

Porównanie właściwości antyoksydacyjnych i cytoprotekcyjnych ekstraktów roślinnych z trzech odmian nasion czarnuszki

Comparison of antioxidant and cytoprotective properties of plant extracts from three varieties of nigella seeds

Daniel Przybyło, Agnieszka Mokrzyńska, Aleksandra Ziemlewska

Katedra Technologii Produktów Kosmetycznych i Farmaceutycznych, Wyższa Szkoła Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie, ul. mjr. Henryka Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów, e-mail: DanielPrzybylo@outlook.com

Słowa kluczowe: czarnuszka siewna, właściwości antyoksydacyjne, ekstrakty roślinne, fenole, flawonoidy, cytotoksyczność, keratynocyty

Keywords: *Nigella sativa*, antioxidant properties, plant extracts, phenols, flavonoids, cytotoxicity, keratinocytes

Streszczenie

Czarnuszka siewna (*Nigella sativa*) to roślina wykorzystywana w medycynie ludowej od wieków ze względu na swoje terapeutyczne właściwości. Czarnuszka jest obiektem wielu badań pod kątem walki z nowotworami, gdyż ma bardzo duży potencjał terapeutyczny w tym zakresie. Roślina ta posiada blisko spokrewnione gatunki z rodzaju *Nigella*, które mogą okazać się równie bogatym źródłem składników terapeutycznych co sama *N. sativa*. W pracy porównano gatunki *N. sativa*, *N. damascene* oraz *N. orientalis* pod względem właściwości antyoksydacyjnych z użyciem syntetycznego rodnika DPPH, a także ogólnej zawartości flawonoidów i związków fenolowych. Ponadto ekstrakty z nasion *N. sativa*, *N. damascena* i *N. orientalis* zbadano pod kątem cytotoksyczności wobec ludzkich komórek skóry – keratynocytów (HaCaT). W celu oceny stopnia żywotności komórek po ekspozycji na różne stężenia ekstraktów z badanych roślin wykonano test Alamar Blue. Najlepsze właściwości antyoksydacyjne wykazał 1% ekstrakt z nasion *N. orientalis*, natomiast biorąc pod uwagę wszystkie stężenia wykorzystane do badania, najbardziej obiecującymi właściwościami cechuje się *N. damascena*, która wykazała również najwyższe wartości w odniesieniu do ogólnej zawartości flawonoidów oraz związków fenolowych.

Summary

Black cumin (*Nigella sativa*) is a plant that has been used in folk medicine for centuries for its therapeutic properties. The object of much research in terms of fighting cancer, showing very high therapeutic potential in this regard. Black cumin has been the subject of much research in terms of fighting cancer, showing very high therapeutic potential in this

regard. The plant has closely related species in the *Nigella* genus, which may prove to be as rich a source of therapeutic ingredients as *N. sativa*. In this study, *N. sativa*, *N. damascene* and *N. orientalis* species were compared in terms of antioxidant properties by DPPH, total flavonoid content and phenolic compounds. In addition, *N. sativa*, *N. damascene* and *N. orientalis* seed extracts were tested for cytotoxicity against human keratinocyte skin cells (HaCaT). An Alamar Blue assay was used to assess the degree of cell viability after exposure to different concentrations of extracts from the tested plants. The significant antioxidant properties were demonstrated by 1% *N. orientalis* seed extract, while considering all concentrations used for the test, the most promising properties were found in *N. damascena*, which also showed the highest values for total flavonoids and phenolic compounds content.

