Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny *Cistus × incanus* L.

Aneta Starzec¹, Maciej Włodarczyk¹, Iwona Urbanowicz², Izabela Fecka¹

¹ Katedra i Zakład Farmakognozji i Leku Roślinnego, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

² Katedra Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Aneta Starzec, Katedra i Zakład Farmakognozji i Leku Roślinnego, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław; e-mail: aneta.starzec@student.umed.wroc.pl

Źródła finansowania

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu; grant nr: SUB.D110.19.005

Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2020.11.16

Zaakceptowano: 2020.12.21

Opublikowano on-line: 2021.01.05

DOI

10.32383/farmpol/132057

ORCID

Aneta Starzec (ORCID id: 0000-0002-5001-9696)

Maciej Włodarczyk (ORCID id: 0000-0002-8437-2711)

Iwona Urbanowicz (ORCID id: 0000-0002-9489-322X)

Izabela Fecka (ORCID id: 0000-0002-1139-4581)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie, na licencji CC BY NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Characteristics, therapeutic and health-promoting potential of *Cistus × incanus* L.

One of the modern nutritional trends is to enthusiastically look for natural products that can be considered functional food and be a source of ingredients with a health-promoting effect. Today, many food manufacturers offer *Cistus × incanus* leaves to prepare common self-preparations (e.g., infusions) or as ready-to-use dietary supplements. *Cistus × incanus* (rock rose, pink rock-rose, hoary rock-rose), belonging to the family *Cistaceae*, is widespread in Mediterranean countries. For many years, cistus extracts and its aromatic resin have been used in traditional Middle East medicine to treat, among others, colds, fever, stomach problems, and skin wounds. In past years, this plant was rediscovered by the public. Due to the growing popularity of *Cistus* products, the most recent scientific literature on this subject is reviewed here. This article aims to present the latest research results on the phytochemical composition of *Cistus × incanus* and the impact of its consumption on human health. Particular emphasis is put on antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, and antiproliferative activities and support of digestive system functions. Studies have shown that the main active ingredients of *Cistus × incanus* are flavonoid compounds, including flavonol glycosides (myricetin, quercetin, kaempferol), flavan-3-ols, and tannins. It was demonstrated that the presence of these compounds determines the therapeutic and health-promoting properties of cistus leaves and its products. That applies primarily to a strong antioxidant effect, which may reduce the risk of noncommunicable diseases, including cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, and cancer. *Cistus* preparations are also recommended as immunostimulants, supporting the treatment of bacterial and viral infections. Labdanum oleoresin and essential oil are a valuable source of substances with strong antibacterial and anti-inflammatory properties, which can be used in the future in the production of pharmaceutical and cosmetic preparations, and also serve as a natural food preservative.

Keywords: *Cistus × incanus*, health-promoting properties, polyphenols, antioxidant properties, labdanum, essential oil.

© Farm Pol, 2020, 76(11): 647–664

Wstęp

Czystek szary (*Cistus × incanus* L.) to wieczniezielony krzew należący do rodziny *Cistaceae*. Naturalnie występuje w regionie basenu Morza Śródziemnego, gdzie wraz z innymi krzewami tworzy zarośla makii. Przygotowywane z jego liści napary i wyciągi, a także pozyskiwana z czystka oleożywica (balsam) i olejek eteryczny, były przez wiele lat wykorzystywane w medycynie tradycyjnej do leczenia różnych stanów chorobowych, m.in. przeziębienia, gorączki, problemów żołądkowo-jelitowych, uszkodzeń i ran skóry. Obecnie badania naukowe koncentrują się na szczególnej identyfikacji składników chemicznych ekstraktów, oleożywicy i olejku z czystka szarego. Ponadto, porównuje się chemizm i własności terapeutyczne gatunków i odmian spotykanych w handlu. Poddając ocenie ich skład oraz aktywności biologiczne i farmakologiczne, można przewidywać wynikające z nich właściwości lecznicze bądź prozdrowotne.

Badania fitochemiczne z wykorzystaniem technik chromatograficznych i spektroskopowych wykazały, że głównymi składnikami czynnymi w wyciągach z *C. incanus* są związki flawonoidowe, w tym glikozydy flawonoli (mirycetyny, kwercetyny, kemferolu), flawan-3-ole (katechina, epikatechina, galokatechiny), proantocyjanidyny i garbniki hydrolizujące. Balsam i olejek eteryczny bogate są w związki terpenowe, przede wszystkim diterpeny typu labdanu (tlenek manoilu, tlenek 13-*epi*-manoilu, sklareol). Wymienione metabolity warunkują właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, spazmolityczne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe oraz wzmacniające układ odpornościowy, co może pozwolić na zastosowanie *C. incanus* jako środka obniżającego ryzyko wystąpienia niektórych przewlekłych chorób niezakaźnych oraz wspomagającego leczenie infekcji i różnych dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego.

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie wybranych leczniczych i prozdrowotnych właściwości czystka szarego oraz jego podgatunków – *C. incanus* ssp. *incanus*, *C. incanus* ssp. *corsicus*, *C. incanus* ssp. *creticus*, na podstawie przeglądu prac naukowych dostępnych w bazach PubMed, GoogleScholar i Scopus. Przenalizowano prace o charakterze przeglądowym oraz oryginalne prace badawcze, w językach polskim i angielskim, z lat 1991–2020. Do wyszukiwania publikacji używano następujących słów kluczowych i ich kombinacji w języku polskim, czystek, czystek szary, czystek kretański, oleożywica labdanum, właściwości lecznicze/prozdrowotne,

działanie przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, cytotoksyczne, oraz ich odpowiedników w języku angielskim.

Charakterystyka botaniczna i występowanie gatunku

Cistaceae (czystkowate, syn. posłonkowate) to średniej wielkości rodzina należąca do rzędu *Malvales* (ślazowe), składająca się z ośmiu rodzajów – *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea* i *Tuberaria* – obejmujących łącznie około 180 gatunków krzewów i roślin zielnych [1–3]. W piśmiennictwie naukowym można odnaleźć informacje, że rodzaj *Cistus* L. (czystek) liczy, zależnie od podejścia botanicznego, od 16 do 28 gatunków, jednak obecnie przyjmuje się, że rodzaj ten obejmuje ich ok. 20. Pierwsza klasyfikacja taksonomiczna została utworzona przed 1800 r. (Linneusz, 1753), a doprecyzowano ją w 1993 r. (Demoly i Montserrat) [1, 3]. Obecnie klasyfikacja rodzaju *Cistus* opiera się na obserwacjach fenotypowych, w tym na cechach morfologicznych, takich jak kształt i liczba nerwów, kolor i kształt włosków na liściach i łodygach oraz na cechach reprodukcyjnych, takich jak: liczba płatków i działek kielicha, kształt i kolor kwiatów, kształt i wielkość owoców [1, 2]. Dodatkowo stosuje się porównania jądrowych (*ncpGS*, *ITS*) i plastydowych (*trnL-trnF*, *trnK-matK*, *trnS-trnG*, *rbcl*) sekwencji DNA. Wyróżnia się 3 podrodzaje *Cistus*: *Cistus*, o kwiatach fioletowych oraz *Leucocistus* i *Halimoides* o kwiatach białych [1, 3, 4]. Ze względu na występowanie polimorfizmu i tworzenie hybryd między pokrewnymi gatunkami, częstym zjawiskiem jest występowanie licznych podgatunków [2]. Schematyczny podział rodzaju przedstawiono w tabeli 1.

Czystek szary (rycina 1) znany jest pod kilkoma spolszczonymi anglojęzycznymi nazwami zwyczajowymi, m.in. róża skalna (ang. *rock-rose*, *pink rock-rose*, *hoary rock-rose*) lub róża święta (ang. *holly-rose*). Uważa się, że jest mieszańcem dwóch gatunków: *C. albidus* L. i *C. crispus* L. [6]. W piśmiennictwie często wymieniany jest również jako podgatunek czystka kretańskiego (*C. creticus* L.) lub rzadziej jako czystek szorstki (*C. villosus* L.) [2, 7]. W naturze występują jego 3 podgatunki – *C. incanus* ssp. *incanus* (*C. creticus* ssp. *eriocephalus*), *C. incanus* ssp. *corsicus*, *C. incanus* ssp. *creticus* [8]. Gatunki z rodzaju *Cistus* są szeroko rozpowszechnione w regionie Morza Śródziemnego. Teren jego występowania obejmuje obszary od Wysp Kanaryjskich i Madery po Kaukaz i Izrael, w tym półwyspy Iberyjski, Apeniński,

Tabela 1. Podział taksonomiczny rodzaju *Cistus* L., w oparciu o dane konsorcjum WFO [5].

Table 1. Taxonomic classification of the genus *Cistus* L., based on WFO data [5].

g. <i>Cistus</i> L.		
sg. <i>Cistus</i>	sg. <i>Leucocistus</i> Willk.	sg. <i>Halmioides</i> (Willk.) Demoly & P. Monts.
sect. <i>Cistus</i>	sect. <i>Ladanium</i> (Spach) Gren. ex Gren. & Godr.	<i>C. clusii</i> Dunal
<i>C. albidus</i> L.	<i>C. ladanifer</i> L.	<i>C. libanotis</i> L.
<i>C. creticus</i> L.	<i>C. laurifolius</i> L.	<i>C. munbyi</i> Pomel
<i>C. crispus</i> L.		
<i>C. heterophyllus</i> Desf.	sect. <i>Ledonia</i> Dunal ex DC.	
<i>C. × incanus</i> L.	<i>C. grancanariae</i> Marrero Rodr., R. S. Almeida & C. Ríos	
	<i>C. inflatus</i> Pourr. ex Demoly	
sect. <i>Macrostylia</i> Willk.	<i>C. monspeliensis</i> L.	
<i>C. asper</i> Demoly & R. Mesa	<i>C. parviflorus</i> Lam.	
<i>C. chinamadensis</i> Bañares & P. Romero	<i>C. populi folius</i> L.	
<i>C. horrens</i> Demoly	<i>C. psilosepalus</i> Sweet	
<i>C. osbeckiifolius</i> Webb	<i>C. salviifolius</i> L.	
<i>C. palmensis</i> Bañares & Demoly	<i>C. sintenisii</i> Litard. (syn. <i>C. albanicus</i> E. F. Warb. ex Heywood)	
<i>C. symphytifolius</i> Lam. (syn. <i>C. ochreatus</i> C. Sm. ex Buch)		
	sect. <i>Stephanocarpoidea</i> Rouy & Foucaud	
	<i>C. pouzolzii</i> Delile ex Gren. & Godr.	

g., genus – rodzaj; sg., subgenus – podrodzaj; sect., sectio – sekcja

Bałkański, Krym i Azję Mniejszą oraz Afrykę Północną [1]. Czystek szary, spotykany w handlu, najczęściej pozyskiwany jest w Grecji, Albanii i Turcji [6]. Rodzaj *Cistus* stanowi ważny element półsuchych ekosystemów basenu Morza Śródziemnego. Najczęściej rośliny te tworzą gęste zarośla, na suchych, otwartych, mocno nasłonecznionych terenach z piaszczystym, kamiennym lub wapiennym podłożem [1, 2]. Spotkać je można również jako dominujący gatunek podszycia lasów sosnowych i dębowych oraz w suchych pasmach górskich do 1200 m n.p.m. [1, 9].

Rośliny z rodzaju *Cistus* to wieloletnie, małe, drewniejące krzewy sięgające około 1,5 metra wysokości. Od pędu głównego odchodzą rozłożyste pędy boczne, na których wyrastają naprzeciwległe liście. W zależności od gatunku mogą być one proste lub faliste, ogonkowe lub siedzące, o długości 2–8 cm. Zwykle ich powierzchnia jest lekko szorstka, owłosiona. Kwiaty są aktynomorficzne, obupłciowe ze słupkiem dolnym, z trzema lub pięcioma działkami kielicha, umieszczonymi przeciwległe do płatków korony [9]. Kwiaty są efemeryczne, stymulowane porannym światłem i w zależności od gatunku przyjmują kolory od białego do ciemnoróżowego i fioletowego. Liście, łodygi i kielich pokryte są włoskami (trichomami). Włoski mogą być proste lub gwiazdziste (liczba ramion jest zależna od gatunku), niegruczołowe lub gruczołowe – zawierające olejki eteryczne oraz oleożywicę zwaną labdanum (syn. ladanum,

Rycina 1. *Cistus × incanus* L. (autor: Aneta Starzec).

Figure 1. *Cistus × incanus* L. (author: Aneta Starzec).

