidy</i>					
12	29.7	235, 329	623 [M-H] ⁻ → 461 → 315 , 135(36)	Werbaskozyd ^a	
13	31.9	235, 329	623 [M-H] ⁻ → 461 → 315 , 135(37)	Werbaskozyd izomer	
<i>Flawonoidy</i>					
7	21.7	340	609 [M-H] ⁻ → 447 → 285	Diheksozyd luteoliny	
10	28.1	350	593 [M-H] ⁻ → 447(2.0), 285	Ramnozyd-heksozyd luteoliny	
11	28.5	340	447 [M-H] ⁻ → 285	7-Glukozyd luteoliny ^a	13.80 ± 0.02
14	33.1	340	431 [M-H] ⁻ → 269(100)	Heksozyd apigeniny	
22	43.9	370	285 [M-H] ⁻ → 255(76), 175(30)	Luteolina ^a	

^a składniki ekstraktu, których identyfikację potwierdzono metodą HPLC-MS przez porównanie z wzorcem.

Tabela 7. Wyniki analizy jakościowej i ilościowej głównych składników czynnych komercyjnego ekstraktu z nasion „zielonej” kawy (*C. robusta*)

Nr	Rt [min]	UV [nm]	MS ³ [m/z]	Identyfikacja	Zawartość ± SE [mg/g]
1	6.1	325	353 [M-H] ⁻ → 191, 179(42), 135(3.0)	Kwas 3- <i>O</i> -kawoilochinowy	42.21 ± 2.01
2	10.8	325	353 [M-H] ⁻ → 191, 179(2.0)	Kwas 5- <i>O</i> -kawoilochinowy ^a	286.27 ± 7.46
3	11.5	323	367 [M-H] ⁻ → 193, 191(1.5)	Kwas 3- <i>O</i> -feruilochinowy	
4	12.1	325	353 [M-H] ⁻ → 191(11), 179(54), 173, 135(3.0)	Kwas 4- <i>O</i> -kawoilochinowy	55.44 ± 1.70
5	16.1	310	337 [M-H] ⁻ → 191, 163(5)	Kwas 5- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroilochinowy	
6	18.8	323	367 [M-H] ⁻ → 191, 173(17)	Kwas 5- <i>O</i> -feruilochinowy	26.19 ± 0.41
7	19.7	325	335 [M-H] ⁻ → 179(17), 161, 135(81)	Kwas kawoiloszikimowy	
8	21.3	325	335 [M-H] ⁻ → 179(16), 161, 135(13)	Kwas kawoiloszikimowy	
9	22.4	323	481 [M-H] ⁻ → 319(7.0), 301, 179(11)	Heksozyd kwasu <i>p</i> -kumaroiloszikimowego	
10	23.3	325	481 [M-H] ⁻ → 319(19), 301, 161 (9.0), 257(12), 179(10), 149(5.0)	Heksozyd kwasu <i>p</i> -kumaroiloszikimowego	
11	32.4	325	515 [M-H] ⁻ → 353, 335(15), 203(6.0), 173(14); 353 → 173, 179(78), 191(51), 135(3.4)	Kwas 3,4- <i>O</i> -dikawoilochinowy	12.99 ± 0.77
12	33.1	325	515 [M-H] ⁻ → 353(100), 191(2.8), 179(1.9), 173(0.6); 353 → 191, 179(36), 173(2.2), 135(1.7)	Kwas 3,5- <i>O</i> -dikawoilochinowy	14.82 ± 0.73
13	36.4	325	515 [M-H] ⁻ → 353, 299(8.0), 255(6.0), 203(11), 353 → 173, 179(64), 191(33), 135(2.9)	Kwas 4,5- <i>O</i> -dikawoilochinowy	23.30 ± 1.28
14	39.0	325	529 [M-H] ⁻ → 367, 349(2.0), 335(16), 173(16), 367 → 193(24), 173	Kwas 4- <i>O</i> -feruilo-3- <i>O</i> -kawoilochinowy	
15	39.7	325	529 [M-H] ⁻ → 367, 335 (2.0), 173 (3.8)	Kwas 4- <i>O</i> -feruilo-5- <i>O</i> -kawoilochinowy	
16	40.3	325	529 [M-H] ⁻ → 367(35), 353, 191(5.0)	Kwas 5- <i>O</i> -feruilo-3- <i>O</i> -kawoilochinowy	

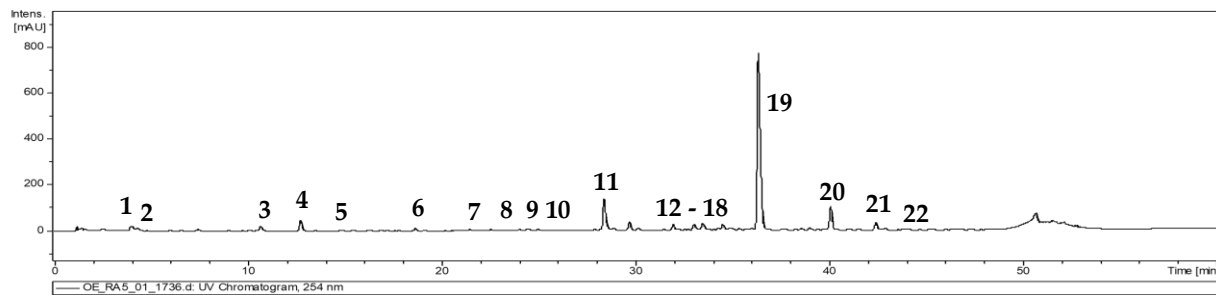
^a składniki ekstraktu, których identyfikację potwierdzono przez porównanie z wzorcem

Tabela 8. Wyniki analizy jakościowej i ilościowej głównych składników czynnych ekstraktów z kory *F. excelsior*, liści *F. excelsior* i kory *F. rhynchophylla*.