Wstęp

Czarnuszka siewna (*Nigella sativa*) to jednoroczna, zielna roślina, występująca głównie w ciepłych krajach środkowej Europy, takich jak Rumunia, Bułgaria i Cypr, oraz w krajach Bliskiego Wschodu (Irak, Iran, Turcja) [1]. Osiąga wysokość od 20 do 30 cm. Kwiaty posiadają 5–10 płatków w kolorze żółtym, białym, różowym, jasnoniebieskim lub jasnofioletowym [2]. Jej nasiona cechują się bogatą zawartością składników odżywczych [3]. Charakteryzują się czarnym kolorem, są małe, o trójkątnym kształcie i gruzełkowatej powierzchni [4], płaskie z jednej strony i wypukłe z drugiej [1]. Zawierają witaminy, takie jak tokoferol i niacyna, związki mineralne, takie jak wapń, żelazo, potas i sód, błonnik pokarmowy, aminokwasy, monosacharydy (glukozę, ksylozę i arabinozę), węglowodany, kwasy tłuszczowe, szczególnie nienasycone (kwas oleinowy i linolenowy), a także olejek eteryczny, alkaloidy i saponiny [5–7]. Większość właściwości czarnuszki siewnej przypisuje się tymochininowi, który jest głównym składnikiem olejku eterycznego [1]. Szeroko znany i stosowany jest olej z nasion, który pozyskuje się metodą wytlaczania na zimno, gdyż wówczas uzyskuje się najwyższą obecność fenoli, tokoferolu oraz tymochinonu w porównaniu do metod z użyciem wyższych temperatur [8]. *N. sativa* posiada właściwości: antybakteryjne, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, [9] przeciwnowotworowe, [10, 11] hepatoprotekcyjne [12], moczopędne [13], regulacji ciśnienia krwi [14], przeciwbólowe [15], przeciwalergiczne [16], a także przeciwcukrzycowe [17]. Ponadto znajduje ona również zastosowanie w przemyśle kosmetycznym jako składnik preparatów do włosów [18], dezodorantów [19], szamponów, kremów i mydła [20].

Czarnuszka damasceńska (*Nigella damascena*), blisko spokrewniona z *N. sativa*, jednoroczna, zielna roślina występuje w strefie euro-śródziemnomorskiej, rośnie od Makaronezji po basen Morza Śródziemnego (z wykluczeniem Egiptu i Izraela) aż do Iranu. Potrafi osiągać wysokość od 15 do 45 cm. Znalazła miejsce wśród roślin ozdobnych ze względu na szczytowe, samotnie występujące kwiaty składające się z niebiesko-białych płatków otoczonych nitkowatymi liśćmi. W centrum znaj-

dują się wyprostowane pręciki. Nasiona mają trójkątny kształt i są pomarszczone. Ponadto aromatyczny charakter nasion sprawia, że są one używane w kuchni jako przyprawa, np. do sera bądź chleba [21, 22]. Wykazują one właściwości przeciwwirusowe (przeciw wirusowi HSV-1) [23], przeciwzapalne [24], przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne [22] i obiecującą właściwość przeciwpyschotyczną [25]. Ponadto wyizolowany z *N. damascena* β -elemene działa antybakteryjnie na bakterie *Mycobacterium tuberculosis* [26].

Czarnuszka orientalna (*Nigella orientalis*), tak jak wyżej wymienione gatunki, jest rośliną jednoroczną, zielną, a także cenioną rośliną ozdobną. Płatki kwiatów posiadają różne kolory, od zielonego, żółtego aż po czerwony, które tworzą wyjątkowe wzory, np. plamki przypominające oczy, rozproszone plamki czy paski [28]. Posiada właściwości przeciwbólowe, przeciwzapalne [27] i antyoksydacyjne [29].

Celem niniejszej pracy było porównanie ekstraktów roślinnych pozyskanych z gatunku *Nigella* (*Nigella sativa*, *Nigella damascena* i *Nigella orientalis*) pod kątem właściwości cytotoksycznych, zdolności do zmiatania wolnych rodników oraz ogólnej zawartości flawonoidów i związków flawonowych.