Rycina 2. Włoski *C. incanus*: A – gwiazdzisty, B – gruczołowy. Fotografia spod mikroskopu świetlnego w powiększeniu $\times 40$ [15].
Figure 2. *C. incanus* trichomes: A – stellate, B – glandular. Brightfield microphotograph at $\times 40$ magnification [15].

gr. *λαδανο*), która odpowiada za charakterystyczny aromatyczny zapach tych roślin (**rycina 2**) [1].

C. incanus jest krzewem osiągającym ok. metr wysokości [7]. Posiada krzewiaste i mocno rozgałęzione pędy. Gałęzie pokryte są gęsto włoskami. Szypułki kwiatowe są krótkie, zwykle jednokwiatowe. Kielich pięciopodziałowy, kosmkowo owłosiony [10]. Spodczkowate kwiaty składające się z 5 różowych, pofalowanych płatków, z małą żółtą plamką w pobliżu podstawy, pojawiają się od maja do czerwca [7, 11]. Liczne jasnożółte pręciki otaczają główkowate znamię słupka, którego szyjka jest gładka, smukła i wyższa od pręcików. Pyłek kwiatowy jest jasnopomarańczowego koloru [1, 10]. Liście tego gatunku są bezszypułkowe, owalne lub jajowate, pofalowane, zwężające się w kierunku podstawy. Pokryte są białym kutnerem, który z wiekiem organu odpada [10]. Liście poszczególnych podgatunków czystka szarego mogą się różnić wymiarami oraz kształtem brzegów. U *C. incanus* ssp. *incanus* liście osiągają wymiary 25–50 mm $\times$ 15–30 mm i posiadają gładze brzegi, podczas gdy *C. incanus* ssp. *creticus* charakteryzuje się mniejszymi liśćmi o wymiarach 15–25 mm $\times$ 8–15 mm i falistym brzegiem [8]. Dodatkowo u *C. incanus*, a także innych gatunków z rodzaju *Cistus*, obserwuje się występowanie dymorfizmu sezonowego, który umożliwia przetrwanie letnich upałów i suszy [1, 12, 13]. Zimowe pędy u czystka szarego są średnio 14 razy dłuższe niż te rozwijane latem. Pędy letnie posiadają mniejszą liczbę gęsto osadzonych małych liści, podczas gdy na długich pędach zimowych występują liście o większych powierzchniach. Przekroje poprzeczne liści również wykazują różnice

anatomiczne. Odnotowano, że zimowe liście są płaskie, natomiast liście występujące w lecie posiadają karbowaną blaszkę, która ulega częściowo podwinięciu. W okresie zimowym górne komórki skórki są znacznie większe, a miękisz palisadowy znacznie grubszy niż w sezonie letnim. Jednakże latem, tkanka asymilacyjna (palisadowa) często jest obecna po obu stronach blaszki, a komórki mezofilu i przestrzenie międzykomórkowe znacznie mniejsze, co zwiększa zwartość budowy [12, 13]. W obu sezonach aparaty szparkowe występują tylko na dolnej powierzchni liścia, jednak zimą są one równomiernie rozmieszczone na skórcie, a w lecie występują głównie w kryptach [13]. Z każdej strony liście pokryte są warstwą włosków. Bez względu na sezon, spodnia część zawiera ich więcej niż górna, a ich gęstość jest zwiększona w cieplejszym okresie. Dodatkowo, zimą włoski zbudowane są z mniejszej liczby komórek gwiazdzistych, przez co liście wydają się bardziej zielone [12, 13].

Jak wspomniano wcześniej, kształt i ilość włosków wykorzystuje się w celu odróżnienia poszczególnych podgatunków *C. incanus*. Za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. *scanning electron microscope*, SEM), przeprowadzono analizę topografii powierzchni 3 podgatunków czystka szarego. Podgatunki *incanus* i *corsicus* na górnej części liścia posiadają podobny zwarty układ włosków gwiazdzistych, które mają od 8 do 18 ramion. Spodnia część liścia jest również gęsto pokryta włoskami, ale nie wykazują one szczególnych różnic między podgatunkami i nie mają znaczenia taksonomicznego. Włoski tych dwóch podgatunków różnią się długością. U czystka szarego waha się ona w granicach

100–300 µm, a u korsykańskiego osiągają wartości 150–400 µm. Zupełnie inny układ włosków obserwuje się w przypadku *C. incanus* ssp. *creticus*, gdzie zarówno na górnej, jak i dolnej powierzchni liścia włoski gwiazdkiste są rzadziej rozmieszczone i odznaczają się mniejszą liczbą ramion (6–12) o długości 100–300 µm. Włoski wydzielnicze występujące we wszystkich 3 podgatunkach i charakteryzują się identycznym wyglądem – posiadają podłużny trzon zakończony główką o długości od 100 do 250 µm. Najwięcej tych włosków występuje u czystka korsykańskiego [14].

Charakterystyka składu chemicznego rodzaju *Cistus*

W rodzaju *Cistus* występuje bardzo duża różnorodność metabolitów wtórnych. Pełny skład chemiczny nie jest jeszcze znany. Dostępne dane pokazują, że zawartość poszczególnych składników różni się w zależności od gatunku i podgatunku, miejsca pochodzenia, czynników środowiskowych, okresu zbioru oraz warunków uprawy i przechowywania. Czystki charakteryzują się obecnością substancji aktywnych o charakterze hydrofilowym i lipofilowym takich jak wielofenole (polifenole) i terpeny. Wśród polifenoli zidentyfikowano liczne flawonoidy z grupy flawonoli (glikozydy mirycetyny, kwercetyny i kemferolu), flawan-3-oli i ich oligomerów (pochodnych katechiny, epikatechiny i galokatechiny), garbników hydrolizujących i kwasów fenolowych. Liście i łodygi wszystkich gatunków *Cistus* sp. zawierają olejki eteryczne oraz brązowiejącą oleożywicę, która składa się z terpenów, a w szczególności diterpenów [1, 2]. W przeglądzie obejmującym 10 gatunków z rodzaju *Cistus*, za pomocą metod metabolomicznych, wykazano występowanie ok. 733 substancji chemicznych, w tym 397 terpenów (101 monoterpenów, 178 seskwiterpenów i 118 diterpenów), 162 związków o charakterze fenylopropanoidowym (128 flawonoidów, 17 fenoli i 12 garbników), 24 węglowodory, 35 kwasów tłuszczowych, 36 związków karbonylowych oraz 18 fitohormonów i witamin [1].

Oleożywica i olejek eteryczny

Rośliny z rodzaju *Cistus* wydzielają z włosków gruczołowych, obecnych na powierzchni liści, łodyg i kielicha, wysoce aromatyczną oleożywicę zwaną labdanum lub ladanum. Olejek eteryczny pozyskiwany jest bezpośrednio z balsamu lub z części nadziemnych czystka przez destylację z parą wodną. Charakteryzuje się on żółtym zabarwieniem i posiada bardzo silny zapach, z tego powodu jest jednym z cenniejszych surowców dla przemysłu perfumeryjnego [9, 16]. Metodą

Farmakopei Polskiej VI (2002), z użyciem aparatu Derynga, oszacowano, że zawartość olejku eterycznego w kilku partiach ziela *C. incanus* przeznaczonego do zaparzania, dostępnych w Polsce, wahała się na poziomie 0,04–0,12 ml/100 g suchego surowca [6, 17]. Hydrodestylacja rozdrobionych liści czystka szarego, standaryzowaną metodą opisaną w Farmakopei Europejskiej 6.0 (2008), wykazała, że zawartość olejku wahała się w granicach 0,09–0,12% [18]. Wcześniejsze doniesienia naukowe dotyczące zawartości olejku eterycznego w różnych podgatunkach czystka szarego metodą destylacji z parą wodą, w oparciu o Farmakopeę Grecką (1989), szacują zawartość olejku na 0,4% dla czystka szarego i 0,6% dla czystka kreteńskiego [19, 20]. Czynniki, które mogą mieć wpływ na zawartość olejku eterycznego to między innymi: czynniki genetyczne, wiek rośliny, czynniki środowiskowe, czas i miejsca zbioru, jakość surowca, warunki przechowywania surowca oraz stopień rozdrobnienia surowca do destylacji [6, 17, 21]. Wpływają one również na różnice w zawartości poszczególnych związków chemicznych w olejkach eterycznych takich jak: kwasy, estry, aldehydy, ketony i węglowodory, wśród których przeważają diterpeny (18–75%) [22], następnie seskwiterpeny (3–44%) [21, 22], monoterpeny (1–10%) [21, 22] oraz ich pochodne. Do tej pory w czystku kreteńskim zidentyfikowano ogółem 92 terpeny, w tym 36 monoterpenów, 35 seskwiterpenów i 21 diterpenów, natomiast w czystku szarym – 47 terpenów, które obejmowały 17 monoterpenów, seskwiterpenów i 11 diterpenów typu labdanu [1]. Do głównych monoterpenów, oznaczonych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas, w olejku eterycznym z czystka można zaliczyć: α-pinen (1–3%), β-pinen (0,5–4%), eukaliptol (0,5–6%), kamfen (< 0,5%), tymol (0,5–4%) i karwakrol (1–13%) [11, 16–19]. Z obecnych seskwiterpenów można wyróżnić: β-kariofilen (do 1,6%), tlenek kariofilenu (do 0,8%), kubenol (do 2%), izomery wiridiflorolu (do 7%) i kadinenu (do 3%) [11, 17–20, 23]. Zarówno w żywicy, olejku, jak i w częściach nadziemnych *C. incanus* występują pochodne diterpenów, głównie typu labdanu (**rycina 3**). W największej ilości występuje tlenek manoilu (4–15%) [17] i jego izomery – tlenek 13-*epi*-manoilu (7–29%) [17] i tlenek 8-*epi*-manoilu (9–25%) [24]. Ponadto, sklareol (do 10%) [17], labda-7,13(*E*)-dien-15-ol (do 5%) [21], tlenek 3β-hydroksy-13-*epi*-manoilu [25], tlenek 3β-acetoksy-13-*epi*-manoilu [25]. Kwasy tłuszczowe mają wysoki udział w składzie olejku eterycznego (37–68%) [22, 23] i są reprezentowane przez kwas linolenowy (ok. 39%), palmitynowy (ok. 15%) oraz linolowy (13%) [22].

Rycina 3. Diterpeny obecne w labdanum, oleożywicy pozyskiwanej z czystków: A-(+)-tlenek 13-*epi*-manoilu, B-(+)-tlenek manoilu, C-(-)-sklareol.

Figure 3. Diterpens present in labdanum, (an oleoresin obtained from *Cistus* sp.): A-(+)-13-*epi*-manoyl oxide, B-(+)-manoyl oxide, C-(-)-sclareol.