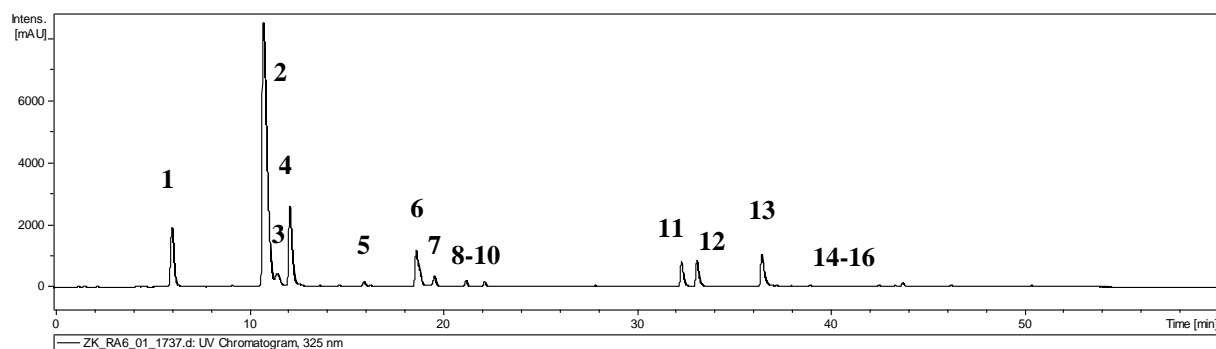
Nr	Rt [min]	UV _{max} [nm]	MS ³ [m/z]	Identyfikacja	Zawartość ± SE [mg/g]		
					<i>F. excelsior</i> kora	<i>F. excelsior</i> liście	<i>F. rhynchophylla</i> kora
Kumaryny							
5	7.0	275	577 [M+HCOO] ⁻ → 369, 207	Diheksozyd fraksetyny	tr	-	-
6	7.5	333	339 [M-H] ⁻ → 177	Eskuletyna 7-O-β-D-glukopiranozyd (eskulina) ^a	-	tr	130.23 ± 1.82
10	8.9	283, 332	399 [M+HCOO] ⁻ → 353 [M-H] ⁻ (39), 191, 176	Skopoletyna 7-O-β-D-glukopiranozyd (skopolina) ^a	tr	-	-
12	10.3	343	177 [M-H] ⁻	Eskuletyna ^a	-	-	24.32 ± 0.23
17	11.3	292, 334	429 [M+HCOO] ⁻ → 383 [M-H] ⁻ (17), 221	Izofraksydyna 7-O-β-D-glukopiranozyd (kalikantozyd) ^a	34.26 ± 0.55	-	-
18	11.5	297sh, 340	369 [M-H] ⁻ → 207, 191 (15)	Fraksetyna 8-O-β-D-glukopiranozyd (fraksyna) ^a	14.00 ± 0.11	tr	60.00 ± 1.01
20	12.3	298sh, 340	515 [M-H] ⁻ → 207, 191 (25)	Fraksetyna ramnozyd-heksozyd	-	-	3.95 ± 0.1
21	12.5	327	429 [M+HCOO] ⁻ → 383 [M-H] ⁻ (17), 221	Fraksydyna 8-O-β-D-glukopiranozyd/Fraxinol glukopiranozyd ^b	6-O-β-D- 59.93 ± 1.01	tr	-
24	13.1	292, 335	429 [M+HCOO] ⁻ → 383 [M-H] ⁻ (30), 221, 207 (7)	Fraksydyna 8-O-β-D-glukopiranozyd/Fraxinol glukopiranozyd ^b	6-O-β-D- 22.56 ± 0.57	-	-
25	13.1	315	415 [M+HCOO] ⁻ → 369 [M-H] ⁻ (5), 207, 191 (7)	Heksozyd fraksetyny	-	-	6.47 ± 0.04
26	13.5	335	207 [M-H] ⁻	Fraksetyna ^a	6.54 ± 0.24	-	7.69 ± 0.41
27	13.6	-	515 [M-H] ⁻ → 335 (28), 353 → 335 (63), 309, 177 (7)	Pochodna eskuletyny	-	-	3.00 ± 0.12
28	14.0	297sh, 338	515 [M-H] ⁻ → 335 (31), 353 → 335 (72), 309, 177 (13)	Pochodna eskuletyny	-	-	3.28 ± 0.07
35	19.3	340	221 [M-H] ⁻	Izofraksydyna ^a	11.31 ± 0.17	-	-
40	22.1	337	221 [M-H] ⁻	Fraksydyna/Fraksynol ^b	19.71 ± 0.35	-	-
Kumaryny ogółem					168.29 ± 2.63	tr	238.95 ± 3.40
Fenyloetanoidy							
1	4.3	278	315 [M-H] ⁻ → 153	Dopaol O-β-D-glukopiranozyd ^b	-	6.25 ± 0.12	-
4	6.6	275	345 [M+HCOO] ⁻ → 299 [M-H] ⁻ 299 [M-H] ⁻ → 179 (40), 143 (54), 119 (48), 113, 89 (69)	O-β-D-glukopiranozyd tyrozolu (salidrozyd) ^b	-	tr	-
9	8.7	275	431 [M-H] ⁻ → 299 → 179 (59), 143	O-β-D-apiofuranozyd-O-β-D-glukopiranozyd tyrozolu (osmantuzyd H) ^b	-	-	tr
32	18.2	322, 288	785 [M-H] ⁻ → 623 → 461	Heksozyd werbaskozydu	-	tr	-
33	18.5	282sh, 328	639 [M-H] ⁻ → 621, 529 (17), 459 (11)	Izomer β-hydroksywerbaskozydu I	-	2.15 ± 0.03	-
34	19.1	286sh, 328	639 [M-H] ⁻ → 621, 529 (5), 459 (6)	Izomer β-hydroksywerbaskozydu II	-	2.31 ± 0.03	-
36	20.3	287sh, 324	477 [M-H] ⁻ → 315 (25), 179 (17), 161	Dopaol heksozydu kawoilowego izomer I	tr	-	-
41	22.4	305	639 [M-H] ⁻ → 621, 477 (30)	Izomer β-hydroksywerbaskozydu III	6.23 ± 0.07	-	-
42	22.9	321	477 [M-H] ⁻ → 315 (37), 161, 135 (21)	Dopaol heksozydu kawoilowego izomer II	tr	-	-
47	26.3	328	477 [M-H] ⁻ → 315 (19), 179 (9), 161	Dopaol heksozydu kawoilowego izomer III	10.02 ± 0.18	tr	tr
51	29.6	325	477 [M-H] ⁻ → 315 (37), 179 (5), 161	Dopaol heksozydu kawoilowego izomer IV	38.64 ± 0.48	-	10.15 ± 0.15
52	30.1	328	623 [M-H] ⁻ → 461 → 315 (13), 161	Werbaskozyd ^a	14.88 ± 0.25	48.30 ± 0.50	-
54	34.5	326	609 [M-H] ⁻ → 477 (6), 447 → 315	Dopaol pentozyd kawoilohexsozydu	-	-	5.14 ± 0.09
55	35.1	325	623 [M-H] ⁻ → 461 → 315, 161 (8), 135 (26)	Izowerbaskozyd ^b	12.95 ± 0.15	2.85 ± 0.05	tr
Fenyloetanoidy ogółem					82.72 ± 1.04	61.87 ± 0.61	15.29 ± 0.24
Flawonoidy							
44	24.6	255, 354	609 [M-H] ⁻ → 301, 343 (18)	Ramnozylo-heksozyd kwercetyny	-	3.66 ± 0.03	-
45	25.6	255, 353	609 [M-H] ⁻ → 301	3-O-rutynozyd kwercetyny (rutyna) ^a	-	18.85 ± 0.22	-

48	26.8	255, 351	463 [M-H] ⁻ → 301	3-O-β-D-glukopiranozyd kwercetyny (izokwercytryna) ^a	-	3.85 ± 0.03	-
50	29.1	264, 341	593 [M-H] ⁻ → 285	Ramnozylo-heksozyd kempferolu	-	1.01 ± 0.03	-
53	34.0	264, 344	593 [M-H] ⁻ → 285	Kempferol 3-O-rutynozydu ^a	-	3.60 ± 0.05	-
Flawonoidy ogółem					-	30.97 ± 0.27	-
Lignany							
22	12.9	279	583 [M+HCOO] ⁻ → 537 [M-H] ⁻ , 375 (43)	heksozyd Oliviru	-	-	tr
30	17.1	276	727 [M+HCOO] ⁻ → 681 [M-H] ⁻ , 519 (16)	4,4'-di-O-β-D-glukopiranozyd pinorezynolu ^b	15.02 ± 0.16	-	-
			681 [M-H] ⁻ → 519 , 357 (11)				
37	20.6	279	581 [M+HCOO] ⁻ → 535 [M-H] ⁻ → 373	Izomer I heksozydu hydroksypinorezynolu	-	tr	-
38	21.0	272	787 [M+HCOO] ⁻ → 741 [M-H] ⁻ (45), 579 , 417 (4)	Diheksyzyd syringarezynolu	tr	-	-
39	21.3	276	581 [M+HCOO] ⁻ → 535 [M-H] ⁻ , 373 (10)	Izomer II heksozydu hydroksypinorezynolu	-	2.70 ± 0.16	-
49	28.7	278	565 [M+HCOO] ⁻ → 519 [M-H] ⁻	4-O-β-D-glukopiranozyd pinorezynolu ^a	27.73 ± 0.57	3.84 ± 0.16	5.07 ± 0.09
			519 [M-H] ⁻ → 357				
Lignany ogółem					42.75 ± 0.55	6.54 ± 0.32	5.07 ± 0.09
Kwasy fenolowe / alkohole							
3	6.5	290sh, 322	353 [M-H] ⁻ → 179 (50), 191	Kwas 5-kawoilochinowy (kwas neochlorogenowy) ^a	-	tr	-
7	7.9	291sh, 326	487 [M-H] ⁻ → 179	Heksozyloramnozyd kwasu kawowego	-	tr	-
8	8.1	257	387 [M+HCOO] ⁻ → 341 [M-H] ⁻ (19), 179	Glikozyd alkoholu koniferylowego ^b	tr	-	3.43 ± 0.03
11	9.5	264	417 [M+HCOO] ⁻ → 371 [M-H] ⁻ (32), 209	Izomer Syringiny	3.36 ± 0.13	-	11.65 ± 0.15
14	10.3	326	353 [M-H] ⁻ → 179 (5), 191	Kwas 3-kawoilochinowy (kwas chlorogenowy) ^a	-	2.72 ± 0.04	-
15	10.8	321	179 [M-H] ⁻	Kwas kawowy ^a	tr	1.23 ± 0.03	-
16	11.2	294sh, 324	353 [M-H] ⁻ → 173 , 179 (62), 191 (24)	Kwas 4-kawoilochinowy (kwas kryptochlorogenowy) ^a	-	tr	-
Kwasy fenolowe / alkohole ogółem					3.36 ± 0.13	3.95 ± 0.05	15.08 ± 0.18
Irydoidy							
13	9.8	218, 260	611 [M+HCOO] ⁻ → 565 [M-H] ⁻ , 403 (90)	Ester 11-metylowy oleozydu 7-O-β-D-glukopiranozyd ^b	-	tr	-
19	11.5	292, 339sh	403 [M-H] ⁻ → 223 , 179 (44)	Ester 11-metylowy oleozydu ^b	-	tr	-
46	26.0	280	555 [M-H] ⁻ → 419 (17), 273 , 307 (36), 393 (66)	10-hydroksyoleuropeina ^b	-	tr	-
56	35.2	230, 280	539 [M-H] ⁻ → 419 (2), 377 , 291 (8), 275 (22)	10-hydroksyligstrozyd ^b	16.81 ± 0.22	8.05 ± 0.18	-
57	41.2	230, 281	539 [M-H] ⁻ → 403 (7), 377 , 307 (87), 275 (99)	Oleuropeina ^a	-	4.36 ± 0.20	3.83 ± 0.22
58	47.6	224, 280	1009 [M-H] ⁻ → 623 , 461 (52)	Oleoaktyzyd ^b	15.64 ± 0.15	5.11 ± 0.05	-
59	47.8	224	523 [M-H] ⁻ → 403 (1), 361 , 291 (41), 259 (26)	Ligstrozyd ^b	32.38 ± 0.38	tr	-
Irydoidy ogółem					64.75 ± 0.75	17.52 ± 0.18	3.83 ± 0.22
Inne							
2	6.0	279	461 [M-H] ⁻ → 315 → 135	Niezidentyfikowany	-	tr	-
23	12.9	278, 326	377 [M-H] ⁻ → 197 , 153 (14)	Niezidentyfikowany	-	tr	-
29	15.2	308	579 [M+HCOO] ⁻ → 533 [M-H] ⁻	Niezidentyfikowany	-	tr	-
31	18.0	284	613 [M+HCOO] ⁻ → 567[M-H] ⁻ (14), 405	Niezidentyfikowany	tr	-	-
43	23.4	277	565 [M-H] ⁻ → 403 (35), 339 , 327 (45)	Niezidentyfikowany	tr	-	-
60	48.5	221, 285	667 [M+HCOO] ⁻ → 631 [M-H] ⁻ , 469 (72)	Niezidentyfikowany	-	-	tr
61	50.4	224, 284	665 [M+HCOO] ⁻ → 629 [M-H] ⁻ , 467 (7)	Niezidentyfikowany	-	-	tr
Całkowita zawartość oznaczanych składników					361.88 ± 3.72	120.85 ± 1.48	278.23 ± 3.51