Materiał i metody badań

Metoda pozyskania ekstraktów

Nasiona czarnuszki siewnej (Ziółko, Łopiennik Górny, Polska) zostały kupione w sklepie zielarskim, natomiast nasiona czarnuszki damasceńskiej (Vilmorin, Plewiska, Polska) oraz czarnuszki orientalnej (Polan, Kraków, Polska) kupiono w sklepie ogrodniczym. W celu uzyskania ekstraktów wykorzystano 5 g uprzednio rozgniecionego w młynku surowca. Następnie dodano 95 ml ekstrahenta składającego się z wody i etanolu (96% v/v, Warchem, Zakręt, Polska) w proporcjach 50/50. Ekstrakcję przeprowadzano przez 3 godziny z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Otrzymane ekstrakty zostały dodatkowo poddane działaniu ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 45 min (częstotliwość ultradźwięków: 35 kHz; moc ultradźwięków: 170 W). Ekstrakty przefiltrowano trzykrotnie przez bibułę filtracyjną Whatmana nr 10. Finalnie każdy ekstrakt rozcieńczono 2-, 5-, 10-, 50- i 100-krotnie, uzyskując próbki w stężeniach 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1% oraz 0,05%.

Oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych metodą spektrofotometryczną z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu

Oznaczenie wykonano za pomocą metody Folina-Ciocalteu (F-C) przy użyciu spektrofotometru UV-Vis. Metoda ta oparta jest na reakcji barwnej, która występuje pomiędzy związkami fenolowymi a odczynnikiem F-C (Warchem, Zakręt,

Polska). Tworzący się w środowisku alkalicznym anion fenolowy redukuje powstały heteropolifosfowolfranian molibdenu do związku o kolorze niebieskim, ową zmianę barwy zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 740 nm. Jako ślepej próby użyto roztworu wodnego.

Do sporządzenia krzywej wzorcowej wykorzystano roztwór wodny oraz szereg rozcieńczeń kwasu galusowego.

Do obliczeń posłużyło równanie otrzymane dla krzywej wzorcowej. W każdej próbie dla każdego rozcieńczenia pomiar wykonano dwukrotnie.

Oznaczenie ogólnej zawartości flawonoidów

Oznaczenie wykonano za pomocą metody Christa-Müllera (C-M), przy użyciu spektrofotometru UV-Vis. Ogólną wartość flawonoidów określono przy użyciu azotanu glinu zgodnie z procedurą Woisky and Salatino [30]. Przygotowanie próbek do badań polegało na zmieszaniu 300 µl każdego z ekstraktów i 1200 µl mieszaniny reakcyjnej (80% C₂H₅OH, 10% Al(NO₃)₃ x 9 H₂O oraz 1M C₂H₃KO₂) (Warchem, Zakręt, Polska). Następnie próbki zostały poddane 40-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono przy długości fali równej 415 nm. Całkowitą zawartość flawonoidów w próbkach obliczono na podstawie krzywej wzorcowej roztworu kwercetyny (10–100 mg/dm³). Wyniki wyrażono jako ekwiwalent kwercetyny. Do obliczeń posłużyło równanie otrzymane dla krzywej wzorcowej, gdzie współczynnik determinacji wynosił 0,9981. W każdej próbie dla każdego rozcieńczenia pomiar wykonano dwukrotnie.

$$\text{Równanie: } y = 0,01x - 0,0109$$

gdzie:

y – absorbancja próbki,

x – stężenie kwercetyny.

Ocena zdolności antyoksydacyjnej przy użyciu metody redukcji rodnika DPPH

Do oceny zdolności zmiatania wolnych rodników przez ekstrakty wykorzystano zmodyfikowaną metodę Branda-Williamsa [31]. Przygotowanie próbek polegało na zmieszaniu 100 µl ekstraktu o stężeniach 0,1%, 0,5%, 1 % i 2,5%, a następnie dodano 100 µl 4mM roztworu DPPH (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). Absorbancję badanych próbek mierzono przy długości fali 540 nm, za pomocą czytnika mikropłytek Filtr Max 5 (ThermoScientific). Próbę kontrolną w badaniu stanowiło 100 µl DPPH z 100 µl wody destylowanej. Dla każdej z próbek pomiar został dokonany dwukrotnie.