Wielofenole (polifenole) roślinne

Produkty z *C. incanus* uważane są za bogate źródło polifenoli, które warunkują niektóre z właściwości tej rośliny. Tak samo jak w przypadku zawartości składników w olejku eterycznym i żywicy, ilość polifenoli, w tym flawonoidów jest zależna od wielu czynników. W jednym z badań wyciągi wodno-metanolowe (80% V/V) przygotowane z suszonych i sproszkowanych części nadziemnych (liście, łodygi, kwiaty) z *C. incanus* pochodzącego z Syrii, charakteryzowały się całkowitą zawartością polifenoli (TPC, ang. *total phenolic content*) na poziomie $68 \pm 4,68$ mg w przeliczeniu na kwas galusowy (GAE, ekwiwalent kwasu galusowego) na gram suchej masy produktu (GAE/g s.m.). Oznaczenie przeprowadzono z użyciem metody Folina-Ciocalteu, powszechnie stosowanej w tego typu badaniach. Natomiast całkowita zawartość flawonoidów (ang. *total flavonoid content*, TFC) w tych samych ekstraktach, mierzona metodą spektrofotometryczną z użyciem chlorku glinu, wynosiła $11 \pm 0,34$ mg w przeliczeniu na ekwiwalent rutozydu (rutyny; RUE/g s.m.) [26]. W innym badaniu oznaczano TPC i TFC w 15 produktach komercyjnych czystka szarego pochodzących z różnych krajów (Turcja, Cypr, Albania oraz produkty o nieznanym pochodzeniu). Przygotowano wyciągi wodne według zaleceń producentów (1 g ziela zalewano 100 ml wrzącej wody i parzono przez 15 min.). W celu uzyskania 80%

wyciągów wodno-metanolowych przeprowadzono ekstrakcje 1 g surowca w łaźni ultradźwiękowej. Ogólną zawartość polifenoli oszacowano na 4–272 mg GAE/g s.m. dla naparów i 2–148 mg GAE/g s.m. dla ekstraktów wodno-metanolowych. Produkty o nieznanym pochodzeniu zawierały najmniejszą ilość wielofenoli w obu rodzajach ekstraktów, natomiast *C. incanus* pochodzenia tureckiego charakteryzował się najwyższą zawartością tych związków. Zawartość flawonoidów ogółem zmierzono za pomocą metody opisanej w Farmakopei Europejskiej IV (2002), wg monografii *Betulae folium*. Wyniki zostały przeliczone na ekwiwalent kwercetyny i wynosiły do 3 mg QE/g s.m. dla wyciągów wodno-metanolowych i 2–4 mg QE/g s.m. dla wyciągów wodnych [27]. Analizowano również części nadziemne czystka szarego pochodzącego z Bułgarii. Przygotowano 30% wyciągi wodno-etanolowe (1:20, m/V), a ekstrakcję prowadzono przez 80 min w temperaturze pokojowej. Zawartość polifenoli oznaczano metodą Folina-Ciocalteu w odniesieniu do czasu ekstrakcji (5–500 min.). Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent kwasu galusowego (36–115 mg GAE/g s.m.), pirogalolu (27–87 mg PE/g s.m.) oraz w przeliczeniu na taniinę (72–229 mg TE/g s.m.). Najniższą wartość polifenoli zanotowano w 5. min ekstrakcji, a najwyższą po 6,5 godzinach. Całkowita zawartość flawonoidów w wyciągach etanolowych została zmierzona metodą z chlorkiem glinu oraz wyrażona jako ekwiwalenty kwercetyny (41–120 mg QE/g s.m.), rutozydu (20–60 mg RUE/g s.m.) i (+)-katechiny (6–18 mg CE/g s.m.). Największe ich ilości odnotowano również w 390. min ekstrakcji [28]. W tym samym badaniu naukowcy zauważyli także różnicę ilości polifenoli i flawonoidów ogółem w ekstraktach z liści zbieranych w sezonie zimowym i letnim. Liście letnie charakteryzowały się prawie 2-krotnie większą zawartością związków aktywnych niż liście zimowe [28]. Podobną zależność udokumentowali również Dimcheva i wsp. [29] dla składników takich jak: kwas galusowy, (–)-epigalokatechina,

Tabela 2. Zawartość polifenoli i flawonoidów w liściach *C. incanus* w sezonie letnim i zimowym, według [29].

Table 2. The content of polyphenols and flavonoids in leaves of *C. incanus* in the summer and winter seasons, according to [29].

Składniki i ich całkowita zawartość przeliczeniowa	Lato [mg/g s.m.]	Zima [mg/g s.m.]
Polifenole	GAE, ekwiwalent kwasu galusowego	85,73
	TE, ekwiwalent taniiny	169,92
	PE, ekwiwalent pirogalolu	64,54
Flawonoidy	QE, ekwiwalent kwercetyny	81,77

s.m. – sucha masa

mirycetyna. Nie odnotowano jej dla kemferolu i rutozydu, których wartości były porównywalne lub wyższe w sezonie zimowym [29]. Poszczególne różnice w zawartości TPC, TFC i niektórych składników zależnych od pory roku w liściach *C. incanus* przedstawiono w tabeli 2.

Spośród polifenoli występujących w czystku szarym najliczniejszą grupę stanowią flawonoidy, wśród których głównymi są flawonole, flawony występują w niższym stężeniu. Zidentyfikowano wolne aglikony flawonoli takich jak: mirycetyna, kwercetyna i kemferol oraz ich liczne formy glikozydowe (glukozydy, galaktozydy, glukuronidy/glukuronozyny, ramnozydy, ksylozydy, arabinozydy i in.) (rycina 4). Przypuszcza się, że obecność flawonoli w rodzaju *Cistus* jest uwarunkowana klimatem śródziemnomorskim, w którym występuje intensywne nasłonecznienie. Związki te, absorbując znaczne ilości promieniowania UV, chronią roślinę przed jego szkodliwym działaniem [29–32].

Do najczęściej identyfikowanych glikozydów mirycetyny zalicza się: 3-O-glukozyd mirycetyny [29–31], 3-O-ramnozyd mirycetyny (mirycetryna) [30], 3-O-galaktozyd mirycetyny [31, 33] oraz bliżej niezidentyfikowane: ksylozyd mirycetyny [31] i ramnozyd-heksozyd mirycetyny [33]. Wśród glikozydów kwercetyny wyróżnia się: 3-O-glukozyd kwercetyny (izokwercetryna) [30], 3-O-ramnozyd kwercetyny (kwercetryna), 3-O-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd), 3-O-ksylozyd kwercetyny, 3-O-arabinozyd kwercetyny [30, 33], 3-O-rutynozyd kwercetyny (rutozyd, rutyna) oraz 7-O-heksozydo-3-O-rutynozyd kwercetyny [34]. Do glikozydów kemferolu występujących w czystku szarym należą: 3-O-glukozyd kemferolu (astragalina) [33], 3-O-galaktozyd kemferolu (trifolina), 3-O-rutynozyd kemferolu (nikotyfloryna) [34, 35], bliżej niezidentyfikowany O-ramnozydo-O-heksozyd kemferolu [23]. Dodatkowo, zidentyfikowano obecność glikozydoestrów flawonoidowych, których głównym przedstawicielem jest tilirozyd (3-O-β-(6"-O-p-kumaroilo)-glukozyd kemferolu) występujący w formie *cis* i *trans* [33, 35–37].

Flawonole występują głównie w formie monomerycznej lub jako oligomery. Wśród flawan-3-oli, obecnych w *C. incanus*, wskazuje się obecność następujących związków: (+)-katechiny [34, 35, 37, 38], (-)-katechiny [29], (-)-epikatechiny [29, 34, 35, 37], (-)-galokatechiny [35, 37], (-)-epigalokatechiny [29, 34, 35], 3-O-galusanu(-)-katechiny [37], 3-O-galusanu(-)-epikatechiny, 3-O-galusanu(-)-galokatechiny [37, 39], 3-O-galusanu(-)-epigalokatechiny. Problemатyczne wydaje się raportowanie w wielu pracach identyfikacji wyłącznie jednej z izomerycznych form poszczególnych

	R1	R2	R3
Mirycetyna	-OH	-OH	-H
Mirycetryna	-OH	-OH	-Rha
3-O-galaktozyd mirycetyny	-OH	-OH	-Gal
Kwercetyna	-OH	-H	-H
Kwercetryna	-OH	-H	-Rha
Izokwercetryna	-OH	-H	-Glc
Rutozyd (Rutyna)	-OH	-H	-Glc(6"-1'')Rha
Hiperozyd	-OH	-H	-Gal
Kemferol	-H	-H	-H
Astragalina	-H	-H	-Glc
Trifolina	-H	-H	-Gal
Nikotyfloryna	-H	-H	-Glc(6"-1'')Rha
Tilirozyd	-H	-H	-Glc(6"-O-p-Cou)

Glc – glukoza; Gal – galaktoza; Rha – ramnoza; p-Cou – p-kumaroil

Rycina 4. Główne flawonoidy zidentyfikowane w *C. incanus*.

Figure 4. The main flavonoids identified in *C. incanus*.

flawan-3-oli (np. (+)- lub (-)-katechiny), gdy autorzy nie dysponują kompletem wzorców lub stosownym detektorem (np. polarymetrycznym).

Formy oligomeryczne flawan-3-oli nazywane są inaczej proantocyjanidynami i klasyfikowane jako garbniki niehydrolizujące (skondensowane). W czystku szarym są to głównie dimeryczne procyanidyny B₁ (epikatechino-(4β→8)-katechyna) [40] i B₃ (katechino-(4α→8)-katechyna), dimeryczne prodelphinidyny jak prodelphinidyna B₃ (galokatechino-(4α→8)-galokatechyna) [33, 34, 40–42], galokatechino-(4α→6)-galokatechyna [31, 35, 41], katechino-(4α→8)-galokatechyna [31, 35, 40, 41] oraz trimery: prodelphinidyna C₂ (galokatechino-(4α→8)-galokatechino-(4α→8)-katechyna) [39, 41], galokatechino-(4α→8)-galokatechino-(4α→8)-galokatechyna, galokatechino-(4α→6)-galokatechino-(4α→8)-galokatechyna, 3-O-galusan epigalokatechino-(4β→8)[3-O-galusanu] epigalokatechino-(4β→8)-galokatechiny [40].

Kolejną grupą związków wielofenolowych są kwasy fenolowe, dokładniej hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego (tabela 3). Występują one najczęściej w postaci związanej z innymi fenolokwasami lub alkoholkwasami, tworząc depsydy lub z cukrami, tworząc

Rycina 5. Garbniki hydrolizujące zidentyfikowane w *C. incanus*; A – punikalina, B – punikalagina.

Figure 5. Hydrolyzable tannins identified in *C. incanus*; A – punicalin, B – punicalagin.

glikozydy. W jednym z badań oznaczono całkowitą zawartość kwasów fenolowych w 80% ekstraktach wodno-metanolowych oraz w naparach za pomocą metody opisanej w Farmakopei Polskiej VI (2002). Wyniki zostały przeliczone na ekwiwaleń kwasu kawowego (CAE) na gram suchej masy. W naparach, ilość kwasów fenolowych wahała się w granicach 6–20 mg CAE/g s.m., natomiast ekstrakty alkoholowe charakteryzowały się nieco niższą ich zawartością – do 18 mg CAE/g s.m. [27]. Uważa się, że spośród związków tej grupy, w czystku szarym i jego podgatunkach obecne są głównie pochodne kwasu benzoesowego – kwas galusowy oraz jego didepsyd kwas elagowy. Oba kwasy są podstawowymi składnikami garbników hydrolizujących – galotanoidów i elagotanoidów. W *C. incanus* zidentyfikowano przede wszystkim elagotanoidy z rzadkim ugrupowaniem galagilowym (ang. *gallagyl*) w cząsteczce – punikalinę, punikalaginę oraz pochodną punikalaginy (**rycina 5**) [23, 33]. Spośród pochodnych kwasu cynamonowego, wykazano natomiast obecność kwasu *p*-kumarrowego, kawowego, ferulowego, synapinowego i chlorogenowego [27, 32, 37]. W **tabeli 3** przedstawiono zawartość wybranych związków polifenolowych w naparach i ekstraktach wodno-metanolowych z czystka szarego.

Właściwości lecznicze i prozdrowotne czystka szarego

Pozyskiwane z rodzaju *Cistus* nadziemne części (kwiaty, liście, łodygi) zalicza się do surowców

zielarskich i farmaceutycznych. Czystek szary, ani inne gatunki z tego rodzaju nie są ujęte w oficjalnych lekospisach czy farmakopeach europejskich, jednakże z roku na rok rośnie zainteresowanie tym gatunkiem. Jest to związane ze wzrostem liczby doniesień w piśmiennictwie naukowym na temat właściwości leczniczych i profilaktycznych tej rośliny oraz popularyzacją wiedzy na temat jej wieloletnich zastosowań w tradycyjnej medycynie Bliskiego Wschodu, w szczególności w medycynie tureckiej, a także greckiej i włoskiej [1, 2]. Napary i wyciągi oraz balsam były używane do leczenia przeziębienia, dolegliwości ze strony układu pokarmowego, zwłaszcza w biegunkach i chorobie wrzodowej żołądka. Wykorzystywano je także jako środki przyspieszające gojenie ran, przeciwzapalne w chorobach skóry, schorzeniach reumatycznych i stanach zapalnych nerek. Obecnie przetwory z czystka wykorzystuje się w profilaktyce wielu chorób przewlekłych, m.in. cukrzycy, chorób układu sercowo-naczyniowego czy chorób neurodegeneracyjnych [1, 2]. Rekomendowane są jako środki o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, przeciwgrzybicznym, antyproliferacyjnym oraz wzmacniającym układ odpornościowy [2, 6, 27]. Olejek eteryczny z czystka został zatwierdzony w USA przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drugs Administration*, FDA) jako dodatek do żywności i substancja aromatyzująca [18]. Przeprowadzone badania naukowe nad właściwościami tej rośliny, potwierdzają niektóre z tradycyjnych zastosowań, a także wskazują nowe profile

aktywności biologicznej oraz odkrywają związki czynne odpowiedzialne za poszczególne działania [1]. W poniższej części artykułu omówione zostały wybrane działania lecznicze i prozdrowotne *C. incanus*.