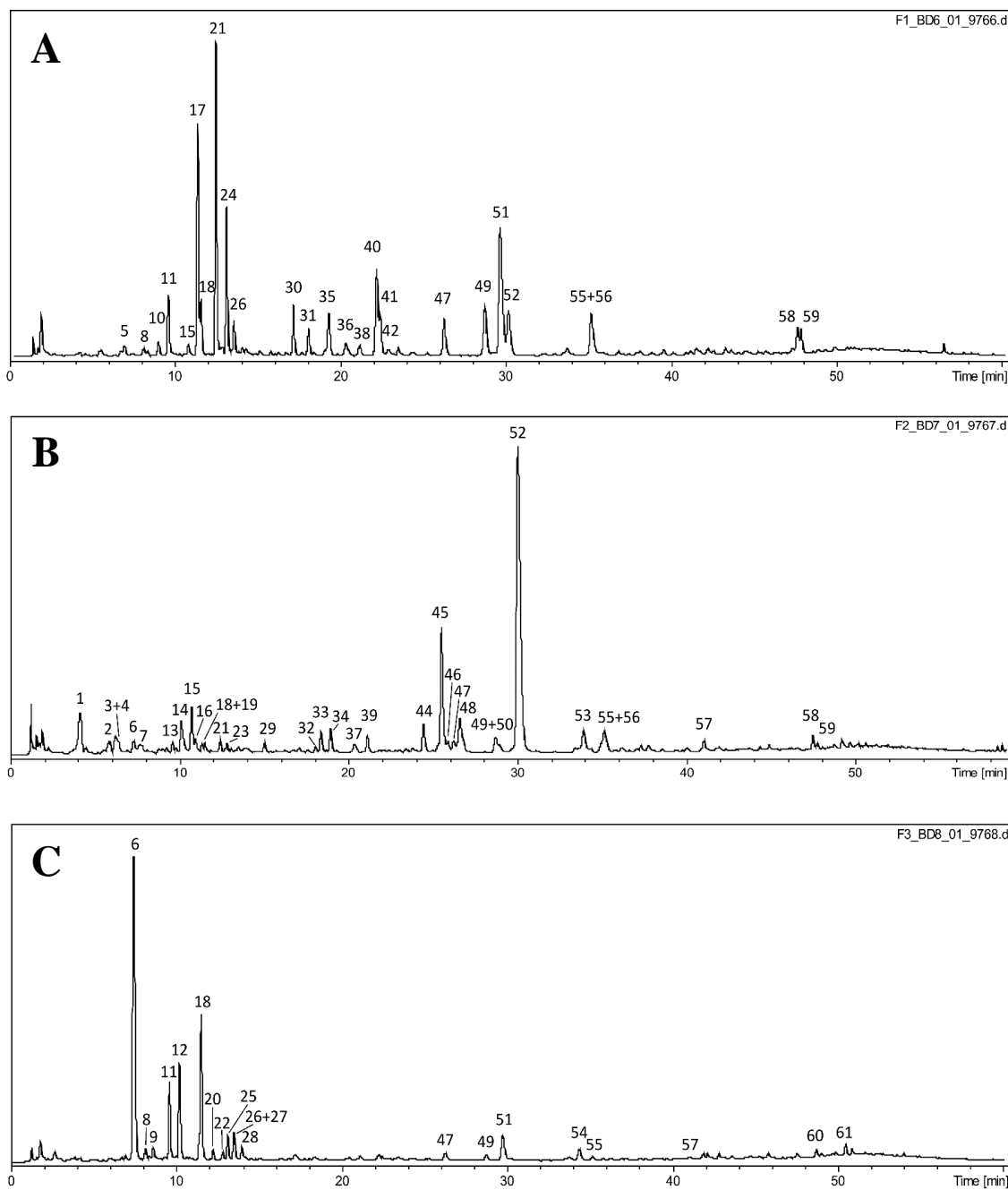
^a składniki ekstraktu, których identyfikację potwierdzono przez porównanie z wzorcem; ^b szczegółowa struktura zaproponowana na podstawie fitochemii rodzaju; tr, śladowa zawartość



Ryc. 26. Chromatogram UHPLC-UV rozdziálu polifenoli w komercyjnym ekstrakcie z liści oliwki ($\lambda=254$ nm). Numeracja pików zgodnie z Tabelą 6.



Ryc. 27. Chromatogram UHPLC-UV rozdziálu polifenoli w komercyjnym ekstrakcie z „zielonej” kawy ($\lambda = 325$ nm). Numeracja pików zgodnie z Tabelą 7.



Ryc. 28. Chromatogram UHPLC-UV rozdzielenia składników czynnych ekstraktów z kory *F. excelsior* (A), liści *F. excelsior* (B) i kory *F. rhynchophylla* (C) przy $\lambda = 280$ nm. Numeracja pików zgodnie z Tabelą 8.

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.

16. Bibliografia

Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., & Zarrouk, M. (2015). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*, 4(4), 682-698.

Aioi, A. (2021). Inflammaging in skin and intrinsic underlying factors. *Trends in Immunotherapy*, 5(2), 44-53.

Akter, K. M., Park, W. S., Kim, H. J., Khalil, A. A. K., & Ahn, M. J. (2020). Comparative studies of fraxinus species from Korea using microscopic characterization, phytochemical analysis, and anti-lipase enzyme activity. *Plants*, 9(4), 534.

AL-Asmari, K. M., Zeid, I. M. A., & Al-Attar, A. M. (2020). Coffee Arabica in Saudi Arabia: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research (eIJPPR)*, 10(4), 71-78.

Alkhatib, A., Tsang, C., & Tuomilehto, J. (2018). Olive oil nutraceuticals in the prevention and management of diabetes: From molecules to lifestyle. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2024.

Allegra, A., Pioggia, G., Tonacci, A., Musolino, C., & Gangemi, S. (2020). Oxidative stress and photodynamic therapy of skin cancers: Mechanisms, challenges and promising developments. *Antioxidants*, 9(5), 448

Ansary, T. M., Hossain, M. R., Kamiya, K., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2021). Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3974.

Asbaghi, O., Sadeghian, M., Nasiri, M., Khodadost, M., Shokri, A., Panahande, B., ... & Sadeghi, O. (2020). The effects of green coffee extract supplementation on glycemic indices and lipid profile in adults: A systematic review and dose-response meta-analysis of clinical trials. *Nutrition Journal*, 19, 1-21.

Auh, J. H., & Madhavan, J. (2021). Protective effect of a mixture of marigold and rosemary extracts on UV-induced photoaging in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 135, 111178.

Aydoğan, B., Cittan, M., Çelik, A., & Kenan, D. O. S. T. (2020). A Comprehensive Analysis to Determine the Phytochemical Characteristics of *Fraxinus Americana* and *Fraxinus*

Excelsior Leaves Extracts: Influence of the Extraction Method. *Celal Bayar University Journal of Science*, 16(1), 103-107.

Balcerczyk, A., Soszynski, M., Rybaczek, D., Przygodzki, T., Karowicz-Bilinska, A., Maszewski, J., & Bartosz, G. (2005). Induction of apoptosis and modulation of production of reactive oxygen species in human endothelial cells by diphenyleiodonium. *Biochemical pharmacology*, 69(8), 1263-1273.

Balupillai, A., Kanimozhi, G., Khan, H. A., Alhomida, A. S., & Prasad, N. R. (2020). Opuntiol prevents photoaging of mouse skin via blocking inflammatory responses and collagen degradation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

Baptista, M. S., Cadet, J., Greer, A., & Thomas, A. H. (2021). Photosensitization reactions of biomolecules: definition, targets and mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, 97(6), 1456-1483.

Battie, C., Jitsukawa, S., Bernerd, F., Del Bino, S., Marionnet, C., & Verschoore, M. (2014). New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Experimental Dermatology*, 23, 7-12.

Bocheva, G., Slominski, R. M., Janjetovic, Z., Kim, T. K., Böhm, M., Steinbrink, K., ... & Slominski, A. T. (2022). Protective role of melatonin and its metabolites in skin aging. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1238.

Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., & Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *Molecules*, 25(24), 5946.

Bosso, H., Barbalho, S. M., de Alvares Goulart, R., & Otoboni, A. M. M. B. (2021). Green coffee: Economic relevance and a systematic review of the effects on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.

Böyum, A. (1968). A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, 97, 51-76.