Do obliczenia odsetka zmiatania wolnego rodnika DPPH posłużyło równanie:

$$\% \text{ zmiatania DPPH} = \frac{A_k - A_b}{A_k} \times 100$$

gdzie:

A_k – absorbancja próbki kontrolnej,

A_b – absorbancja próbki badanej.

Test cytotoksyczności. Procedura prowadzenia hodowli komórkowej

W badaniu mającym na celu ocenę cytotoksyczności badanych ekstraktów wykorzystano ludzkie keratynocyty (HaCaT) pozyskane z ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, 20108, USA). Komórki hodowano w medium hodowlanym DMEM suplementowanym L-glutaminą, 5% surowicą bydlęcą (FBS) oraz antybiotykami (100 µg/ml penicyliny i 1000 µg/ml streptomycyny, Gibco). Prowadzenie hodowli odbywało się w inkubatorze w temp. 37° i 5% stężeniu CO₂.

Badanie cytotoksyczności polegało na wysianiu komórek na płytkę 96-dołkową o stężeniu 10 000 komórek/dołek. Po czym komórki poddano ekspozycji na badane ekstrakty z czarnuszki siewnej, czarnuszki damasceńskiej i czarnuszki orientalnej w stężeniach 0,5%, 0,1%, 0,05%.

Test Alamar Blue

Przeprowadzony test cytotoksyczności Alamar Blue (AB) pozwolił na ocenę żywotności komórek w odpowiedzi na badane ekstrakty i ich stężenia. Test ten umożliwia określenie poziomu aktywności enzymów związanych z procesem oddychania w badanych komórkach. W pierwszej kolejności komórki HaCaT wysiano na płytkę 96-dołkową. Po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji komórki poddano ekspozycji na badane ekstrakty, a następnie inkubowano przez 24 godz. Na kolejnym etapie do każdego dołka dodano roztwór resazuryny o stężeniu 60 µM i ponownie inkubowano przez 2 godz. w temp. 37°C w ciemności. Po tym czasie dokonano pomiaru fluorescencji przy użyciu czytnika mikroplatek (FilterMax F5, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA) przy długości fali 570 nm. Dla każdej z roślin w każdym z trzech jej stężeń wykonano cztery osobne próby. Wynik przedstawiony został jako procent żywotności komórek HaCaT w porównaniu do kontroli, określonej jako 100% (komórek nietraktowanych ekstraktami).