Działanie przeciwutleniające

Rośliny klimatu śródziemnomorskiego, w tym *C. incanus*, narażone są na wiele stresogennych czynników, szczególnie w okresie letnim, kiedy niedobory wody występują jednocześnie z wysokim nasłonecznieniem i temperaturami. Takie warunki sprzyjają występowaniu silnego stresu oksydacyjnego oraz wytwarzaniu wielu reaktywnych form tlenu (pol. RFT; ang. *reactive oxygen species*, ROS). Nadmierne ilości RFT powodują zachwianie homeostazy komórkowej, uszkodzenie DNA oraz peroksydację lipidów i białek [35]. U ludzi stres oksydacyjny oraz RFT, pochodzące ze źródeł endogennych, jak i egzogennych, są traktowane jako czynniki etiologiczne przewlekłych chorób niezakaźnych takich jak: choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne (ch. Parkinsona, ch. Alzheimer) czy nowotwory [2, 43]. Stres oksydacyjny indukuje aktywację układów obronnych opartych na działaniu enzymów przeciwutleniających (takich jak: dysmutaza nadadtlenkowa, katalaza, peroksydaza), a także na wzmożonej produkcji metabolitów wtórnych posiadających działanie antyoksydacyjne. Związki wielofenolowe, a w szczególności flawonoidy, mają zdolność neutralizowania RFT, chelatowania metali przejściowych i pułapkowania reaktywnych dikarbonyli (glioksal, metyloglioksal), w efekcie zmniejszają peroksydację lipidów oraz chronią białka i DNA przed interakcją z szeroką gamą metabolitów. Oddziałują także na kinazy białkowe, które związane są z kluczowymi etapami wzrostu i różnicowaniem komórek [1, 2, 34, 42, 74]. Działania te mogą zmniejszać ryzyko inicjacji i rozwoju niektórych chorób, dlatego też czystek szary oraz jego podgatunki są polecane przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. *European Food Safety Authority*, EFSA) jako bogate źródło związków polifenolowych oraz naturalny środek o działaniu przeciwutleniającym [44].

Działanie przeciwutleniające (redukujące) wyciągów z *C. incanus* udowodniono w wielu badaniach za pomocą testów laboratoryjnych takich jak: DPPH, FRAP i ABTS. W teście DPPH ekstrakty wodno-metanolowe z czystka charakteryzowały się silnymi właściwościami redukującymi (IC_{50} ~18 µg/ml), porównywalnymi do kwasu askorbinowego (IC_{50} ~15 µg/ml). Wyciągi octanowe wykazywały umiarkowaną aktywność

Tabela 3. Zawartość wybranych związków polifenolowych w ekstraktach wodnych i wodno-metanolowych z *C. incanus* [27, 37, 42].

Table 3. Content of selected polyphenolic compounds in aqueous and water-methanol extracts from *C. incanus* [27, 36, 41].

Składniki polifenolowe i ich zawartość	Ekstrakty wodno-metanolowe [mg/g s.m.]	Ekstrakty wodne/Napary [mg/g s.m.]
Flawonole		
Mirycetyna	0,10–0,36 ^a [27]	1,44–1,79 [27]
Kwercetyna	0,04–0,50 ^a [27]	0,85–1,17 [27]
Kemferol	0,03–0,08 ^a [27]	0,05–0,07 [27]
Kwercytryna	0,68 ^b [42]	B.D.
Izokwercytryna	0,03–0,70 ^a [27]	0,86–1,19 [27]
Rutozyd (Rutyna)	0,01–0,75 ^a [27]	0,24–0,77 [27]
Flawony		
Cynarozyd	0,006–0,62 ^a [27]	0,11–0,61 [27]
Flawanole		
Galokatechina	0,003 ^b [42]	0,73–2,10 [37]
Katechina	B.D.	0,15–0,51 [37]
Epikatechina	0,10 ^b [42]	0,007–0,01 [37]
3-O-Galusan epigalokatechiny	B.D.	0,05–0,23 [37]
3-O-Galusan galokatechiny	B.D.	0,001–0,02 [37]
3-O-Galusan epikatechiny	B.D.	0,007–0,01 [37]
3-O-Galusan katechiny	B.D.	0,002–0,003 [37]
Kwasy fenolowe		
Kwas galusowy	0,01–0,17 ^a [27]	0,20–0,89 [27]
Kwas protokatechowy	B.D.	0,14–0,18 [37]
Kwas wanilinowy	0,005–0,09 ^a [27]	0,05–0,09 [27]
Kwas syringowy	0,03–0,43 ^a [27]	0,006–0,01 [37]
Kwas elagowy	0,12–0,39 ^a [27]	0,05–0,35 [27]
Kwas p-kumarowy	0,069–0,45 ^a [27]	0,12–0,13 [27]
Kwas kawowy	0,01–0,81 ^a [27]	0,02–0,35 [27]
Kwas ferulowy	0,05–0,78 ^a [27]	0,004–0,06 [37]
Kwas synapowy	B.D.	0,001–0,009 [37]
Kwas chlorogenowy	0,07–0,29 ^a [27]	0,01–0,41 [37]

Proporcje woda: metanol: ^a 2:8; ^b 4:6; B.D. – brak danych.

antyoksydacyjną (IC_{50} ~329 µg/ml), natomiast heksanowe nie wykazywały tej aktywności w badanym zakresie stężeń [45]. Zauważono, że silniejszym działaniem charakteryzują się 30% wodno-metanolowe wyciągi z liści i łodyg w stosunku do wyciągów uzyskanych z nasion. Co więcej, wyciągi z liści pozyskanych w sezonie letnim wykazywały większą zdolność neutralizowania RFT (IC_{50} ~144 µg/ml) w teście DPPH, w przeliczeniu na ekwiwalent troloksu (ang. *trolox equivalent*, TRE), niż liście z okresu zimowego (IC_{50} ~202 µg/ml). Odnotowano również, że większa aktywność przeciwutleniająca była silnie powiązana z całkowitą ilością polifenoli [28]. Wyciągi wodno-etanolowe (50% V/V) z bułgarskiego czystka o wyższej zawartości polifenoli ogółem charakteryzowały się większą aktywnością

antyoksydacyjną. Autorzy sugerują, że 67% zdolności przeciwutleniającej badanych ekstraktów wynika z obecności związków polifenolowych. Pozostałą aktywność przypisują innym metabolitom wtórnym, takim jak terpeny (w tym składniki olejku, karoteny) i witaminy [46]. Zależność pomiędzy siłą działania antyoksydacyjnego (przeciwrodnikowego) a całkowitą zawartością polifenoli odnotowano także w badaniu na wyciągach wodnych oraz 80% wodno-metanolowych uzyskanych z produktów czystka szarego, przy użyciu testów DPPH i FRAP. Wartości DPPH dla ekstraktów wodno-metanolowych i wodnych wynosiły odpowiednio 20–97 $\mu\text{mol TRE/g s.m.}$ i 2–97 $\mu\text{mol TRE/g s.m.}$ W teście FRAP wartości mieściły się w zakresach 3–169 $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$ dla ekstraktów wodno-metanolowych i 10–148 $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$ dla ekstraktów wodnych. Zarówno napary, jak i wyciągi metanolowe o większej zawartości polifenoli ogółem posiadały silniejsze działanie antyoksydacyjne w obu testach. Dodatkowo, autorzy uznali, że na właściwości antyoksydacyjne ma wpływ pochodzenie surowca, ponieważ produkty pochodzenia tureckiego i albańskiego charakteryzowały się wyższą zawartością polifenoli ogółem niż produkty z Cypru lub o nieznanym pochodzeniu [27, 47]. Analiza frakcji polifenolowych pozyskanych z ekstraktu z czystka szarego potwierdziła, że za właściwości przeciwutleniające odpowiadają głównie flawonole. Frakcja octanowa, bogata w tę grupę związków, wykazywała silniejsze właściwości neutralizowania RFT w teście DPPH ($\text{IC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$) niż frakcje wodne, które zawierały głównie proantocyjanidyny o różnym stopniu polimeryzacji ($\text{IC}_{50} \sim 12$ i $11 \mu\text{M}$). Wyniki porównywano z substancją wzorcową – mirycytryną ($\text{IC}_{50} \sim 0,68 \mu\text{M}$) [35]. Dzięki zastosowaniu techniki LC-DAD/ESI-MS/MS, Riehle i wsp. [31] zidentyfikowali 32 związki fenolowe w wodnym wyciągu czystka szarego, które następnie ocenili pod kątem zdolności antyoksydacyjnej. Autorzy wykorzystali metodę LC-online TEAC, która umożliwia szacunkowe przypisanie udziału poszczególnych składników wyciągu w ogólnej zdolności wyciągu do neutralizacji RFT (po wykonaniu mikrofrakcjonowania wyciągu za pomocą HPLC). Najwyższą aktywnością charakteryzowała się mirycytryna (395 $\mu\text{M TRE}/100 \text{ g}$ naparu), co stanowiło 24% całkowitej aktywności przeciwutleniającej wszystkich związków zidentyfikowanych w naparze. Dużą zdolnością do usuwania rodników cechowały się kolejno: heksahydroksydifenilo-glukoza, galokatechina, kwas galusowy i katechina, przyjmując odpowiednio wartości 320, 311, 249 i 242 $\mu\text{M TRE}/100 \text{ g}$ naparu. Zauważono, że nawet związki występujące w stosunkowo małej ilości przyczyniają się do znacznej

aktywności antyoksydacyjnej przetworu [31]. Oprócz stężenia, za wysoki udział w aktywności antyoksydacyjnej odpowiadają też specyficzne elementy struktury chemicznej. Zdolność neutralizowania wolnych rodników przez polifenole zależy od miejsca i wzajemnego podstawienia ich grup fenolowych (–OH), a dokładniej od możliwości stabilizowania rodników poprzez wiązanie wodrowe lub delokalizację elektronów. Wymogi strukturalne, które zostały uznane za niezbędne do skutecznego usuwania wolnych rodników, to przede wszystkim obecność grup –OH we wzajemnym położeniu *orto* w jednym z pierścieni fenolowych flawonoidów, flawanoli, kwasów fenolowych lub garbników, a dodatkowo – podwójne wiązanie w łańcuchu C_3 fenylopropaidów i ewentualnie grupa karbonylowa w pierścieniu C flawonoidów [31, 35]. Spośród związków obecnych w ekstraktach z czystka, mirycytryna spełnia wszystkie te kryteria, co przekłada się na jej najsilniejsze działanie w stosunku do innych związków, mimo obecności reszty cukrowej w pozycji C-3 pierścienia C. Glikozylacja (i wynikający z niej wzrost masy molowej związku) powoduje zazwyczaj relatywny spadek aktywności antyoksydacyjnej [31]. Potwierdza to również porównanie IC_{50} w teście DPPH mirycetyny (0,68 μM) i epikatechiny (1,49 μM), gdzie wartość dla mirycetyny jest prawie o połowę mniejsza. Flawan-3-ole, takie jak katechina czy epikatechina, nie posiadają wiązania podwójnego C-2/C-3 i grupy 4-okso, co ogranicza ich potencjał wychwytywania rodników. Natomiast estryfikacja katechin kwasem galusowym kompensuje brak wyżej wymienionych struktur i, mimo wzrostu masy molowej, zwiększa aktywność przeciwutleniającą galokatechin ($\text{IC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$). Ponadto, uważa się, że związki zawierające większe ilości grup fenolowych wykazują silniejsze właściwości antyoksydacyjne. W przypadku polimerycznych proantocyjanidyn cecha ta nie wpływa jednak na zwiększenie ich aktywności. Uważa się, że ich struktura chemiczna może zawierać przeszkody steryczne [35].

Badaniom poddano również olejek eteryczny z czystka szarego otrzymany metodą destylacji z parą wodną. Przeprowadzono testy z zastosowaniem metod DPPH i ABTS, wykorzystując kwas askorbinowy jako substancję wzorcową (IC_{50} 5 i 2 $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio) oraz test FRAP wobec butylowanego hydroksytoluenu – BHT (–63 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$). Uzyskane wyniki wykazały słabe właściwości przeciwutleniające olejku z *C. incanus* (IC_{50} dla DPPH – 828 $\mu\text{g/ml}$, dla ABTS – 395 $\mu\text{g/ml}$, dla FRAP – 0,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$). Olejki z innych gatunków *C. salvifolius*, *C. libanotis* i *C. monspeliensis* również cechowały się niewielkim potencjałem antyoksydacyjnym [18].

Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze

Olejki eteryczne oraz oleożywice pozyskane z czystka szarego i jego podgatunków były oceniane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej w kilku pracach greckich badaczy [19–21, 25]. W jednym z badań olejki eteryczne z czystka szarego i kreteńskiego charakteryzowały się słabą aktywnością wobec bakterii Gram(–) (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), ale znacznie wyższą w stosunku do bakterii Gram(+) (*Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*) i drożdżaków (*Candida albicans*). Najskuteczniej olejki działały wobec *S. aureus*, *B. cereus* i *B. subtilis* [20]. W opinii autorów, za działanie przeciwdrobnoustrojowe odpowiadają izomery tlenku manoilu jako głównego i reaktywnego składnika olejku eterycznego. Swoje przypuszczenia potwierdzili w kolejnym badaniu na wyizolowanych związkach z olejku i oleożywicy czystka kreteńskiego wobec *S. aureus*, *S. epidermidis* i *Staphylococcus hominis*. Otrzymane wyniki porównano do działania standardowego antybiotyku – streptomycyny [25]. Badanie prowadzone dla olejku eterycznego z czystka kreteńskiego przez innych autorów potwierdziło działanie przeciwdrobnoustrojowe, ale tylko dla olejku w niewielkim rozcieńczeniu (1:8, V/V) w stosunku do *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* i *Micrococcus luteus*, niższe stężenia olejku nie hamowały wzrostu bakterii. Niemniej jednak, naukowcy potwierdzili dużą aktywność w hamowaniu rozwoju grzybów i pleśni: *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana*, *Poria placenta*, *Coriolus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum* i *Penicillium expansum*. Szczególnie wrażliwymi okazały się szczepy *C. puteana* i *P. placenta* [48]. Aktywność przeciwbakteryjną olejku przypisali diterpenom o układzie labdanu, m.in. tlenkom manoilu, 13-*epi*-manoilu i 3-acetoksy-manoilu oraz fenolowemu monoterpenowi – karwakrolowi [49]. Składniki te wykazywały się również silnym działaniem przeciwbakteryjnym wobec *Borrelia burgdorferi* [49, 50].

Szereg badań oleożywicy *C. incanus* potwierdził jej działanie antybakteryjne, które również przypisuje się głównie diterpenom typu labdanu [51]. Dichlorometanowo-metanolowy ekstrakt (1:1, V/V) z balsamu hamował namnażanie się zarówno bakterii Gram(–) (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter mitratus*, *Proteus mirabilis*), jak i Gram(+) (*S. aureus*). Silną aktywność przeciwdrobnoustrojową potwierdzono dla obecnego w oleożywicy malonianu labd-7,13(*E*)-dien-15-ylu

[52], sklareolu i tlenku 3 β -hydroksy-13-*epi*-manoilu wobec szczepów bakteryjnych Gram(+) [25]. Oceniano również potencjał przeciwbakteryjny i przeciwgrzybiczy sześciu naturalnych diterpenów izolowanych z balsamu oraz ich 15 półsyntetycznych pochodnych. Badane związki były pochodnymi labd-7,13(*E*)-dien-15-olu (10 związków) oraz labd-13(*E*)-en-8 α ,15-dioli (11 związków). Z substancji naturalnych, malonian labd-7,13(*E*)-dien-15-ylu ponownie okazał się związkiem o najszerszym spektrum działania (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*). Z kolei labd-13(*E*)-en-8 α ,15-dioli jako jedyny z tej grupy wykazał potencjał przeciwgrzybiczy wobec 2 z 3 badanych szczepów (*C. albicans*, *C. tropicalis*). Warto zwrócić uwagę, że oznaczona aktywność badanych związków była porównywalna z działaniem wybranych standardowych antybiotyków [53].

Działanie hamujące namnażanie się bakterii i grzybów przedstawiono również dla ekstraktów z liści i owoców różnych gatunków *Cistus* (w tym *C. incanus*). Badaniom poddano wyciągi wodne, metanolowe, *n*-butanolowe, octanu etylu, chloroformowe i heksanowe [54, 55]. Wykazano, że wyciągi z liści i owoców czystka szarego charakteryzują się najwyższymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi spośród badanych gatunków. Wyciągi wodne i *n*-butanolowe charakteryzowała aktywność wobec większości badanych szczepów, z czego tylko butanolowe miały działanie hamujące namnażanie *E. coli*. Wszystkie wyciągi posiadały umiarkowane właściwości przeciwko *B. subtilis* i *B. cereus*, ale nie wykazano działania hamującego wobec *P. aeruginosa* i *C. albicans*. Badania potwierdziły znaczną aktywność ekstraktów z czystka szarego wobec bakterii Gram(+) i stosunkowo słabą wobec Gram(–) oraz drożdżaków (wyjątek stanowił *Candida glabrata*, gdzie wykazano silne właściwości przeciwgrzybicze) [54]. Wyciągi sporządzone z liści charakteryzowały się silniejszymi działaniami niż te z owoców. Związki rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych (woda i *n*-butanol) były skuteczniejsze niż te rozpuszczalne w roztworach niepolarnych [55]. Polscy naukowcy oceniali działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze wyciągów wodnych z 15 produktów czystka szarego dostępnych na krajowym rynku wobec siedmiu szczepów bakterii Gram(+), trzech Gram(–) oraz dwóch szczepów grzybów. Aktywność oceniali na podstawie minimalnego stężenia hamującego (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC). Wykazano, że napary były skuteczniejsze przeciwko bakteriom Gram(+), głównie *S. aureus* i *S. epidermidis* (MIC odpowiednio 0,5–8 i 0,25–4 mg/ml). Natomiast wśród bakterii Gram(–) najbardziej

wrażliwy był *Helicobacter pylori* (MIC 32–64 mg/ml). W odróżnieniu od wcześniej przytoczonych badań, wyciągi z czystka wykazywały słaby lub całkowity brak aktywności wobec *E. coli*, *C. albicans* i *C. glabrata* [27]. Silniejszą aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram(+) (*B. subtilis*), w stosunku do Gram(–) (*Aliivibrio fischeri*) stwierdzono również dla szesciu (I–VI) fenolowych frakcji pozyskanych za pomocą wieloetapowej ekstrakcji *C. incanus*. Aktywność oceniano metodą chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z bezpośrednią bioautografią (*ang. thin-layer chromatography-direct bioautography*, TLC-DB). Najsilniejszy efekt wywierały frakcje I i II zawierające odpowiednio aglikony flawonoidowe i wolne kwasy fenolowe [56].

Niemieccy naukowcy badali wpływ naparu z czystka na adhezję bakterii w płytce nazębnej (łac. *pellicula*). Specjalnie przygotowane, oszkliwione płytki umieszczano w jamie ustnej 4 ochotników, w rejonie górnych zębów trzonowych i przedtrzonowych. Jamę ustną płukano zimnym naparem z czystka przez 10 minut. Obecność bakterii na płytkach oceniano za pomocą metody barwienia DAPI i fluoroscencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), porównując do próby kontrolnej. Potwierdzono, że płukanie jamy ustnej naparem z czystka miało znaczący wpływ na liczbę bakterii po 2 godz. od zastosowania płukanki. Wykryto zmniejszenie adhezji *Eubacterium* i *Streptococcus* w porównaniu z próbą kontrolną [57]. W kontynuacji swoich badań, naukowcy testowali wpływ różnych napojów bogatych w polifenole (czarna i zielona herbata, czerwone wino, sok winogronowy i napar z czystka). Potwierdzono, że każdy z wybranych napojów zmniejszał adhezję eubakterii i paciorkowców. Najmniejszą liczbę bakterii stwierdzono po płukaniu naparem z czystka, czerwonym winem i czarną herbata (do 66% redukcji bakterii w porównaniu do próby kontrolnej). Za działanie przeciwdrobnoustrojowe odpowiadają najprawdopodobniej związki polifenolowe, wśród których wymieniono flawan-3-ole, galaktozyd i ramnozyd mirycetyny oraz glukozyd kwercetyny [58].

Przytoczone powyżej badania sugerują, że silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe nie zawsze korelują z dużą całkowitą zawartością związków polifenolowych. Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze można przypisać określonym związkom polifenolowym oraz możliwości występowaniu efektów synergistycznych z innymi, niefenolowymi, składnikami obecnymi w wodnych wyciągach z *C. incanus*, co wymaga dalszych badań. Niemniej jednak, dostępne wyniki potwierdzają możliwość wykorzystania olejku eterycznego, żywicy i ekstraktów z czystka szarego

i jego podgatunków jako potencjalnego, alternatywnego źródła składników o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym [27, 57–59] oraz w profilaktyce np. chorób przyzębia.

Działanie przeciwwirusowe

Pomimo dostępności leków stosowanych w chorobach wirusowych nadal istnieje silna potrzeba poszukiwania nowych środków, które udoskonalą aktualne terapie lub będą skuteczne w niestandardowy sposób. Pozwoli to na bezpośrednie wdrożenie do terapii lub opracowanie nowych strategii w przypadku niewyleczalnych obecnie chorób wirusowych. Za potencjalne źródło nowych leków brane są naturalne produkty pochodzenia roślinnego, jednakże stosowanie ziołowych środków przeciwwirusowych wymaga dogłębnych badań nad ich skutecznością, bezpieczeństwem, składem i mechanizmem działania.

Wyciągi wodne z czystka szarego zostały przebadane pod kątem właściwości przeciw wirusowi HIV na linii komórek zainfekowanych HIV (LC5–RIC) i technologii przeznaczonej do identyfikacji inhibitorów HIV (EASY-HIT29). Wykorzystano ekstrakt przygotowany z preparatu CYSTUS052, napar z komercyjnie dostępnego suszu z czystka szarego, oraz wyciąg przygotowany ze świeżych liści tego gatunku. Otrzymane wyniki wykazały, że wszystkie trzy ekstrakty wodne hamowały infekcje komórek LC5–RIC przed wirusem HIV-1. Do dalszych eksperymentów na różnych klinicznych izolatach wirusa HIV, wykorzystano wyłącznie komercyjny preparat. Ekstrakt hamował zakażenie komórek LC5–RIC i limfocytów krwi obwodowej zarówno przez typ HIV-1, jak i HIV-2. Odnotowano również, że wyciąg hamował infekcje wirusami z mutacjami oporności na leki. Badacze, przypuszczając, że za działanie przeciwwirusowe odpowiadają polifenole, stworzyli frakcję wzbogaconą w polifenole (CiPP) i poddali dalszym testom. CiPP wykazał zależną od dawki aktywność przeciwwirusową (0,7–2 µM/ml) wobec wszystkich testowanych izolatów HIV. Ekstrakt czystka charakteryzował się działaniem podobnym do inhibitorów fuzji. Związki zawarte w czystku selektywnie blokowały glikoproteinę g120, występującą w białku otoczek wirusów, która umożliwia wnikanie wirusa do komórek gospodarza. Takie samo działanie wykazywały wyciągi z czystka wobec wirusa Ebola z podgatunku Zair i wirusa Marburga [60].

Przeciwwirusowe działanie czystka wykazano również wobec wirusa ptasiej grypy A (H7N7) w testach *in vitro* na hodowli komórkowej oraz

in vivo na modelu zwierzęcym (myszy). W obu testach używano preparatu aerozolowego, ze względu na niską biodostępność polifenoli o wysokiej masie cząsteczkowej. W komórkach MDCK (komórki psiej nerki Madin-Darby) osiągnięto 90% zmniejszenie liczby lysinek (obszarów przejaśnienia) na komórkach, gdy przeprowadzono nebulizację ekstraktem roślinnym na 10 minut przed rozpyleniem wirusa. Takich zmian nie odnotowano, gdy nebulizację wykonywano równolegle lub po zakażeniu wirusem. Na podstawie przeprowadzonych badań zasugerowano, że bogaty w polifenole ekstrakt CYSTUS052 zapobiega adsorpcji wirusa do komórek, natomiast nie wykazuje on właściwości przeciwwirusowych, gdy podawany jest po lub w trakcie infekcji. W testach na zwierzętach użyto specjalnego sytemu do pomiaru temperatury ciała i ogólnej aktywności motorycznej. U myszy inhalowanych aerozolowym preparatem z czystka nie rozwijały się objawy choroby i nie wykazano różnic w temperaturze ciała i aktywności ruchowej. Myszy z grupy kontrolnej wykazały po 8 dniach od zakażenia wirusem objawy kliniczne [61]. Podobne obserwacje odnotowali Ehrhardt i wsp. [62]. Ekstrakt CYSTUS052 hamował aktywność różnych podtypów ptasiej i ludzkiej grypy w hodowlach komórek A549 i MDCK. Przy dawce 50 µg/ml wyciąg z czystka nie wykazywał szkodliwego wpływu na żywotność komórek, ich metabolizm ani podziały. Wirusy nie rozwijały oporności na ekstrakt w porównaniu z amantadyną, kiedy to wytworzenie wariantów opornych następowało po kilku pasażach. Autorzy tego badania uważają, że polifenole obecne w preparacie zaburzają wiązanie się protein powierzchniowych wirusa z receptorami komórkowymi gospodarza [62].