- Brand, R. M., Wipf, P., Durham, A., Epperly, M. W., Greenberger, J. S., & Falo Jr, L. D. (2018). Targeting mitochondrial oxidative stress to mitigate UV-induced skin damage. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 920.
- Brotons, A., Vidal-Iglesias, F. J., Solla-Gullón, J., & Iniesta, J. (2016). Carbon materials for the electrooxidation of nucleobases, nucleosides and nucleotides toward cytosine methylation detection: a review. *Analytical Methods*, *8*(4), 702-715.
- Bussmann, R.W. (2020). *Fraxinus excelsior* L. Oleaceae. In: Batsatsashvili, K., Kikvidze, Z., Bussmann, R. (eds) *Ethnobotany of the Mountain Regions of Far Eastern Europe. Ethnobotany of Mountain Regions*. Springer, Cham.
- Cadet, J., & Douki, T. (2018). Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *17*(12), 1816-1841.
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J. L. (2015). Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochemistry and photobiology*, *91*(1), 140-155.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J. L., & Di Mascio, P. (2009). Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *8*(7), 903-911.
- Caloni, S., Durazzano, T., Franci, G., & Marsili, L. (2021). Sunscreens' UV Filters Risk for Coastal Marine Environment Biodiversity: A Review. *Diversity*, *13*(8), 374.
- Carducci, M., Pavone, P. S., De Marco, G., Lovati, S., Altabas, V., Altabas, K., & Emanuele, E. (2015). Comparative effects of sunscreens alone vs sunscreens plus DNA repair enzymes in patients with actinic keratosis: clinical and molecular findings from a 6-month, randomized, clinical study. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*, *14*(9), 986-990.
- Carrara, M., Kelly, M. T., Roso, F., Larroque, M., & Margout, D. (2021). Potential of olive oil mill wastewater as a source of polyphenols for the treatment of skin disorders: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(26), 7268-7284.
- Carvalho Neto, D. P. D., Gonot-Schoupinsky, X. P., & Gonot-Schoupinsky, F. N. (2021). Coffee as a naturally beneficial and sustainable ingredient in personal care products: A systematic scoping review of the evidence. *Frontiers in Sustainability*, *2*, 697092.

- Castejón, M. L., Montoya, T., Alarcón-de-la-Lastra, C., & Sánchez-Hidalgo, M. (2020). Potential protective role exerted by secoiridoids from *Olea europaea* L. in cancer, cardiovascular, neurodegenerative, aging-related, and immunoinflammatory diseases. *Antioxidants*, *9*(2), 149.
- Chen Q. Y., Yang L., Liu B. (2021). Effect of geniposide on the mRNA expression of apoptosis related proteins p53, Bax and Bcl-2 in HSF cells induced by UVA. *Information on traditional Chinese medicine*, *38*(6).
- Chen, J., Luo, J., Tan, Y., Wang, M., Liu, Z., & Yang, T. (2019a). Effects of low-dose ALA-PDT on fibroblast photoaging induced by UVA irradiation and the underlying mechanisms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *27*, 79-84.
- Chen, S., Wang, X., Nisar, M. F., Lin, M., & Zhong, J. L. (2019b). Heme oxygenases: cellular multifunctional and protective molecules against UV-induced oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Chen, Z., Yang, A., Zhang, L., Lu, Y., Mo, J., Xie, M., & Shen, X. (2020). Pearl extract protects HaCaT cells from UV radiation-induced apoptosis through mitochondrial pathway regulation.
- Cheng, Y., Chen, J., Shi, Y., Fang, X., & Tang, Z. (2022). MAPK Signaling Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma: Biological Function and Targeted Therapy. *Cancers*, *14*(19), 4625. <https://doi.org/10.3390/cancers14194625>
- Chiaino, E., Micucci, M., Cosconati, S., Novellino, E., Budriesi, R., Chiarini, A., & Frosini, M. (2020). Olive leaves and Hibiscus flowers extracts-based preparation protect brain from oxidative stress-induced injury. *Antioxidants*, *9*(9), 806.
- Chiang, H. M., Chen, C. W., Chen, C. C., Wang, H. W., Jhang, J. H., Huang, Y. H., & Wen, K. C. (2015). Role of *Coffea arabica* extract and related compounds in preventing photoaging and photodamage of the skin. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 523-530). Academic Press.
- Chiang, H. M., Lin, T. J., Chiu, C. Y., Chang, C. W., Hsu, K. C., Fan, P. C., & Wen, K. C. (2011). *Coffea arabica* extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(1), 309-318.

- Chu, C. C., Hasan, Z. A. A., Tan, C. P., & Nyam, K. L. (2022). In vitro safety evaluation of sunscreen formulation from nanostructured lipid carriers using human cells and skin model. *Toxicology in Vitro*, *84*, 105431.
- Chu, Y., Wu, P. Y., Chen, C. W., Lyu, J. L., Liu, Y. J., Wen, K. C., ... & Chiang, H. M. (2019). Protective effects and mechanisms of N-Phenethyl Caffeamide from UVA-induced skin damage in human epidermal keratinocytes through Nrf2/HO-1 regulation. *International journal of molecular sciences*, *20*(1), 164.
- Clifford, M. N., Kirkpatrick, J. O., Kuhnert, N., Roozendaal, H., & Salgado, P. R. (2008). LC–MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chemistry*, *106*(1), 379-385.
- Cui, R., Widlund, H. R., Feige, E., Lin, J. Y., Wilensky, D. L., Igras, V. E., ... & Fisher, D. E. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*, *128*(5), 853-864.
- Czubaszek, M., Szostek, M., Wójcik, E., & Andraszek, K. (2014). Test kometowy jako metoda identyfikacji niestabilności chromosomów. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, *68*.
- D'augustin, O., Huet, S., Campalans, A., & Radicella, J. P. (2020). Lost in the crowd: how does human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) find 8-oxoguanine in the genome?. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8360.
- da Silva, A. C., Paiva, J. P., Diniz, R. R., Dos Anjos, V. M., Silva, A. B. S., Pinto, A. V., ... & Santos, B. A. M. (2019). Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *193*, 162-171.
- Daré, R. G., Nakamura, C. V., Ximenes, V. F., & Lautenschlager, S. O. (2020). Tannic acid, a promising anti-photoaging agent: Evidences of its antioxidant and anti-wrinkle potentials, and its ability to prevent photodamage and MMP-1 expression in L929 fibroblasts exposed to UVB. *Free Radical Biology and Medicine*, *160*, 342-355.
- de Oliveira, R. M. (2006). Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS letters*, *580*(24), 5753-5758.

- Didier, C., Kerblat, I., Drouet, C., Favier, A., Béani, J. C., & Richard, M. J. (2001). Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-mediated cell death in human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(5), 585-598.
- Ding, Y., Jiratchayamaethasakul, C., & Lee, S. H. (2020). Protocatechuic aldehyde attenuates UVA-induced photoaging in human dermal fibroblast cells by suppressing MAPKs/AP-1 and NF- κ B signaling pathways. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4619.
- Donglikar, M. M., & Deore, S. L. (2016). Sunscreens: A review. *Pharmacognosy Journals*, 8(3).
- Douki T., Reynaud-Angelin A., Cadet J., Sage E. (2003). Bipyrimidine photo products Rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*, 42, 9221-9226.
- Douki, T. (2016). Relative Contributions of UVB and UVA to the Photoconversion of (6-4) Photoproducts into their Dewar Valence Isomers. *Photochemistry and photobiology*, 92(4), 587-594.
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., Kadekaro, A.L. (2018). Natural antioxidants: multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. *Frontiers in pharmacology*, 392.
- Dwyer, J. T., Coates, P. M., & Smith, M. J. Dietary supplements: regulatory challenges and research resources. *Nutrients*. 2018; 10 (1): 41.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Emanuele, E., Altabas, V., Altabas, K., & Berardesca, E. (2013). Topical application of preparations containing DNA repair enzymes prevents ultraviolet-induced telomere shortening and c-FOS proto-oncogene hyperexpression in human skin: an experimental pilot study. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 12(9), 1017-1021.
- Erol-Dayi, Ö., Arda, N., & Erdem, G. (2012). Protective effects of olive oil phenolics and gallic acid on hydrogen peroxide-induced apoptosis. *European journal of nutrition*, 51, 955-960.

- Farias-Pereira, R., Oshiro, J., Kim, K. H., & Park, Y. (2018). Green coffee bean extract and 5-O-caffeoylquinic acid regulate fat metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Functional Foods*, *48*, 586-593.
- Finotti, E., & Di Majo, D. (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Food/Nahrung*, *47*(3), 186-187.
- Fourneron, J. D., Faraud, F., & Fourneron, A. (1999). Sur la mesure in vitro de la protection solaire de crèmes cosmétiques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry*, *2*(7-8), 421-427.
- Franco, A. C., Aveleira, C., & Cavadas, C. (2022). Skin senescence: Mechanisms and impact on whole-body aging. *Trends in Molecular Medicine*.
- Garg, C., Sharma, H., & Garg, M. (2020). Skin photo-protection with phytochemicals against photo-oxidative stress, photo-carcinogenesis, signal transduction pathways and extracellular matrix remodeling—An overview. *Ageing Research Reviews*, *62*, 101127.
- Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Afrin, S., Reboledo-Rodriguez, P., Cianciosi, D., Mezzetti, B., ... & Giampieri, F. (2017). Strawberry-based cosmetic formulations protect human dermal fibroblasts against UVA-induced damage. *Nutrients*, *9*(6), 605.
- Gencheva, R., Cheng, Q., & Arnér, E. S. (2022). Thioredoxin reductase selenoproteins from different organisms as potential drug targets for treatment of human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*.
- George, K. C., Hebbar, S. A., Kale, S. P., & Kesavan, P. C. (1999). Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of irradiation. *Journal of Radiological Protection*, *19*(2), 171.
- Girsang, E., Ginting, C. N., Lister, I. N. E., Yashfa Gunawan, K., & Widowati, W. (2021). Anti-inflammatory and antiaging properties of chlorogenic acid on UV-induced fibroblast cell. *PeerJ*, *9*, e11419.
- Gonzalez, S., Gilaberte, Y., Philips, N., & Juarranz, A. (2011). Current trends in photoprotection-A new generation of oral photoprotectors. *The Open Dermatology Journal*, *5*(1).

- Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E. W., Greulich, K. O., Cardoso, M. C., & Rapp, A. (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic acids research*, *40*(20), 10263-10273.
- Ha, J. Y., Choi, H. K., Oh, M. J., Choi, H. Y., Park, C. S., & Shin, H. S. (2009). Photo-protective and anti-melanogenic effect from phenolic compound of olive leaf (*Olea europaea* L. var. Kalamata) extracts on the immortalized human keratinocytes and B16F1 melanoma cells. *Food Science and Biotechnology*, *18*(5), 1193-1198./
- Han, S., Li, H., Luo, F., Chen, X., Cen, Y., Liu, P., ... & Lin, J. (2022). Inhibitory Effect of Seawater Pearl Hydrolysate on UVA-Induced Photoaging of Human Skin Fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022.
- Heo, S., Hwang, H. S., Jeong, Y., & Na, K. (2018). Skin protection efficacy from UV irradiation and skin penetration property of polysaccharide-benzophenone conjugates as a sunscreen agent. *Carbohydrate polymers*, *195*, 534-541.
- Huang, J. W., Xu, Q. Y., Lin, M., Cheng, B., & Ji, C. (2020). The Extract from *Acidosasa longiligula* Alleviates in vitro UV-Induced Skin Cell Damage via Positive Regulation of Thioredoxin 1. *Clinical Interventions in Aging*, 897-905.
- Hwang, J. Y., Yadav, A. K., Jang, B. C., & Kim, Y. C. (2019). Antioxidant and cytoprotective effects of *Stachys riederi* var. *japonica* ethanol extract on UVA-irradiated human dermal fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, *43*(3), 1497-1504.
- Iakovou, E., & Kourti, M. (2022). A Comprehensive Overview of the Complex Role of Oxidative Stress in Aging, The Contributing Environmental Stressors and Emerging Antioxidant Therapeutic Interventions. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*.
- Ivanov, V. N., & Ronai, Z. E. (2000). p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF- κ B activity and Fas expression. *Oncogene*, *19*(26), 3003-3012.
- Jeong, N. H., Yang, E. J., Jin, M., Lee, J. Y., Choi, Y. A., Park, P. H., ... & Kim, S. H. (2018). Esculetin from *Fraxinus rhynchophylla* attenuates atopic skin inflammation by inhibiting the expression of inflammatory cytokines. *International Immunopharmacology*, *59*, 209-216.

- Ji, L., Jiang, P., Lu, B., Sheng, Y., Wang, X., & Wang, Z. (2013). Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(11), 1911-1919.
- Jia, Y., Mao, Q., Yang, J., Du, N., Zhu, Y., & Min, W. (2023). (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Protects Human Skin Fibroblasts from Ultraviolet Induced Photoaging. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 149-159.
- Jiang, R., Xu, X., Sun, Z., Wang, F., Ma, R., Feng, K., ... & Sun, L. (2020). Protective effects of ginseng proteins on photoaging of mouse fibroblasts induced by UVA. *Photochemistry and Photobiology*, 96(1), 113-123.
- Jin, S.G., Padron, F., Pfeifer, G.P. (2022). UVA Radiation, DNA Damage, and Melanoma. *ACS omega*, 7, 32936-32948.
- Johann To Berens, P., & Molinier, J. (2020). Formation and recognition of UV-induced DNA damage within genome complexity. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6689.
- Kagami, K., Morita, H., Onda, K., Hirano, T., & Oka, K. (2008). Protective effect of caffeine on streptozotocin-induced beta-cell damage in rats. *Journal of pharmacy and Pharmacology*, 60(9), 1161-1165.
- Kageyama, H., Waditee-Sirisattha, R. (2019). Antioxidative, anti-inflammatory, and anti-aging properties of mycosporine-like amino acids: Molecular and cellular mechanisms in the protection of skin-aging. *Marine Drugs*, 17, 222.
- Karadeniz, F., Oh, J. H., Kim, H. R., Ko, J., & Kong, C. S. (2021). Camellioside A, isolated from *Camellia japonica* flowers, attenuates UVA-induced production of MMP-1 in HaCaT keratinocytes via suppression of MAPK activation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(1), 1-1.
- Khan, A. Q., Travers, J. B., & Kemp, M. G. (2018). Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 59(5), 438-460.

- Kim, S. H., Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Ko, D. O., Wang, Z. H., ... & Hyun, J. W. (2008). Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), 1319-1326.
- Kiss, A. K., Michalak, B., Patyra, A., & Majdan, M. (2020). UHPLC-DAD-ESI-MS/MS and HPTLC profiling of ash leaf samples from different commercial and natural sources and their in vitro effects on mediators of inflammation. *Phytochemical analysis*, 31(1), 57-67.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., & Ahnström, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA Repair*, 363(2), 89-96.
- Kolakul, P., & Sripanidkulchai, B. (2018). Protective effects of Lagerstroemia speciosa extract against UV-A damage on skin cells. *Industrial Crops and Products*, 124, 9-19.
- Kozachok S, Kolodziejczyk-Czepas J, Marchyshyn S, Wojtanowski KK, Zgórk G, Oleszek W. Comparison of Phenolic Metabolites in Purified Extracts of Three Wild-Growing *Herniaria* L. Species and Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities In Vitro. *Molecules*. 2022; 27(2):530. <https://doi.org/10.3390/molecules27020530>
- Krutmann, J., Passeron, T., Gilaberte, Y., Granger, C., Leone, G., Narda, M., ... & Lim, H. W. (2020). Photoprotection of the future: challenges and opportunities. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(3), 447-454.
- Kullavanijaya, P., & Lim, H. W. (2005). Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(6), 937-958.
- Kumar, N., Moreno, N. C., Feltes, B. C., Menck, C. F., & Houten, B. V. (2020). Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: From DNA lesions to proteins. *Genetics and Molecular Biology*, 43.
- Kusumaningrum, N., Lee, D. H., Yoon, H. S., Kim, Y. K., Park, C. H., & Chung, J. H. (2018). Gasdermin C is induced by ultraviolet light and contributes to MMP-1 expression via activation of ERK and JNK pathways. *Journal of dermatological science*, 90(2), 180-189.

- Lang, B. J., Guerrero, M. E., Prince, T. L., Okusha, Y., Bonorino, C., & Calderwood, S. K. (2021). The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of proteostasis and the heat shock response. *Archives of toxicology*, *95*(6), 1943-1970.
- Lebaron, P. (2022). UV filters and their impact on marine life: state of the science, data gaps, and next steps. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *36*, 22-28.
- Lecci, R. M., D'Antuono, I., Cardinali, A., Garbetta, A., Linsalata, V., Logrieco, A. F., & Leone, A. (2021). Antioxidant and pro-oxidant capacities as mechanisms of photoprotection of olive polyphenols on UVA-damaged human keratinocytes. *Molecules*, *26*(8), 2153.
- Lee, B. Z., Kim, C. S., Jeong, S. K., Lee, S., Lee, I. S., & Hong, K. (2021). Anti-inflammatory isocoumarins from the bark of *Fraxinus chinensis* subsp. *rhynchophylla*. *Natural Product Research*, *35*(22), 4380-4387.
- Lee, B. Z., Kim, K. M., Chae, S., Jeong, S. K., Lee, S., Hong, K., & Lee, I. S. (2020). New coumarins isolated from the stem bark of *Fraxinus rhynchophylla* inhibit human neutrophil elastase and LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Phytochemistry Letters*, *35*, 78-83.
- Lee, C. H., Wu, S. B., Hong, C. H., Yu, H. S., & Wei, Y. H. (2013). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy. *International journal of molecular sciences*, *14*(3), 6414-6435.
- Lee, J. H., Park, J., & Shin, D. W. (2022). The molecular mechanism of polyphenols with anti-aging activity in aged human dermal fibroblasts. *Molecules*, *27*(14), 4351.
- Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Perez, D. L., & Heredia, J. B. (2016). Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases. *International journal of molecular sciences*, *17*(6), 921.
- Li, S., Wang, Y., Li, T., Ma, P., Zhang, X., Xia, B., ... & Dong, W. (2021). Skin bioinspired anti-ultraviolet melanin/TiO₂ nanoparticles without penetration for efficient broad-spectrum sunscreen. *Colloid and Polymer Science*, *299*(11), 1797-1805.