Wyniki i dyskusja

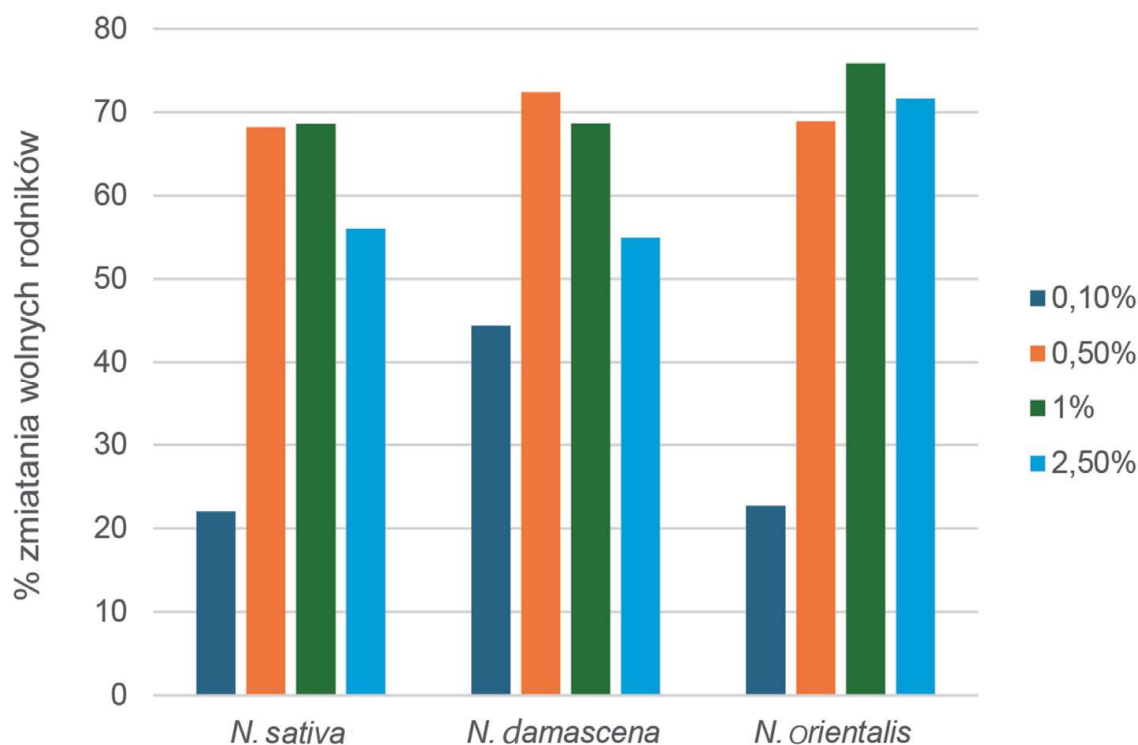
Bogatym źródłem związków polifenolowych, w tym flawonoidów, są ekstrakty roślinne, które posiadają silne właściwości antyoksydacyjne [32]. Dzięki temu znajdują zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, spożywczym oraz farmaceutycznym

i są używane jako suplementy diety [33]. Rośliny i ich przetwory (ekstrakty, oleje, olejki eteryczne) są podstawowym składnikiem kosmetyków od czasów pojawienia się ludzkości, przy czym same używane były również jako kosmetyki [34]. Obecnie w kosmetykach najczęściej stosowane są antyoksydanty syntetyczne ze względu na stosunkowo niskie koszty ich otrzymywania. Jednak coraz częściej stosowane są antyoksydanty naturalne, z których najpowszechniejszą grupę stanowią polifenole (flawonoidy, stylbeny), ponieważ dobrze rozpuszczają się w wodzie i etanolu. Rozpuszczalniki te są szeroko stosowane w sektorach przemysłowych. Producenci, mogąc wybrać między tymi dwoma rodzajami antyoksydantów, coraz chętniej skłaniają się ku antyoksydantom naturalnym, ponieważ w ostatnich latach stale rośnie upodobanie konsumentów do organicznych i naturalnych produktów, które potencjalnie wykazują mniej negatywnych efektów niż produkty syntetyczne [32]. Naturalne antyoksydanty mają zdolność do redukcji stresu antyoksydacyjnego w skórze, spowodowanego przede wszystkim promieniowaniem słonecznym, ale także chronią produkty przed utlenianiem [35]. Jednakże związki obecne w roślinach mogą wykazywać działanie cytotoksyczne na komórki ludzkie [36].