Przeprowadzono prospektywne, randomizowane, kontrolowane placebo badanie kliniczne na 160 pacjentach (7–81 lat) z objawami infekcji górnych dróg oddechowych. W celu określenia czynnika etiologicznego choroby (infekcja bakteryjna czy wirusowa), badanym pobierano wymazy z gardła i wykonano testy celem wykrycia wirusa grypy A i B (BioStar OIA FLU A/B). W przeprowadzonych badaniach 57,5% pacjentów wykazywało zakażenie wirusowe. Badanych przydzielono losowo do dwóch grup. Pierwsza otrzymywała tabletki do ssania z preparatem CYSTUS052 (ok. 220 mg polifenoli), druga grupa otrzymywała placebo. Pacjentów leczono i obserwowano do 7 dni. Za pomocą kwestionariusza oceniano występowanie objawów klinicznych u pacjenta (ból gardła, kaszel, w tym kaszel produktywny, katar). Dodatkowo oznaczano we krwi markery stanu zapalnego (prokalcytonina, białko C-reaktywne) w 1, 4 i 7 dniu. Odnotowano, że preparat z czystka

zmniejszał średni czas trwania choroby i nasilenie objawów, które ustępowały szybciej w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Spośród markerów stanu zapalnego, stężenie białka C-reaktywnego uległo znacznemu obniżeniu w grupie stosującej pastylki z czystkiem. Mechanizm działania przeciwwirusowego i przeciwbakteryjnego w zakażeniu górnych dróg oddechowych nie jest jasny. Oprócz wcześniejszych sugestii, naukowcy przypisują skuteczność działania kombinacji kilku efektów biologicznych. Uznali za prawdopodobne, że substancje czynne uwalniane z pastylek do ssania są transportowane z jamy ustnej w postaci aerozolu wraz z aspirowanym do dróg oddechowych powietrzem [63]. Ci sami autorzy przeprowadzili drugie prospektywne, randomizowane badanie z udziałem 300 pacjentów (5–85 lat) w celu porównania działania wyciągu z czystka z zieloną herbatą w infekcji górnych dróg oddechowych. Tak samo jak poprzednio identyfikowano przyczynę infekcji. Wśród ochotników 43,7% miało infekcję wirusową, u 2% pacjentów wystąpiła infekcja obu typów. Terapię rozpoczynano od pierwszych objawów klinicznych i leczono przez okres do 7 dni. Badanych przydzielono do dwóch grup. Pierwsza otrzymywała pastylki z preparatem CYSTUS052, 6 razy dziennie po 2 sztuki. Druga grupa w pierwszym dniu płukała jamę ustną i przyjmowała doustnie 8 razy dziennie po 100 ml zielonej herbaty, a przez kolejne dni cztery razy dziennie. Badanie objawów subiektywnych (ból, intensywność i częstotliwość kaszlu, obecność płwociny, nieżyt nosa) oceniano na podstawie kwestionariusza. Odnotowano wyraźną poprawę i ustępowanie objawów w grupie pacjentów leczonych wyciągiem z czystka po średnio 3 dniach. Porównano intensywność poszczególnych objawów klinicznych w obu badanych grupach wykazując, że w grupie pacjentów stosujących preparat czystka objawy kliniczne były mniej nasilone, z wyjątkiem nieżyty nosa. W przypadku zielonej herbaty odnotowano tylko nieznaczne obniżenie intensywności bólu. Wydaje się, że jakościowe i ilościowe różnice w składnikach aktywnych, ich budowie i biodostępności to główne powody, dla których preparat z czystkiem okazuje się bardziej skuteczny w porównaniu z zieloną herbatą, jako środek przeciwwirusowy i przeciwbakteryjny w infekcjach górnych dróg oddechowych [64].

Działanie przeciwzapalne

Za działanie przeciwzapalne przetworów z czystka odpowiadają głównie flawonoidy, które wpływają hamująco na aktywność cyklooksygenaz (COX), powodując w ten sposób zmniejszenie

wytwarzania prozapalnych cytokin (leukotrienów i prostagladyn) oraz zmniejszenie odczynu zapalnego.

U myszy wywołano ostry stan zapalny aplikując na ucho octan tetradekanoiloforbolu (TPA). Powodowało to znaczny obrzęk i tklliwość uszu u badanych zwierząt. Grupie badanej podawano miejscowo jednocześnie wodny ekstrakt z czystka szarego lub wyizolowaną frakcję bogatą w oligomeryczne proantocyjanidyny. Odnotowano zmniejszenie stanu zapalnego zależne od dawki (0,5 i 1 mg), które wynosiło 64–74% dla wyciągu wodnego i 72–82% dla frakcji proantocyjanidynowej. Porównując, 1 mg frakcji wzbogaconej w proantocyjanidyny wywoływał efekt przeciwzapalny podobny do 0,5 mg indometacyny. Dodatkowo przeprowadzono testy hamowania działania COX-1 i -2. Wykazano, że wodny wyciąg działał skuteczniej (IC_{50} 63,2 μ M) niż frakcja pronto-cyjanidyn (IC_{50} 93,7 μ M) wobec COX-1, natomiast odwrotną zależność odnotowano przy COX-2 (IC_{50} wynosiło odpowiednio 23,1 i 44,7 μ M). Efekty odniesiono do działania kwasu acetylosalicylowego. Oceniono również aktywność hamowania COX przez wyizolowane związki galokatechiny (4 α →6)-galokatechiny (4 α →8)-galokatechiny i galusan-3-O-galokatechiny (4 β →8)-galusanu-3-epigalokatechiny (4 β →8)-galokatechiny. Związek drugi charakteryzował się silniejszym działaniem hamującym (IC_{50} 4,5 μ M) COX-2 niż związek kontrolny (17,4 μ M) [39].

Leukocyty, m.in. neutrofile i limfocyty T, a w tkankach makrofagi, pełnią istotne funkcje w kontroli prawidłowego przebiegu miejscowej reakcji zapalnej. Proteazy, uwalniane przez te komórki, regulują miejscową odpowiedź układu immunologicznego poprzez aktywację lub degradację neuropeptydów, czynników wzrostu i cytokin. Mechanizmy te są zwykle kontrolowane przez endogenne inhibitory, jednakże zaburzenia w układzie proteolitycznym i antyproteolitycznym często towarzyszą przewlekłemu stanowi zapalnemu. W takich przypadkach korzystne może być zarówno hamowanie aktywności proteolitycznej, jak i zmniejszenie liczby naciekających komórek układu odpornościowego [65, 66]. Obserwuje się wzmożoną ekspresję aminopeptydazy alaninowej i dipeptydylopeptydazy IV w trakcie aktywacji komórek. T. Lendeckel i wsp. [66] przeprowadzili testy *in vitro* oceniające przeciwzapalne działanie wodnego wyciągu z czystka szarego, mierząc zahamowanie aktywności enzymatycznej wymienionych peptydaz. Ponadto, badano wpływ ekstraktu na proliferację i syntezę DNA ludzkich komórek T i linii ludzkich komórek T (KARPAS-299). Autorzy badania odnotowali hamujące działanie wyciągu z czystka na powierzchniowe peptydazy

leukocytów, przy czym aminopeptydaza alaninowa wydawała się bardziej wrażliwa. Zauważono, że hamowanie produkcji cytokin prozapalnych (interleukiny-1) jest zależne od dawki. Niższe stężenia wyciągu (0,05%) indukowały ekspresję cytokin, podczas gdy wyższe stężenia (0,5%) nie sprzyjały ich produkcji i wydzielaniu. Wykazano, że wodne wyciągi z czystka, zależnie od dawki, zmniejszały syntezę DNA komórek T oraz hamowały szybkość proliferacji ludzkiej linii komórkowej KARPAS-299. Wyniki tego badania pokazują, że wodne ekstrakty w zależności od dawki modulują wzrost, żywotność i uwalnianie cytokin przez leukocyty. Dzięki normalizacji ilości i funkcji komórek układu odpornościowego oraz cytokin prozapalnych możliwe jest zmniejszenie uszkodzeń wywołanych nadmierną odpowiedzią immunologiczną oraz przyspieszenie procesu gojenia się ran [66].

Działanie antyproliferacyjne i cytotoksyczne

Dla ekstraktów z pędów i korzeni czystka kreteńskiego przeprowadzono testy *in vitro* oceniające cytotoksyczność wobec linii komórek nowotworowych z wykorzystaniem metody z barwnikiem sulforodaminą B (SRB). Udowodniono cytotoksyczne działanie wyciągów z pędów czystka wobec komórek nowotworowych szyjki macicy (HeLa), gruczolu sutkowego (MDA-MB-453) i czerniaka (FemX). Takiego działania nie udokumentowano w przypadku ekstraktu z korzeni. Fakt ten tłumaczy się obecnością diterpenów typu labdanu, które występowały w pędach roślin, ale nie potwierdzono ich w ekstrakcie z korzeni [67]. W piśmiennictwie naukowym można odnaleźć wiele badań na temat działania cytotoksycznego i przeciwnowotworowego diterpenów typu labdanu, pozyskiwanych z żywicy labdanum oraz z nadziemnych części gatunków rodzaju *Cistus*. W jednym z pierwszych eksperymentów *in vitro* nad działaniem antyproliferacyjnym, prowadzonym na kilku liniach komórek nowotworowych (KB, P-388 i NSCLCN6), wykazano, że wysoką aktywność hamującą proliferację posiadają octan labd-13(E)-en-8 α -ol-15-ylu, sklareol i 13-epi-sklareol. Natomiast labd-7,13(E)-dien-15-ol, tlenek manoilu i tlenek 13-epi-manoilu charakteryzowały się działaniem umiarkowanym [51]. W innym badaniu wykazano, że labd-7,13(E)-dien-15-ol, labd-13(E)-en-8 α ,15-diol, oraz octan labd-7,13(E)-dien-15-ylu wykazywały właściwości cytotoksyczne wobec linii komórkowych MOLT 3 i H9 (linia ludzkich komórek T pochodząca od pacjenta z ostrą białaczką limfoblastyczną), RAJI (linia komórkowa limfocytów B pochodząca od pacjenta z chłoniakiem Burkitta) [68].

Labd-13(E)-en-8 α ,15-diol i jego octan, w testach *in vitro* w stężeniach niższych niż 100 μ M, charakteryzowały się silnym działaniem hamującym rozwój różnych linii komórkowych ludzkich białaczek. Różnica w strukturze związków, jaką jest obecność grupy acetylowej w pozycji C-13, nie wpływała znacząco na działanie antyproliferacyjne, oba związki posiadały podobną aktywność wobec testowanych linii [69, 70]. Sklareol, występujący w liściach i owocach czystka kreteńskiego, indukował śmierć komórek w liniach T-komórkowych ludzkich białaczek i zakłócał cykl komórkowy, zatrzymując go w fazie G_{0/1}. Analiza metodą Western Blot potwierdziła zmniejszoną ekspresję protoonkogenu c-myc i maszyną apoptozę w komórkach H33AJ-JA1 i MOLT3. Ekspresja białka antyapoptotycznego Bcl-2 pozostała niezmienniona [71]. Sklareol wpływał również na czynniki charakterystyczne dla indukcji apoptozy w liniach komórkowych raka okrężnicy (HCT116). W badaniu *in vitro* wykazano, że związek ten hamował syntezę DNA, indukował zatrzymanie komórek w fazie G₁ cyklu komórkowego oraz aktywował kaspazy 8 i 9, degradację PARP i fragmentację DNA. Autorzy przeprowadzili również badanie *in vivo* na mysim modelu z heteroprzeszczepem raka jelita grubego (HCT116). Oceniano przeciwnowotworowe właściwości sklareolu u myszy NOD/SCID pozbawionych funkcjonalnych limfocytów B i T. Podawanie wodnego roztworu w dawkach do 50 mg/kg m.c. nie wpływało w ogóle na progresję guzów. Większe dawki okazywały się toksyczne i prowadziły do śmierci zwierząt. Zastosowanie liposomów, jako nośników substancji lipofilowych, pozwoliło na zwiększenie dawki związku do 275 mg/kg m.c., nie powodując przy tym efektów toksycznych. Wykazano, że u zwierząt, którym podano sklareol w postaci liposomów, średnia masa nowotworów była o 50% niższa niż w grupie kontrolnej [72]. Ponadto, sklareol hamował wzrost w fazie G_{1/S} ludzkich linii komórkowych raka piersi MN1 i MDD2. Dodatkowo zwiększał aktywność stosowanych leków przeciwnowotworowych (etopozyny, doksorubicyny i cisplatyny) w stosunku do MDD2 [73].

Inni naukowcy zasugerowali, że przetwory z czystka szarego i substancje aktywne w nim zawarte mogą okazać się pomocne przy leczeniu łagodnego przerostu prostaty. Oceniano cytotoksyczne i antyproliferacyjne działanie liofilizowanego, wodnego wyciągu z czystka szarego pochodzącego z Sycylii. W badaniach wykorzystano linię komórkową fibroblastów płuc (V79-4) oraz ludzkie linie komórkowe prostaty (PZ-HPV-7, PNT1A). Działanie hamujące wzrost badano za pomocą testu MTT (redukcji soli tetrazolowej) oraz testu SRB (z sulfrodaminą). W teście cytotoxyczności

(metodą barwienia błękitem trypanu) wyciąg z czystka działał hamująco na rozwój komórek oraz powodował spadek ich żywotności. Prawdopodobnie, za odnotowane aktywności odpowiadają związki polifenolowe, a w szczególności flawonoidy, jednakże mechanizm działania nie jest jasny [74].

Inne właściwości

Jak wcześniej wspomniano, *C. incanus* był używany tradycyjnie w leczeniu chorób i dolegliwościach przewodu pokarmowego, w biegunkach oraz jako środek o działaniu spazmolitycznym. W jednym z badań *in vitro* oceniano działanie rozkurczające liofilizowanego wodnego wyciągu z czystka szarego, pochodzącego z Sycylii, na izolowaną mięśniówkę gładką szczurzego jelita oraz aorty. Wyciąg zależnie od stężenia hamował skurcz mięśni wywołany acetylocholiną, fenylefryną i KCl. Mechanizmy leżące u podstaw tego działania wymagają jednak dalszych badań, choć sugeruje się zarówno bezpośrednie działanie na mięśnie gładkie, jak i pośrednie działanie przez uwalnianie neuroprzekaźników. Aktywność spazmolityczną przypisano związkom flawonoidowym, w tym kwercytynie, kemferolowi, mirycetynie, flawan-3-olom i proantocyjanidynom. Działanie rozkurczowe na mięśnie gładkie jelita wyjaśnia tradycyjne zastosowanie przetworów z czystka szarego w dolegliwościach trawiennych, natomiast obniżanie napięcia mięśniówki naczyń krwionośnych może w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii wspomagającej w chorobie nadciśnieniowej [75].

Związki zidentyfikowane w czystku szarym, a w szczególności należące do diterpenów typu labdanu, flawonoli, flawan-3-oli, proantocyjanidyn, mają szeroko udokumentowane działanie gastroprotektoryjne. Wymienione składniki chronią błonę śluzową przewodu pokarmowego przed uszkodzeniami eksperymentalnie indukowanymi chemicznie i przed różnymi czynnikami wywołującymi zmiany martwicze. Efekty te są tłumaczone różnymi mechanizmami działania. Przede wszystkim, wielofenole roślinne wykazują silne właściwości przeciwutleniające, chroniąc komórki przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym. Wykazują działanie cytoprotekcyjne oraz wpływają na wzrost produkcji śluzu w przewodzie pokarmowym. Kwercetyna hamuje działanie ATP-azy, zależnej od jonu potasowego i wodorowego (H⁺/K⁺ATPaza), obecnej w komórkach okładzinowych żołądka oraz wykazuje właściwości przeciwhistaminowe, co wpływa na zmniejszenie wydzielania kwasu żołądkowego. Dodatkowo kwercetyna i katechina hamują wzrost i rozwój *Helicobacter pylori* [76, 77]. Odnotowano działanie przeciwwrzdowe wodnego wyciągu

z nadziemnych części *C. incanus* w badaniu *in vivo*. U zwierząt doświadczalnych wywołano uszkodzenia żołądka kwasem solnym, etanolem, indometacyną, serotoniną i rezerpiną. Ekstrakt bogaty we flawonoidy podawano doustnie (0,25–0,5 g/kg m.c.). Stwierdzono zależny od dawki efekt ochronny wobec wszystkich użytych substancji. Największą aktywność zauważono w przypadku przekrwienia błony śluzowej i wrzodów krwotocznych indukowanych rezerpiną i serotoniną. Autorzy tego badania sugerują, że działanie ochronne czystka szarego związane jest z poprawą mikrokrażenia śluzówkowego oraz hamowaniem degranulacji komórek tucznych, których rozpad uwalnia duże ilości histaminy [77].

Oceniano wpływ wodnego ekstraktu z czystka szarego na stres oksydacyjny i dyslipidemię, które są kluczowymi czynnikami w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Dwudziestu czterem zdrowym ochotnikom podawano przez 12 tygodni, 3 razy dziennie, napar z *C. incanus* zawierający flawonoidy i fenolokwasy. Analizowano profil lipidowy oraz markery stresu oksydacyjnego, (di) aldehyd malonowy (MDA) jako marker peroksydacji lipidów i zaawansowane produkty utleniania białek (ang. *advanced oxidation protein products*, AOPP) jako marker peroksydacji białek. Profil lipidowy osób badanych uległ znacznej poprawie. Odnotowano wzrost stężenia HDL oraz spadek poziomu triglicerydów (TG). Zmniejszyły się również poziomy markerów stresu oksydacyjnego (MDA o 16%, AOPP o 18%) po 6 tygodniach badania. Zmiany markerów nie postępowały w następnych tygodniach. Przytoczone wyniki pozwalają wnioskować, że wyciągi z czystka, jako źródło polifenoli w diecie, mogą obniżać ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych [78].

Olejek eteryczny pozyskiwany z *C. incanus* wykazywał *in vitro* właściwości neuroochronne. Silnie hamował działanie butyrylocholinesterazy, słabiej acetylocholinoesterazy – enzymów związanych z rozwojem choroby Alzheimera. Efekt ten tłumaczy się synergicznym działaniem mieszaniny niektórych związków terpenowych, w szczególności α -pinenu, β -pinenu, *p*-cymenu, 1,8-cyneolu i linalolu [18].

Podsumowanie

Niniejszy przegląd piśmiennictwa naukowego pozwala stwierdzić, że *C. incanus* oraz jego podgatunki mogą być cennym uzupełnieniem diety w związku wielofenolowe. Przedstawiane analizy chemiczne wykazały, że głównymi składnikami występującymi w czystku szarym są flawonoidy, w tym glikozydy flawonoli (mirycetyny, kwercetyny, kemferolu), flawan-3-ole oraz garbniki.

Obecność tych związków warunkuje terapeutyczne i prozdrowotne właściwości liści czystka szarego i jego przetworów. Dotyczy to przede wszystkim silnego działania przeciwutleniającego, które może obniżać ryzyko wystąpienia przewlekłych chorób niezakaźnych, w tym chorób układu krążenia, neurodegeneracyjnych oraz chorób nowotworowych. Przetwory z czystka mogą być również rekomendowane jako środki immunomodulujące, wspomagające leczenie infekcji bakteryjnych i wirusowych. Aromatyczna olejowica labdanum oraz olejek eteryczny pozyskiwany z czystka szarego stanowią cenne źródło substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych, które mogą w przyszłości być szerzej wykorzystane w produkcji preparatów farmaceutycznych i kosmetycznych oraz jako naturalny konserwant do żywności.

O ile użycie tego surowca jako środka przeciwdrobnoustrojowego nie stanowi wyzwania w przypadku stosowania miejscowego, to wykorzystanie produktów z czystka szarego w zakresie przeciwwirusowym (ogólnym) wymaga opracowania efektywnej metody podania składników do miejsca infekcji. Popularyzując zastosowania liści czystka w sposób zrównoważony, nie można pominąć możliwych interakcji składników tej substancji roślinnej (korzystnych i niekorzystnych) z mikrobiotą jelitową oraz ich potencjalnego wpływu na wchłanianie z przewodu pokarmowego składników pokarmowych i substancji trzecich, np. leków – analogicznie jak ma to miejsce w przypadku nadmiernego przyjmowania wyciągów z liści herbaty. Podobnie jak w przypadku innych przetworów ziołowych, stosowanych przez pacjentów „na własną rękę”, wiele działań (zarówno korzystnych, jak i niepożądanych) umyka uwadze ogółu. Wartościowe byłoby, gdyby pacjenci korzystający z samodzielnie przygotowywanych przetworów z czystka szarego, informowali o tym swoich lekarzy prowadzących. Samoobserwacja w trakcie takiej terapii i odnotowywanie sytuacji, w których szczególnie widoczny jest wpływ na terapię wiodącą lub gdy dochodzi do zdarzeń nie do końca wyjaśnionych, powinna być jednocześnie dobrą praktyką i zwiększać wiedzę na temat praktycznego aspektu ziołolecznictwa – wśród pacjentów, lekarzy i instytucji odpowiedzialnych za monitorowanie działań produktów leczniczych, w tym działań niepożądanych.

Piśmiennictwo

1. Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis AK. Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem.* 2014; 2: 35.

2. Kubica P, Ekiert H, Ekiert R, Szopa A. Gatunki rodzaju *Cistus* sp. – taksonomia, występowanie, skład chemiczny, aplikacje terapeutyczne i badania biotechnologiczne. *Postępy Fitoter.* 2016; 17(3): 179–188.
3. Guzmán B, Vargas P. Historical biogeography and character evolution of *Cistaceae* (*Malvales*) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Org Divers Evol.* 2009; 9(2): 83–99.
4. Guzmán B, Vargas P. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (*Cistaceae*) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2005; 37(3): 644–660.
5. World Flora Online [online]. Dostępny w internecie: <http://www.worldfloraonline.org>. Dostęp: 5.11.2020.
6. Newerli-Guz J, Erdman M. Ocena wybranych wyróżników jakościowych czystka (rózy skalnej) *Cistus incanus* L. *Probl Hig Epidemiol.* 2015; 96(3): 693–696.
7. Falchi A, Paolini J, Desjober JM, Melis A, Costa J, Varesi L. Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the *trnL-F* and *rpl32-trnL* sequences of cpDNA. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52(2): 538–543.
8. Carni A, Matevski V, Šile U. Morphological, chorological and ecological plasticity of *Cistus incanus* in the southern Balkans. *Plant Biosyst.* 2010; 144(3): 602–617.
9. Barrajón-Catalán E, Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Bruñá NM, López DS, Segura-Carretero A, et al. Rockroses (*Cistus* sp.) Oils. W: Preedy VR, red. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Cambridge: Academic Press; 2016. s. 649–658.
10. Robert S. *Cistinae: The Natural Order of Cistus, or Rock-Rose; Illustrated by Coloured Figures & Descriptions of All the Distinct Species*. Sydney: Wentworth Press; 2016. s. 35–112.
11. Paolini J, Falchi A, Quilichini J, Desjober JM, de Cian MC, Varesi L, et al. Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* 2009; 70(9): 1146–1160.
12. Christodoulakis NS, Georgoudi M, Fasseas C. Leaf structure of *Cistus creticus* L. (rock rose), a medicinal plant widely used in folk remedies since ancient times. *J Herbs, Spices Med Plants.* 2014; 20(2): 103–114.
13. Aronne G, de Micco V. Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Ann Bot.* 2001; 87(6): 789–794.
14. Gülz PG, Herrmann T, Hangst K. Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora.* 1996; 191(1): 85–104.
15. Klebańska J. Porównanie składu chemicznego produktów *Cistus × incanus* L. dostępnych komercyjnie. Praca magisterska, promotor: Fecka I. Wrocław: Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; 2017.
16. Demetozos C, Mitaku S, Loukis A, Harvala C, Gaily A. A new dimeric sesquiterpene, isomers of manoyl oxide and other volatile constituents from the resin “Ladano” of *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood. *J Essent Oil Res.* 1994; 6(1): 37–41.
17. Szeremeta D, Knas M, Długosz E, Sajewicz M. Qualitative evaluation of composition of the volatile fraction in commercial samples of *Cistus incanus* L. *Acta Chromatogr.* 2017; 29(3): 427–442.
18. Loizzo MR, Jemia MB, Senatore F, Bruno M, Menichini F, Tundis R. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chem Toxicol.* 2013; 59(9): 586–594.
19. Demetozos C, Loukis A, Spiliotis V, Zoakis N, Stratigakis N, Katerinopoulos HE. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* L. *J Essent Oil Res.* 1995; 7(4): 407–410.
20. Demetozos C, Katerinopoulos H, Kouvarakis A, Stratigakis N, Loukis A, Ekonomakis C, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta Med.* 1997; 63(5): 477–479.
21. Demetozos C, Anastasaki T, Perdetzoglou D. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). *Zeitschrift für Naturforsch – Sect C J Biosci.* 2002; 57(1–2): 89–94.
22. Mastino PM, Marchetti M, Costa J, Usai M. Interpopulation variability in the essential oil composition of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* from Sardinia. *Chem Biodivers.* 2018; 15(9): 151.
23. Maggi F, Lucarini D, Papa F, Peron G, Dall’Acqua S. Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochem Syst Ecol.* 2016; 66(3): 50–57.
24. Anastasaki T, Demetozos C, Perdetzoglou D, Gazouli M, Loukis A, Harvala C. Analysis of labdane-type diterpens form *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS. *Planta Med.* 1999; 65(8): 735–739.
25. Demetozos C, Stahl B, Anastassaki T, Gazouli M, Tzouveleakis LS, Rallis M. Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin Ladano, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Med.* 1999; 65(1): 76–78.
26. Waed A, Ghalia S, Adawia K. Evaluation of radical scavenging activity, total phenolics and total flavonoids contents of *Cistus* species in Syria. *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 2016; 8(7): 1071–1077.
27. Viapiana A, Konopacka A, Waleron K, Wesolowski M. *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Ind Crops Prod.* 2017; 107(22): 297–304.
28. Dimcheva V, Karsheva M. *Cistus incanus* from Strandja mountain as a source of bioactive antioxidants. *Plants* 2018; 7(1): 1–15.
29. Dimcheva V, Kaloyanov N, Karsheva M. The polyphenol composition of *Cistus incanus* L., *Trachystemon orientalis* L. and *Melissa officinalis* L. infusions by HPLC-DAD method. *Open J Anal Bioanal Chem.* 2019; 3(1): 31–38.
30. Gori A, Nascimento LB, Ferrini F, Centritto M, Brunetti C. Seasonal and diurnal variation in leaf phenolics of three medicinal mediterranean wild species: What is the best harvesting moment to obtain the richest and the most antioxidant extracts? *Molecules* 2020; 25(4): 956.
31. Riehle P, Vollmer M, Rohn S. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions – Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res Int.* 2013; 53(2): 891–899.
32. Kubica P, Szopa A, Ekiert H. In vitro shoot cultures of pink rock-rose (*Cistus × incanus* L.) as a potential source of phenolic compounds. *Acta Soc Bot Pol.* 2017; 86(4): 1–11.
33. Wittpahl G, Kölling-Speer I, Basche S, Herrmann E, Hannig M, Speer K, et al. The Polyphenolic composition of *Cistus incanus* herbal tea and its antibacterial and anti-adherent activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 2015; 81(18): 1727–1735.
34. Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Roldán C, Guillén E, Saura D, Segura-Carretero A, et al. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem Anal.* 2011; 22(4): 303–312.
35. Gori A, Ferrini F, Marzano MC, Tattini M, Centritto M, Baratto MC, et al. Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. incanus* leaves. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(8): 1344.
36. Riehle P, Rusche N, Saake B, Rohn S. Influence of the leaf content and herbal particle size on the presence and extractability of quantitated phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal teas. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(45): 10978–10988.
37. Jeszka-Skowron M, Zgola-Grześkowiak A, Frankowski R. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC-MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids – A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. *J Food Compos Anal.* 2018; 74(11–12): 71–81.
38. Santagati NA, Salerno L, Attagui G, Savoca F, Ronsisvalle G. Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *J Chromatogr Sci.* 2008; 46(2): 150–156.
39. Mansoor KA, Matalka KZ, Qa’dan FS, Awad R, Schmidt M. Two new proanthocyanidin trimers isolated from *Cistus incanus* L. demonstrate potent anti-inflammatory activity and selectivity to cyclooxygenase isoenzymes inhibition. *Nat Prod Res.* 2016; 30(17): 1919–1926.
40. Kreimeyer J, Petereit F, Nahrstedt A. Separations of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins by capillary electrophoresis. *Planta Med.* 1998; 64(1): 63–67.
41. Petereit F, Kolodziej H, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 1991; 30(3): 981–985.
42. Gawel-Beben K, Kukula-Koch W, Hoian U, Czop M, Strzypek-Gomółka M, Antosiewicz B. Characterization of *Cistus × incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. extracts as potential multifunctional antioxidant ingredients for skin protecting cosmetics. *Antioxidants* 2020; 9(3): 202.
43. Attagui G, Russo A, Campisi A, Savoca F, Acquaviva R, Ragusa N, et al. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol Toxicol.* 2000; 16(2): 83–90.
44. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) [online]. EFSA J. 2010; 8(2): 1–63. Dostępny w internecie: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2010.1489>. Dostęp: 3.11.2020.

45. Alsabri SG, Zetrini AE, Ermeli NB, Mohamed SB, Bensaber SM, Hermann A, et al. Study of eight medicinal plants for antioxidant activities. *J Chem Pharm Res.* 2012; 4(8): 4028–4031.
46. Dimcheva V, Karsheva M. Antioxidant activity and polyphenolic content of the Bulgarian wild herb *Cistus incanus* L. stored under different conditions. *J Chem Technol Metall.* 2017; 52(5): 781–790.
47. Szeremeta D, Knaś M, Długosz E, Kowalska T, Sajewicz M. Thin-layer chromatographic fingerprinting of the nonvolatile fraction extracted from the medicinal herb *Cistus incanus* L. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2017; 40(5–6): 304–310.
48. Ait Lahcen S, El Hattabi L, Benkaddour R, Chahboun N, Ghanmi M, Satrani B, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus creticus* leaves. *Chem Data Collect.* 2020; 26(2): 100346.
49. Hutschenreuther A, Birkemeyer C, Grötzinger K, Straubinger RK, Rauwald HW. Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. *in vitro.* *Pharmazie* 2010; 65: 290–295.
50. Kubica P, Ekiert H, Ekiert RJ, Szopa A. Gatunki rodzaju *Cistus* sp. – taksonomia, występowanie, skład chemiczny, aplikacje terapeutyczne i badania biotechnologiczne. Species of the genus *Plant Fitoter.* 2016; 17(3): 179–188.
51. Chinou I, Demetzos C, Harvala C, Roussakis C, Verbist F. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med.* 1994; 60(1): 34–36.
52. Kalpoutzakis E, Chinou I, Mitaku S, Skaltsounis A, Harvala C. Antibacterial labdane-type diterpenes from the resin “Ladano” of *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Nat Prod Lett.* 1998; 11(2): 173–179.
53. Kalpoutzakis E, Aliannis N, Mitaku S, Chinou I, Harvala C, Skaltsounis A. New semisynthetic antimicrobial labdane-type diterpenoids derived from the resin “Ladano” of *Cistus creticus*. *Zeitschrift für Naturforsch C.* 2014; 56(1–2): 14–17.
54. Bouamama H, Noël T, Villard J, Benharref A, Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *J Ethnopharmacol.* 2006; 104(1–2): 104–107.
55. Güvenç A, Yıldız S, Özkan AM, Erdurak CS, Coşkun M, Yılmaz G, et al. Antimicrobial studies on Turkish *Cistus* species. *Pharm Biol.* 2005; 43(2): 178–183.
56. Szeremeta D, Knaś M, Długosz E, Krzykała K, Mrozek-Wilczkiewicz A, Musiol R, et al. Investigation of antibacterial and cytotoxic potential of phenolics derived from *Cistus incanus* L. by means of thin-layer chromatography–direct bioautography and cytotoxicity assay. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2018; 41(6): 349–357.
57. Hannig C, Spitzmüller B, Al-Ahmad A, Hannig M. Effects of *Cistus*-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the *in situ* pellicle. *J Dent.* 2008; 36(7): 540–545.
58. Hannig C, Sorg J, Spitzmu B, Hannig M, Al-Ahmad A. Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel *in situ*. *J Dent.* 2009; 37(7): 560–566.
59. Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Barrajón-Catalán E, Roldán-Segura C, Segura-Carretero A, Micol V. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55(5): 313–322.
60. Rebensburg S, Helfer M, Schneider M, Koppensteiner H, Eberle J, Schindler M, et al. Potent *in vitro* antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and filoviruses targets viral envelope proteins. *Sci Rep.* 2016; 6: 20394.
61. Droebner K, Ehrhardt C, Poetter A, Ludwig S, Planz O. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res.* 2007; 76(1): 1–10.
62. Ehrhardt C, Hrinčius ER, Korte V, Mazur I, Droebner K, Poetter A, et al. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti-influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.* 2007; 76(1): 38–47.
63. Kalus U, Grigorov A, Kadecki O, Jansen JP, Kiesewetter H, Radtke H. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res.* 2009; 84(3): 267–271.
64. Kalus U, Kiesewetter H, Radtke H. Effect of CYSTUS052 and green tea on subjective symptoms in patients with infection of the upper respiratory tract. *Phytoterapy Res.* 2010; 24(1): 96–100.
65. Demetzos C, Dimas KS. Labdane-type Diterpenes: Chemistry and Biological Activity. W: Atta-ur-Rahman, red. *Studies in Natural Products Chemistry: tom 25 (Bioactive Natural Products, część F)*. Amsterdam: Elsevier Science; 2001. s. 235–292.
66. Lendeckel U, Arndt M, Wolke C, Reinhold D, Kähne T, Ansoorge S. Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of *Cistus incanus* L. ssp. *incanus*. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(2): 221–227.
67. Skorić M, Todorović S, Gligorićević N, Janković R, Zivković S, Ristić M, et al. Cytotoxic activity of ethanol extracts of *in vitro* grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind Crops Prod.* 2012; 38(4): 153–159.
68. Demetzos C, Mitaku S, Couladis M, Kokkinopoulos D. Natural metabolites of *ent*-13-*epi*-manoyl oxide and other cytotoxic diterpenes from the resin “Ladano” of *Cistus creticus*. *Planta Med.* 1994; 60(6): 590–591.
69. Dimas K, Demetzos C, Marsellos M, Sotiariou R, Malamas M., Kokkinopoulos D. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines *in vitro*. *Planta Med.* 1998; 64(3): 208–211.
70. Demetzos C, Dimas K, Hatziantoniou S, Anastasaki T, Angelopoulos D. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and *cis*-clerodane type diterpenes. *Planta Med.* 2001; 67(7): 614–618.
71. Dimas K, Demetzos C, Vaos V, Ioannidis P, Trangas T. Labdane type diterpenes down-regulate the expression of *c-myc* protein, but not of *bcl-2*, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis. *Leuk Res.* 2001; 25(6): 449–454.
72. Dimas K, Hatziantoniou S, Tseleni S, Khan H, Georgopoulos A, Alevizopoulos K, et al. Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells *in vitro* and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. *Apoptosis* 2007; 12(4): 685–694.
73. Dimas K, Papadaki M, Tsimplouli C, Hatziantoniou S, Alevizopoulos K, Pantazis P, et al. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomed Pharmacother.* 2006; 60(3): 127–133.
74. Vitali F, Pennisi G, Attaguile G, Savoca F, Tita B. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Nat Prod Res.* 2011; 25(3): 188–202.
75. Attaguile G, Perticone G, Mania G, Savoca F, Pennisi G, Salomone S. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *J Ethnopharmacol.* 2004; 92(2–3): 245–250.
76. de Lira Mota KS, Dias GEN, Pinto MEF, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito ARM, Hiruma-Lima CA, et al. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 2009; 14(3): 979–1012.
77. Attaguile G, Caruso A, Pennisi G, Savoca F. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol Res.* 1995; 31(1): 29–32.
78. Kuchta A, Konopacka A, Waleron K, Viapiana A, Wesołowski M, Dąbkowski K, et al. The effect of *Cistus incanus* herbal tea supplementation on oxidative stress markers and lipid profile in healthy adults. *Cardiol J.* ew druk. doi: 10.5603/CJ.a2019.0028.