- Lin, H., Cheng, K. C., Lin, J. A., Hsieh, L. P., Chou, C. H., Wang, Y. Y., ... & Hsieh, C. W. (2022). Pholiota nameko Polysaccharides Protect against Ultraviolet A-Induced Photoaging by Regulating Matrix Metalloproteinases in Human Dermal Fibroblasts. *Antioxidants*, *11*(4), 739.
- Low, E., Alimohammadiha, G., Smith, L. A., Costello, L. F., Przyborski, S. A., von Zglinicki, T., & Miwa, S. (2021). How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing?. *Ageing Research Reviews*, *71*, 101456.
- Lu, Z., Xia, Q., Cheng, Y., Lu, Q., Li, Y., Zeng, N., ... & Luo, D. (2022). Hesperetin attenuates UVA-Induced photodamage in human dermal fibroblast cells. *Journal of Cosmetic Dermatology*.
- Maghsoudi, H., & Haj-allahyari, S. (2018). Down regulation of COX-2, IL-1 β , TNF- α in cynoviocyte by essential oil of Fraxinus excelsior. *International Journal of Contemporary Research and Review*, *9*(03), 20192-20203.
- Mancuso, J. B., Maruthi, R., Wang, S. Q., & Lim, H. W. (2017). Sunscreens: an update. *American journal of clinical dermatology*, *18*, 643-650.
- Manon, L., Béatrice, B., Thierry, O., Jocelyne, P., Fathi, M., Evelyne, O., & Alain, B. (2015). Antimutagenic potential of harpagoside and Harpagophytum procumbens against 1-nitropyrene. *Pharmacognosy magazine*, *11*.
- Mansur, J. D. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. D. A., & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol*, 121-4.
- Mansur, M. C. P., Leitão, S. G., Cerqueira-Coutinho, C., Vermelho, A. B., Silva, R. S., Presgrave, O. A., ... & Santos, E. P. (2016). In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*, 251-258.
- Mansuri, R., Diwan, A., Kumar, H., Dangwal, K., & Yadav, D. (2021). Potential of Natural Compounds as Sunscreen Agents. *Pharmacognosy Reviews*, *15*(29).
- Mao, F., Wu, Z., Shen, Y., Ren, Y., Yang, M., Li, X., & Zhang, L. (2021). Regulatory mechanism of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on human skin fibroblasts during

ultraviolet A photoaging. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45(2), 427-436.

Mao, G. X., Xing, W. M., Wen, X. L., Jia, B. B., Yang, Z. X., Wang, Y. Z., ... & Yan, J. (2015). Salidroside protects against premature senescence induced by ultraviolet B irradiation in human dermal fibroblasts. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(3), 321-328.

Martínez-Gil A, Del Alamo-Sanza M, Sánchez-Gómez R, Nevares I. Different Woods in Cooperage for Oenology: A Review. *Beverages*. 2018; 4(4):94. <https://doi.org/10.3390/beverages4040094>

Mayer, F., Kemnitz, I., Fitze, G., & Haase, M. G. (2021). Dynamics of caspase activation upon UV induced genotoxic injury. *International Journal of Radiation Biology*, 97(3), 394-400.

Melese, Y. Y., & Kolech, S. A. (2021). Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, objectives, and future strategies of breeding in Ethiopia. *Sustainability*, 13(19), 10814.

Melguizo-Rodríguez, L., Acedo, A. G., Illescas-Montes, R., García-Recio, E., Ramos-Torrecillas, J., Costela-Ruiz, V. J., & García-Martínez, O. (2022). Biological properties of olive tree and its derivatives on the skin. *Food & Function*.

Melguizo-Rodríguez, L., de Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Illescas-Montesa, R., Costela-Ruiz, V. J., & García-Martínez, O. (2021). Potential effects of phenolic compounds that can be found in olive oil on wound healing. *Foods*, 10(7), 1642.

Menicacci, B., Cipriani, C., Margheri, F., Mocali, A., & Giovannelli, L. (2017). Modulation of the senescence-associated inflammatory phenotype in human fibroblasts by olive phenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2275.

Middleton, P., Stewart, F., Al-Qahtani, S., Egan, P., O'Rourke, C., Abdulrahman, A., ... & Sarker, S. D. (2005). Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (2), 101-103.

- Montes de Oca, M. K., Pearlman, R. L., McClees, S. F., Strickland, R., & Afaq, F. (2017). Phytochemicals for the prevention of photocarcinogenesis. *Photochemistry and photobiology*, 93(4), 956-974.
- Moreno, N. C., Garcia, C. C. M., Munford, V., Rocha, C. R. R., Pelegrini, A. L., Corradi, C., ... & Menck, C. F. M. (2019). The key role of UVA-light induced oxidative stress in human Xeroderma Pigmentosum Variant cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 131, 432-442.
- Morocho-Jácome, A. L., Freire, T. B., de Oliveira, A. C., de Almeida, T. S., Rosado, C., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2021). In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds—A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 20(3), 729-737.
- Mouret, S., Bogdanowicz, P., Haure, M. J., Castex-Rizzi, N., Cadet, J., Favier, A., & Douki, T. (2011). Assessment of the photoprotection properties of sunscreens by chromatographic measurement of DNA damage in skin explants. *Photochemistry and photobiology*, 87(1), 109-116.
- Narbutt, J., Wolska, H., Kaszuba, A., Langner, A., Lesiak, A., Maj, J., ... & Zegarska, B. (2018). Photoprotection. Recommendations of the Polish Dermatological Society. Part 1: ultraviolet radiation and sunscreens. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*, 105(1), 19-29.
- Navarra, G., Moschetti, M., Guarrasi, V., Mangione, M. R., Militello, V., & Leone, M. (2017). Simultaneous determination of caffeine and chlorogenic acids in green coffee by UV/Vis spectroscopy. *Journal of Chemistry*, 2017.
- Ngoc, L. T. N., Tran, V. V., Moon, J. Y., Chae, M., Park, D., & Lee, Y. C. (2019). Recent trends of sunscreen cosmetic: an update review. *Cosmetics*, 6(4), 64.
- Nikpayam, O., Roshan, H., Sohrab, G., & Sedaghat, M. (2018). Effects of green coffee extract supplementation on oxidative stress, systemic and vascular inflammation in patients with metabolic syndrome: a randomized clinical trial. *Iran Red Crescent Med J*, 20(6).
- Noh, E. M., Lee, G., Lim, C. H., Kwon, K. B., Kim, J. M., Song, H. K., ... & Lee, Y. R. (2022). Protective effects of Evodiae Fructus extract against ultraviolet-induced MMP-1

and MMP-3 expression in human dermal fibroblasts. *Journal of Herbal Medicine*, 35, 100586.

Nunes, A., Gonçalves, L., Marto, J., Martins, A. M., Silva, A. N., Pinto, P., ... & Ribeiro, H. M. (2021). Investigations of olive oil industry by-products extracts with potential skin benefits in topical formulations. *Pharmaceutics*, 13(4), 465.

Nunes, A., Marto, J., Gonçalves, L., Martins, A. M., Fraga, C., & Ribeiro, H. M. (2022). Potential therapeutic of olive oil industry by-products in skin health: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(1), 173-187.

Ochiai, R., Jokura, H., Suzuki, A., Tokimitsu, I., Ohishi, M., Komai, N., ... & Ogihara, T. (2004). Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. *Hypertension Research*, 27(10), 731-737.

Oh, H., Ko, E. K., Kim, D. H., Jang, K. K., Park, S. E., Lee, H. S., & Kim, Y. C. (2003). Secoiridoid glucosides with free radical scavenging activity from the leaves of *Syringa dilatata*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(4), 417-419.

Oh, J. H., Karadeniz, F., Kong, C. S., & Seo, Y. (2020). Antiphotodamage effect of 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid against UVA-induced skin damage by protecting human dermal fibroblasts in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7756.

Özcan, M. M., & Matthäus, B. (2017). A review: Benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243(1), 89-99.

Park, J. B. (2013). Isolation and quantification of major chlorogenic acids in three major instant coffee brands and their potential effects on H₂O₂-induced mitochondrial membrane depolarization and apoptosis in PC-12 cells. *Food & Function*, 4(11), 1632-1638.

Parrado, C., Philips, N., Gilaberte, Y., Juarranz, A., & González, S. (2018). Oral photoprotection: effective agents and potential candidates. *Frontiers in medicine*, 5, 188.

Parzonko, A., & Kiss, A. K. (2019). Caffeic acid derivatives isolated from *Galinsoga parviflora* herb protected human dermal fibroblasts from UVA-radiation. *Phytomedicine*, 57, 215-222.

- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Pissavini, M., Ferrero, L., Alard, V., Heinrich, U., Tronnier, H., & Kockott, D. (2003). Determination of the in vitro SPF. *Cosmetics and toiletries*, 118(10), 63-72.
- Pittayapruerk, P., Meehansan, J., Prapapan, O., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2016). Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 868.
- Poljšak, B., & Fink, R. (2014). The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- Poon, F., Kang, S., & Chien, A. L. (2015). Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 31(2), 65-74.
- Pratiwi, L. Coffea: The Application of green Components in Cosmetics Formulation. *Majalah Obat Tradisional*, 26(3), 174-187.
- Qabaha, K., Al-Rimawi, F., Qasem, A., & Naser, S. A. (2018). Oleuropein is responsible for the major anti-inflammatory effects of olive leaf extract. *Journal of medicinal food*, 21(3), 302-305.
- Rahman, N. S. A., Hassan, M., Hamid, N. I., Mohamad, S. A., Mohamad, N., Mahadi, M., ... & Rozila, I. (2021). Antioxidative and photoprotective effects of *Pleurotus flabellatus* (pink oyster mushroom) polysaccharides against UVA radiation-induced cytotoxicity in human dermal fibroblast (HS-27) cell line. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 17, 185-191.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Restivo, I., Tesoriere, L., Frazzitta, A., Livrea, M. A., Attanzio, A., & Allegra, M. (2020). Anti-Proliferative Activity of A Hydrophilic Extract of Manna from *Fraxinus angustifolia* Vahl through Mitochondrial Pathway-Mediated Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Colon Cancer Cells. *Molecules*, 25(21), 5055.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), 545-589.

Rizzo, J. L., Dunn, J., Rees, A., & Runger, T. M. (2011). No formation of DNA double-strand breaks and no activation of recombination repair with UVA. *Journal of investigative dermatology*, 131(5), 1139-1148.

Rodrigues, R., Oliveira, M. B. P. P., & Alves, R. C. (2023). Chlorogenic Acids and Caffeine from Coffee By-Products: A Review on Skincare Applications. *Cosmetics*, 10(1), 12.

Rui, Y., Zhaohui, Z., Wenshan, S., Bafang, L., & Hu, H. (2019). Protective effect of MAAs extracted from *Porphyra tenera* against UV irradiation-induced photoaging in mouse skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 192, 26-33.

Rundlof, A. K., Arner, E. S. (2004). Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxidants & redox signaling*, 6(1), 41–52.

Ryřava, A., iřkova, K., Frankova, J., Roubalova, L., Ulrichova, J., Vostalova, J., ... & Svobodova, A. R. (2020). Effect of UVA radiation on the Nrf2 signalling pathway in human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111948.

Saewan, N. (2022). Effect of coffee berry extract on anti-aging for skin and hair—In vitro approach. *Cosmetics*, 9(3), 66.

Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of cosmetic dermatology*, 14(1), 47-63.

Saguie, B. O., Martins, R. L., da Fonseca, A. D. S., Romana-Souza, B., & Monte-Alto-Costa, A. (2021). An ex vivo model of human skin photoaging induced by UVA radiation compatible with summer exposure in Brazil. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 221, 112255.

- Salian, A., Dutta, S., & Mandal, S. (2021). A roadmap to UV-protective natural resources: Classification, characteristics, and applications. *Materials Chemistry Frontiers*.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2022). Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflammation Research*, 1-15.
- Salucci, S., Burattini, S., Curzi, D., Buontempo, F., Martelli, A. M., Zappia, G., Falcieri, E., & Battistelli, M. (2014). Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 141, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.004>
- Samadi, M., Mohammadshahi, M., & Haidari, F. (2015). Green coffee bean extract as a weight loss supplement. *J Nutr Disorders Ther*, 5(4), 1-3.
- Sander, C. S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C. S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2002). Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(4), 618-625.
- Santhra Krishnan, P., Salian, A., Dutta, S., & Mandal, S. A roadmap to UV-protective natural resources: classification, characteristics, and applications.
- Sarfraz, I., Rasul, A., Jabeen, F., Younis, T., Zahoor, M. K., Arshad, M., & Ali, M. (2017). Fraxinus: a plant with versatile pharmacological and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Saw, C. L. L., Yang, A. Y., Huang, M. T., Liu, Y., Lee, J. H., Khor, T. O., ... & Kong, A. N. T. (2014). Nrf2 null enhances UVB-induced skin inflammation and extracellular matrix damages. *Cell & bioscience*, 4(1), 1-7.
- Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens. *Photochemistry and Photobiology*, 29(3), 559-566.
- Schallreuter, K. U., & Wood, J. M. (2001). Thioredoxin reductase—its role in epidermal redox status. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 64(2-3), 179-184.

- Seo, S. W., Park, S. K., Oh, S. J., & Shin, O. S. (2018). TLR4-mediated activation of the ERK pathway following UVA irradiation contributes to increased cytokine and MMP expression in senescent human dermal fibroblasts. *PLoS One*, *13*(8).
- Shah, H., Mahajan, S.R. (2013). Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. *Biomedicine & Aging Pathology*, *3*, 161-169.
- Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., & Lankin, V. Z. (2021). Hydroperoxide-reducing enzymes in the regulation of free-radical processes. *Biochemistry (Moscow)*, *86*(10), 1256-1274.
- Shimoda, M., (2019). Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue micro environment. *Advances in Clinical Chemistry*, *88*, 35-66.
- Shinada, H., Watanabe, T., Okudaira, K., Iwase, Y., Nishi, K., & Yumita, N. (2019). Apoptosis Induced by Ultraviolet A Exposure in the Presence of Enoxacin in HL-60 Cells. *Anticancer Research*, *39*(2), 687-693.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, *21*(7), 363-383.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, *175*(1), 184-191.
- Souza, C., Mônico, D. A., & Tedesco, A. C. (2020). Implications of dichlorofluorescein photoinstability for detection of UVA-induced oxidative stress in fibroblasts and keratinocyte cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *19*, 40-48.
- Sudeep, H. V., & Shyam Prasad, K. (2021). Supplementation of green coffee bean extract in healthy overweight subjects increases lean mass/fat mass ratio: A randomized, double-blind clinical study. *SAGE Open Medicine*, *9*.
- Sulistiwati, S., Awalia, H., Yasmin, U., Dwi, R. S., & Namira, A. (2022). The effect of semendo coffee on the number of fibroblast cells in gingiva wound of rats. *B-Dent: Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah*, *9*(1), 19-25.

Sumiyoshi, M., & Kimura, Y. (2010). Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice. *Phytotherapy research : PTR*, 24(7), 995–1003.

Tattini, M., Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Goti, A., Pollastri, S., Bellasio, C., ... & Agati, G. (2014). Esculetin and esculin (esculetin 6-O-glucoside) occur as inclusions and are differentially distributed in the vacuole of palisade cells in *Fraxinus ornus* leaves: A fluorescence microscopy analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 28-35.

Thiele, J.J., Traber, M.G., Re R., Espuno, N., Yan, L.J., Cross C.E., Packer, L., (1998). Macromolecular carbonyls in human stratum corneum: a biomarker for environmental oxidant exposure?. *FEBS letters*, 422, 403-406.

Thuong, P. T., Hung, T. M., Ngoc, T. M., Ha, D. T., Min, B. S., Kwack, S. J., ... & Bae, K. (2010). Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure–activity relationships. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(1), 101-106.

Tiwari, V., & Wilson III, D. M. (2019). DNA damage and associated DNA repair defects in disease and premature aging. *The American Journal of Human Genetics*, 105(2), 237-257.

Tzekaki, E. E., Tsolaki, M., Geromichalos, G. D., & Pantazaki, A. A. (2021). Extra Virgin Olive Oil consumption from Mild Cognitive Impairment patients attenuates oxidative and nitrative stress reflecting on the reduction of the PARP levels and DNA damage. *Experimental Gerontology*, 156, 111621.

Ulrich-Merzenich, G., Hartbrod, F., Kelber, O., Müller, J., Koptina, A., & Zeitler, H. (2017). Salicylate-based phytopharmaceuticals induce adaptive cytokine and chemokine network responses in human fibroblast cultures. *Phytomedicine*, 34, 202-211.

Utami, N. D., Nordin, A., Katas, H., Bt Hj Idrus, R., & Fauzi, M. B. (2020). Molecular action of hydroxytyrosol in wound healing: an in vitro evidence-based review. *Biomolecules*, 10(10), 1397.

Walters, C., Keeney, A., Wigal, C. T., Johnston, C. R., & Cornelius, R. D. (1997). The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens. *Journal of chemical education*, 74(1), 99.

Wang, A. S., & Dreesen, O. (2018). Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Frontiers in Genetics*, 9, 247.

Wang, P. W., Hung, Y. C., Lin, T. Y., Fang, J. Y., Yang, P. M., Chen, M. H., & Pan, T. L. (2019). Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry. *Antioxidants*, 8(12), 569.

Wang, X., Dong, C., Zhou, Q., Duan, H., Zou, D., Gong, Y., ... & Shi, W. (2021). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 protects against UVA-induced oxidative damage in corneal endothelium. *Apoptosis*, 26, 600-611.

Wang, X., Hong, H., & Wu, J. (2019). Hen collagen hydrolysate alleviates UVA-induced damage in human dermal fibroblasts. *Journal of Functional Foods*, 63, 103574.

Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., ... & Liu, H. X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*, 11(10), 4839.

Wischermann, K., Popp, S., Moshir, S., Scharfetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., de Gruijl, F., Hartschuh, W., Greinert, R., Volkmer, B., Faust, A., Rapp, A., Schmezer, P., & Boukamp, P. (2008). UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene*, 27(31), 4269–4280.

Wondrak, G. T., Jacobson, M. K., & Jacobson, E. L. (2006). Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochemical & photobiological sciences*, 5(2), 215-237.

Yamamoto, M., Clark, J. D., Pastor, J. V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., ... & Kuro-o, M. (2005). Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 38029-38034.

Yang, E. J., Kim, S. I., Ku, H. Y., Lee, D. S., Lee, J. W., Kim, Y. S., ... & Song, K. S. (2010). Syringin from stem bark of *Fraxinus rhynchophylla* protects A β (25–35)-induced toxicity in neuronal cells. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 531-538.

- Yenisetti, S. C. (2016). Beneficial role of coffee and caffeine in neurodegenerative diseases: A minireview. *AIMS Public Health*, 3(2), 407.
- Yokoyama, H., Mizutani, R. (2014). Structural biology of DNA (6-4) photoproducts formed by ultraviolet radiation and interactions with their Winding proteins. *International journal of molecular sciences*, 15, 20321-20338.
- Yong, H. J., & Ahn, J. J. (2018). Antioxidant and skin protection effect of morin upon UVA exposure. *Biomedical Dermatology*, 2(1), 1-7.
- Zahra, K. F., Lefter, R., Ali, A., Abdellah, E. C., Trus, C., Ciobica, A., & Timofte, D. (2021). The involvement of the oxidative stress status in cancer pathology: a double view on the role of the antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
- Zhang, B., Xu, J., Quan, Z., Qian, M., Liu, W., Zheng, W., ... & Song, N. (2018). Klotho protein protects human keratinocytes from UVB-induced damage possibly by reducing expression and nuclear translocation of NF- κ B. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 8583.
- Zhang, M., Zhang, T., Tang, Y., Ren, G., Zhang, Y., & Ren, X. (2020). Concentrated growth factor inhibits UVA-induced photoaging in human dermal fibroblasts via the MAPK/AP-1 pathway. *Bioscience Reports*, 40(7).
- Zhen, A. X., Piao, M. J., Kang, K. A., Fernando, P. D. S. M., Kang, H. K., Koh, Y. S., & Hyun, J. W. (2019). Esculetin prevents the induction of matrix metalloproteinase-1 by hydrogen peroxide in skin keratinocytes. *Journal of Cancer Prevention*, 24(2), 123.

17. Dorobek naukowy

Publikacje:

1. Machała, P.; Liudvytska, O.; Kicel, A.; Dziedzic, A.; Olszewska, M.A.; Żbikowska, H.M. Valorization of the Photo-Protective Potential of the Phytochemically Standardized Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract in UVA-Irradiated Human Skin Fibroblasts. *Molecules* **2022**, *27*, 5144. <https://doi.org/10.3390/molecules27165144>.

Udział w konferencjach naukowych:

1. X Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i rozwój, Wrocław 20.11.2019; plakat: Charakterystyka właściwości biologicznych ekstraktu z liści oliwki (*Olea europaea*).
2. VI Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne Eskulap, Lublin, 30.11.2019; plakat: Charakterystyka właściwości biologicznych ekstraktu z ziaren zielonej kawy.
3. National Scientific Conference Knowledge – Key to Success 4rd edition, Toruń, 18.01.2020; prezentacja ustna (wyróżnienie): Biological properties of extracts from bark and leaves of *Fraxinus Excelsior* L.
4. III Ogólnopolska Konferencja Naukowa Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych, Lublin, 05.09.2020; plakat: Jesion koreański (*Fraxinus rhynchophylla* L.) – właściwości biologiczne.
5. III Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Pierwotne i wtórne metabolity roślin i grzybów”, 15.12.2020; prezentacja ustna: „Właściwości fotoochronne ekstraktu z liści oliwki (*Olea europaea*)”.
6. National Scientific Conference Knowledge – Key to Success 5th edition, 23.01.2021; prezentacja ustna: „Role of Green coffee Bean Extract in skin fibroblasts response to UVA radiation”.
7. XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2021 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 25-28.03.2021; prezentacja ustna: „Działanie antyoksydacyjne związków aktywnych zawartych w ekstrakcie z liści *Olea europaea*”.

8. VI Ogólnopolska Konferencja Nauk o Życiu BioOpen, 15-16.04.2021; poster: „Wpływ wybranych ekstraktów roślinnych na indukowane promieniowaniem UVA zmiany poziomu metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w fibroblastach skóry”.
9. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka i pasja kluczem do sukcesu”, 11.06.2021; prezentacja ustna: „Wpływ ekstraktu z ziaren zielonej kawy na indukowane promieniowaniem UVA zmiany poziomu metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w fibroblastach skóry”.
10. XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2022 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 24-27.03.2022r., prezentacja ustna: „Wpływ ekstraktu z ziaren zielonej kawy ma aktywację kaspazy-3,-8,-9 wywołaną promieniowaniem UVA w fibroblastach skóry”.
11. II Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów US 2.0 "MKDUS 2.0", 22-24.06.2022r., prezentacja ustna: „Molekularne mechanizmy fotostarzenia skóry – szlaki sygnalizacyjne aktywowane na skutek działania promieniowania UV”.

Szkolenia naukowe potwierdzone certyfikatem uczestnictwa:

Kursy doskonalące teoretyczne CMPK:

1. Rola mikroRNA w procesie nowotworzenia (01-708/0-00-029-2020) – 03.03.2020r.
2. Podstawy molekularne i genetyczne oraz aspekty immunologiczne chorób nowotworowych (01-708/0-00-001-2020) – 16.03.2020r.
3. Przepływ informacji genetycznej od genu do białka (01-708/0-00-034-2020) – 22.05.2020r.
4. Immunoematologia (01-708/0-00-006-2020) – 22.06.2020-26.06.2020r.
5. Techniki molekularne w schorzeniach immunologicznych i w transplantologii (01-708/0-00-003-2020) – 29-30.09.2020r.
6. Podstawy immunologii (01-708/0-00-009-2020) – 29.10.2020r.
7. Wybrane zagadnienia z molekularnych podstaw onkogenezy (01-708/0-00-028-2020) – 03.11.2020r.
8. Wpływ hormonów tarczycy na otyłość i zaburzenia metaboliczne – aspekty kliniczne i molekularne (01-741/0-00-019-2020) – 24-25.11.2020r.
9. Jesienna szkoła prawa medycznego – „prawo w pandemii” (01-730/0-00-083-2020) – 28.11.2020r.

10. Wybrane zagadnienia z laboratoryjnej diagnostyki endokrynologicznej. Diagnostyka laboratoryjna chorób tarczycy (01-741/0-00-020-2020) – 30.11.2020-02.12.2020r.
11. Prowadzenie badań naukowych i dobre praktyki publikacyjne w medycynie (01-705/0-00-098-2020) – 07-08.12.2020r.
12. Rola laboratorium w diagnostyce choroby nowotworowej (01-708/0-00-043-2020) – 11.12.2020r.
13. Diagnostyka wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych (01-708/0-00-055-2020) – 12-13.12.2020r.
14. Hormony tarczycy: wybrane zagadnienia kliniczne i molekularne (01-741/0-00-009-2021) – 09-10.02.2021r.
15. Innowacyjne metody biologiczne w diagnostyce i leczeniu nowotworów (01-700/0-00-009-2021) – 15.02.2021r.
16. Rak nerki: wybrane zagadnienia kliniczne i molekularne (01-708/0-00-019-2021) – 19.03.2021r.
17. Wybrane zagadnienia z diagnostyki laboratoryjnej przewlekłych schorzeń wątroby (01-708/0-00-009-2021) – 22-23.03.2021r.
18. Diagnostyka biochemiczna i laboratoryjna zaburzeń lipidowych (01-741/0-00-042-2021) – 12.04.2021r.
19. Metody immunochemiczne w praktyce laboratoryjnej (01-708/0-00-012-2021) – 14-16.04.2021r.
20. Badania laboratoryjne a profilaktyka chorób cywilizacyjnych (01-708/0-00-018-2021) – 27.05.2021r.
21. Trudności w interpretacji wyników badań laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce zaburzeń endokrynologicznych (01-741/0-00-040-2021) – 21.06.2021r.
22. Diagnostyka biochemiczna i molekularna chorób tarczycy (01-741/0-00-013-2021) – 23.06.2021r.
23. Diagnostyka laboratoryjna chorób autoimmunizacyjnych (01-708/0-00-010-2021) – 29.09.2021-01.10.2021r.
24. Wpływ hormonów tarczycy na otyłość i zaburzenia metaboliczne – aspekty kliniczne i molekularne (01-708/0-00-008-2021) – 07-08.10.2021r.
25. Wybrane zagadnienia z diagnostyki laboratoryjnej przewlekłych schorzeń jelit (01-708/0-00-017-2021) – 25-26.10.2021r.
26. Przeciwciała w diagnostyce serologicznej wybranych zakażeń (01-708/0-00-014-2021) – 25.11.2021r.

27. Mutacje w endokrynologii (01-741/0-00-012-2021) – 09.12.2021r.
28. Postępy w diagnostyce laboratoryjnej chorób układu endokrynnego i zaburzeń metabolicznych (01-741/0-00-048-2021) – 08-10.11.2021r.
29. Metodologia badań w medycynie i projektowanie nieinterwencyjnych badań naukowych (01-705/0-00-023-2022) – 08-09.03.2022r.
30. Rak tarczycy: wybrane zagadnienia kliniczne i molekularne (01-754/0-00-014-2022) – 11.03.2022 r.
31. Podłoże molekularne i kliniczne choroby Hashimoto: diagnostyka i leczenie (01-708/0-00-014-2022) – 19.05.2022r.
32. Molekularne i kliniczne aspekty infekcji wirusowych (01-700/0-00-003-2022) – 25.05.2022 r.,

Kursy doskonalące praktyczne:

1. Podstawy techniki immunoenzymatycznej ELISA - kurs praktyczny (01-708/0-00-028-2021) – 26.11.2021r.
2. Technika blotingu w diagnostyce autoimmunizacyjnych chorób układu pokarmowego (01-708/0-00-022-2021) – 14.12.2021r.

Działalność popularyzująca naukę:

1. Udział w przeprowadzeniu wyborów uzupełniających na Przedstawiciela do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, jako członek Komisji rekrutacyjnej (2019).
2. W ramach akcji „Uniwersytet Zawsze Otwarty” współprowadzenie zajęć dla uczniów szkoły podstawowej: „Wykrywanie aktywności enzymatycznej w materiale biologicznym” (2019)
3. Pomoc w organizacji III Krajowej Naukowo-Szkoleniowej Konferencji Biobanków Polskich (2020).
4. Udział w promocji Wydziału BiOŚ poprzez udział w Nocy Biologów (2020).
5. Pomoc w organizacji VI Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen.
6. Członkostwo w Sekcji Genetycznej SKNB – czynny udział w jego funkcjonowaniu (2019/2020)