Ocena właściwości antyoksydacyjnych

Do oceny zdolności zmiatania wolnych rodników przez badane próbki wykorzystano metodę DPPH. Metanolowy roztwór DPPH cechuje się ciemnofioletowym zabarwieniem. Jeśli badany związek posiada właściwości antyoksydacyjne i zostanie poddany reakcji z roztworem DPPH, jego barwa zmienia się na żółtą, przy czym stopień zmiany barwy jest proporcjonalny do zawartości antyoksydantów w badanych próbkach. Otrzymane wyniki są zgodne z uzyskanymi przez innych badaczy [2, 22, 29], którzy również zaobserwowali właściwości antyoksydacyjne czarnuszki siewnej, czarnuszki damasceńskiej i czarnuszki orientalnej. Wyniki uzyskane w tym doświadczeniu pokazują, że największe właściwości antyoksydacyjne wykazuje 1% ekstrakt z nasion *N. orientalis*, niemniej jednak ten sam ekstrakt w stężeniu 0,1% osiągnął wartość najmniejszą ze wszystkich badanych próbek. Dla wszystkich analizowanych ekstraktów wartości w stężeniach 0,5% oraz 1% są bardzo zbliżone. Natomiast znaczące różnice obserwuje się w przypadku stężeń 0,1% oraz 2,5%, przy czym dla 0,1% stężenia najbardziej obiecujące właściwości posiada *N. damascena*, a dla stężenia 2,5% *N. orientalis*. Wyniki (Wykres 1) przedstawiają % zmiatania wolnych rodników obliczony po 20 min. Do doświadczenia użyto czytnika mikroplamki Filtr Max 5 (ThermoScientific). Badania przeprowadzone w celu porównania przy użyciu metody DPPH właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z nasion *N. damascena* oraz *N. sativa*

również wykazały większy potencjał zmiatania wolnych rodników przez ekstrakt otrzymany z *N. damascena* [37].



Wykres 1. Zdolność zmiatania wolnych rodników DPPH.

Figure 1. Free radical scavenging capacity of DPPH.

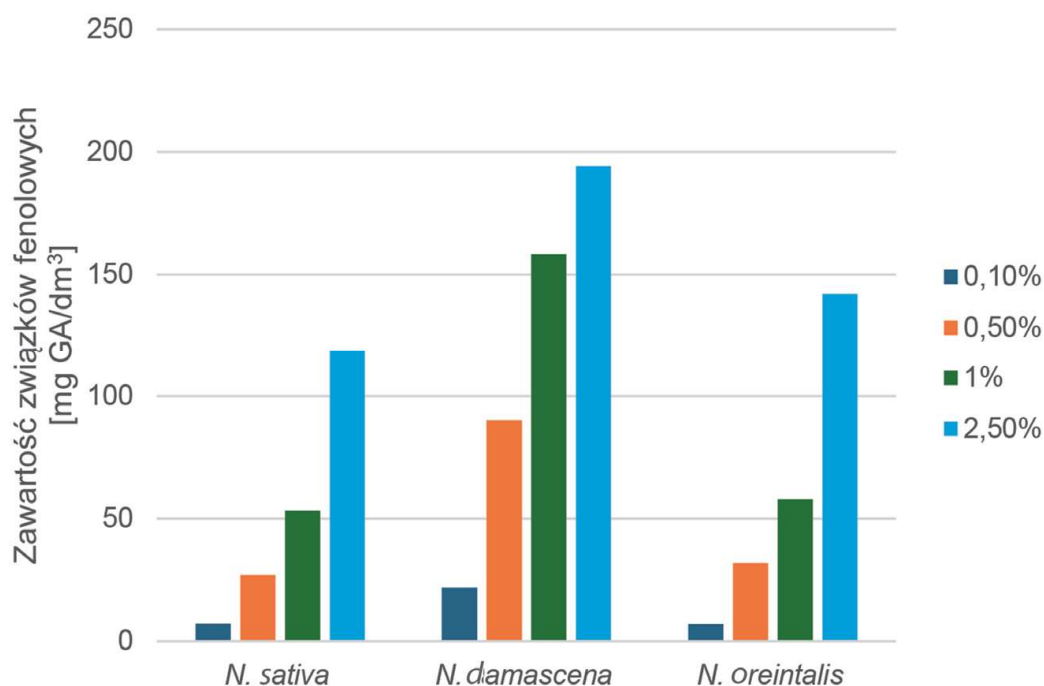
Źródło: badania własne.

Source: own research.

Oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych

Do oznaczenia wykorzystano metodę z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Wyniki zostały wyrażone w miligramach kwasu galusowego na dm³ ekstraktu. Zaobserwowano, że najwięcej związków fenolowych ogółem znajduje się w ekstrakcie *N. damascena* (Wykres 2).

Taka prawidłowość została stwierdzona również w innych doświadczeniach prowadzonych w celu porównania gatunków *N. sativa* oraz *N. damascena* [37], a także w przypadku porównania ekstraktu z nadziemnych części roślin *N. sativa*, *N. damascena*, *N. orientalis* oraz *N. hispanica*. *N. hispanica* wykazała największą zawartość związków fenolowych, natomiast biorąc pod uwagę tylko badane w niniejszej pracy gatunki, analogicznie do otrzymanych wyników (wykres 2) należy stwierdzić, iż *N. damascena* zawiera najwięcej związków fenolowych spośród gatunków *N. sativa* oraz *N. orientalis* [29].



Wykres 2. Zawartość związków fenolowych.

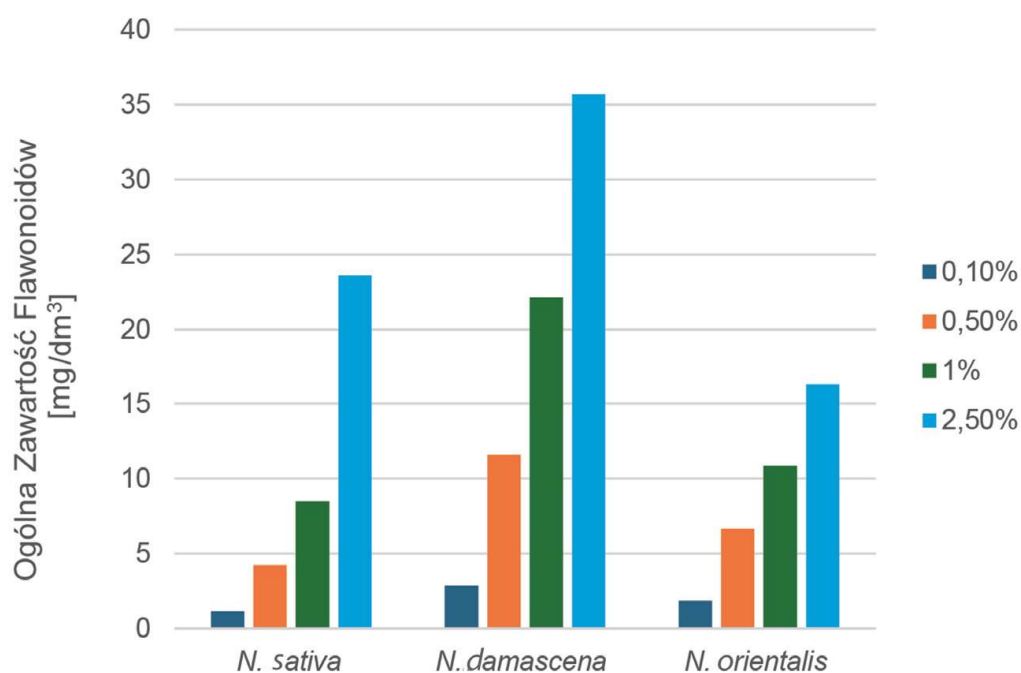
Figure 2. Phenolic compound content.

Źródło: badania własne.

Source: own research.

Oznaczenie ogólnej zawartości flawonoidów

Zawartość flawonoidów oznaczono za pomocą metody Christa-Müllera (C-M), a wartości zostały wyrażone w miligramach kwercetyny na 1 dm³ ekstraktu. Stwierdzono, że największą ilość flawonoidów, biorąc pod uwagę każde badane stężenie ekstraktu (0,1%; 0,5%; 1%; 2,5%), posiada gatunek *N. damascena*. Podobną zależność możemy zaobserwować w literaturze, która pokazuje przewagę *N. damascena* nad *N. sativa* pod względem zawartości flawonoidów [37]. Ponadto analiza wykazała, że ekstrakt z nasion *N. orientalis* w stężeniach 0,1%; 0,5% i 1% również wykazuje większą zawartość flawonoidów niż gatunek *N. sativa*.



Wykres 3. Zawartość flawonoidów.

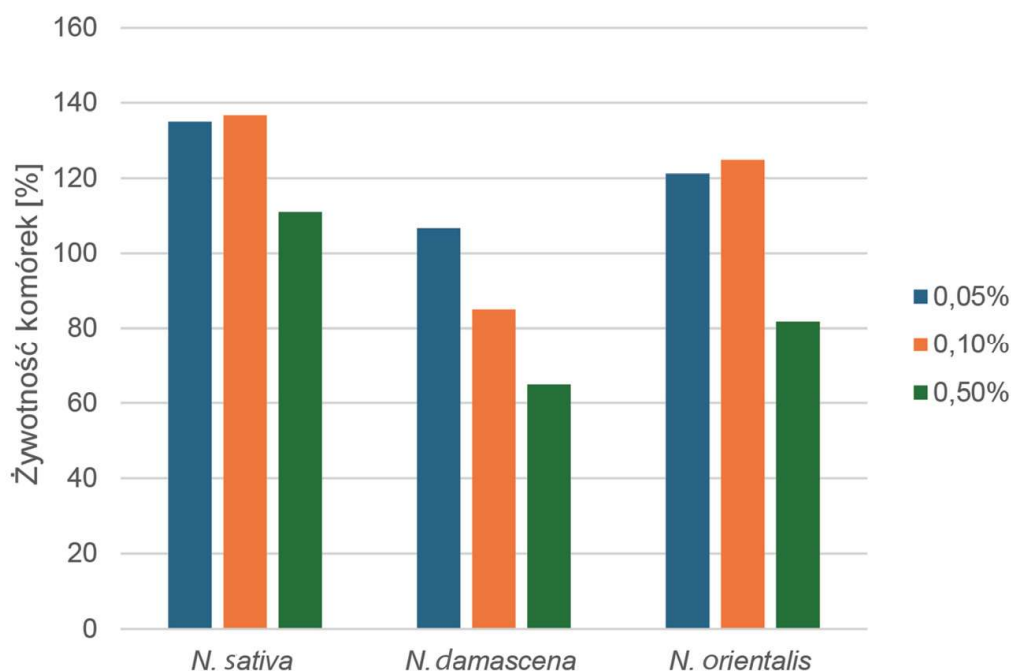
Figure 3. Flavonoid content.

Źródło: badania własne.

Source: own research.

Ocena cytotoksyczności

Do oceny cytotoksyczności wykorzystano linię komórkową ludzką keratynocytów (HaCaT) i poddano je ekspozycji na badane ekstrakty. W doświadczeniu posłużono się testem Alamar Blue, w którym rezazuryna o barwie niebieskiej jest redukowana do rezorufiny o barwie różowej. Taka zmiana barwy zachodzi dzięki aktywności metabolicznej komórek, którą jest oddychanie tlenowe, dzięki czemu wykorzystuje się ją jako wskaźnik żywotności komórek [38]. Uzyskane wyniki (Wykres 4) pokazują, iż 0,05% stężenie każdego z badanych gatunków nie wykazuje działania cytotoksycznego na komórki. Ekstrakty z nasion *N. damascena* w stężeniach 0,5% i 0,1% zadziałały toksycznie na komórki i doprowadziły do śmierci części z nich. Natomiast ekstrakt 0,5% oraz 0,1% z nasion gatunku *N. sativa* nie wykazał działania toksycznego na komórki HaCaT, tak samo jak 0,1% ekstrakt z nasion *N. orientalis*. Jak donosi literatura, etanolowy (95%) ekstrakt z nasion *N. sativa* wykazuje efekt antyproliferacyjny na ludzkie komórki (HaCaT) [39]. