

Streszczenie

W części teoretycznej dysertacji pt.: „*Drosera spatulata* Labill. z kultur *in vitro* jako źródło związków o spodziewanym działaniu biologicznym”, przedstawiono charakterystykę roślin mięsożernych (owadożernych), rodziny *Droseraceae*, rodzaju *Drosera* L. i tytułowego gatunku *Drosera spatulata* Labill, jak również dokonano przeglądu doniesień literaturowych dotyczących składu i aktywności biologicznej związków występujących w rodzaju *Drosera* – w szczególności naftochinonów oraz kultur *in vitro* roślin z rodzaju *Drosera*.

W części doświadczalnej pracy prowadzono kultury *in vitro* *D. spatulata*, badania fitochemiczne materiału roślinnego uzyskanego z tych kultur oraz badania aktywności biologicznej wybranych ekstraktów wyodrębnionych związków, otrzymanych z tego materiału.

Kultury *in vitro* zapoczątkowano z wysterylizowanych powierzchniowo nasion i prowadzono je na rozcieńczonej pożywce Murashige–Skoog’a (1/2 MS) bez regulatorów wzrostu. Siewki rozwijały się w pełne rośliny w okresie 3-5 miesięcy. Odcięte z nich pędy boczne (rozetki liściowe) i liście, służyły jako eksplantaty, na których w wyniku odpowiednio rozwoju pąków bocznych lub organogenezy, uzyskano kolejne rośliny w okresie 2 miesięcy. Rośliny zakwitwały i owocowały dając nasiona, które nadawały się do uzyskiwania nowych roślin.

W części fitochemicznej pracy przeprowadzono badania pędów i korzeni z roślin z kultur *in vitro* stosując ekstrakcję surowca świeżego, świeżego poddanego dezintegracji w ekstrahencie oraz suszonego w temp. 40° C.

Ekstrakty metanolowe ze świeżych pędów (rozetek liściowych) i korzeni wykazywały bardzo podobny skład związków fenolowych obejmujący znane dla gatunku flawonoidy, pochodne kwasu elagowego oraz glukozyd naftalenowy – rossolizyd

(4-*O*- β -glukozyd 7-metylo-1,4,5-trihydroksynaftalenu). Frakcje chloroformowe tych ekstraktów wykazywały wg chromatografii cienkowarstwowej (TLC) również podobny skład, z tym że korzenie zawierały obok znanego dla gatunku naftochinonu – 7-metylojuglonu, również w śladowych ilościach jego izomer – plumbaginę (2-metylojuglon) - związek nowy dla gatunku (**związek 2**), często spotykany w rodzaju *Drosera*, którego obecność potwierdzono analizą NMR i GC-MS. Z frakcji

chloroformowych ekstraktów z pędów i korzeni, wyodrębniono 7-metylojuglon (**związek 1**), nowy dla gatunku triterpenoid – kwas 3-*O*-acetyloaleuritolowy (**związek 3**) oraz mieszaninę nowych dla rodzaju *Drosera* steroli – β -sitosterolu (**związek 4**) i stigmasterolu (**związek 5**); struktury chemiczne tych związków potwierdzono metodami widmowymi 1D NMR (^1H , ^{13}C , DEPT), 2D NMR (^1H - ^1H -COSY, HSQC, HMBC) oraz GC-MS.

Z pędów *D. spatulata* wyodrębniono czysty rossolizydu (**związek 6**) stosując dwa nowe, alternatywne sposoby oczyszczania metodą chromatografii kolumnowej – albo na sefadesie LH-20 - stosując elucję acetonem lub na silanizowanym żelu krzemionkowym (RP-2) - stosując elucję mieszaniną metanol-woda. Tożsamość i czystość próbek rossolizydu potwierdzono analizą 1D i 2D NMR. Wyodrębniono również nowy dla gatunku 4-*O*- β -glukozyd kwasu 3,3'-dimetyloelagowego (**związek 8**), który zidentyfikowano na podstawie widm 1D i 2D NMR oraz widm UV z odczynnikami jonizującymi.

W pędach suszonych w temperaturze 40° C stwierdzono brak rossolizydu i wyodrębniono z nich metodą chromatografii kolumnowej produkty jego utlenienia – 5-*O*- β -glukozyd 2-metylnaftazaryny (5,8-dihydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon) (**związek 7**), którego strukturę potwierdzono analizą 1D i 2D NMR, po raz pierwszy przeprowadzoną w roztworze CD_3OD , a nie w $\text{DMSO}-d_6$, jak również wyodrębniono 2-metylnaftazarynę (**związek 9**), którą zidentyfikowano analizą ^1H NMR.

Świeże pędy poddano dezintegracji w heksanie i ekstrakcji tym rozpuszczalnikiem. Suchy ekstrakt heksanowy, według oznaczeń metodą chromatografii gazowej (GC), zawierał znacznie więcej 7-metylojuglonu (433,14 mg/g) niż frakcja chloroformowa z materiału nie poddanego dezintegracji (6,82 mg/g), przy czym zawartość tego związku w odniesieniu do świeżej tkanki roślinnej wynosiła odpowiednio 0,478 mg/g i 0,163 mg/g. Prawie trzykrotne zwiększenie wydajności 7-metylojuglonu przypisano hydrolizie rossolizydu pod wpływem endogennej β -glukozydazy, co potwierdzał brak rossolizydu w dezintegrowanym materiale.

Ponadto, w wyciągach metanolowych ze świeżych oraz suszonych w temp. 40°C pędów i korzeni oznaczono zawartość sumy polifenoli (metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu) oraz sumy kwasów fenolowych (metodą z odczynnikiem Arnova), obydwa w przeliczeniu na kwas elagowy.

W badaniach aktywności biologicznej – działanie przeciwpłatkowe *in vitro* na pięć szczepów *Mycobacterium tuberculosis* wykazał 7-metylojuglon (MIC = 0,25 µg/ml), co jest znane z literatury, i bogaty w ten związek (43%) ekstrakt heksanowy ze świeżych dezintegrowanych pędów (MIC = 0,25 µg/ml), natomiast kwas 3-*O*-acetyloaleuritolowy oraz wyciągi i ich frakcje z pędów i korzeni, wykazywały słabe działanie - MIC = 100 µg/ml.

Zbadano aktywność antyoksydacyjną, przeciwwolnorodnikową, w teście spektrofotometrycznym ze stałym wolnym rodnikiem DPPH, wyciągów metanolowych ze świeżych i suszonych pędów i korzeni, która była słabsza (IC₅₀ w zakresie 2,16 – 2,67 mg/ml), niż wzorcowej witaminy C (IC₅₀ = 4,01 µg/ml).

Przeprowadzono również badania wpływu kwasu 3-*O*-acetyloaleuritolowego i rossolizydu na linie komórek nowotworowych – raka szyjki macicy (HeLaWT), raka piersi (MCF-7) i raka okrężnicy (HT-29) oraz komórek prawidłowych gruczołu piersiowego (MCF12A). Aktywność hamującą rozwój komórek nowotworowych wykazał kwas 3-*O*-acetyloaleuritolowy (IC₅₀ 2,26 – 4,23 µM) w zależności od czasu ekspozycji. Natomiast rossolizyd wpływał bardziej hamująco na rozwój komórek prawidłowych niż nowotworowych.

Poznań, 03.02.2017r.

Jedele Kędziak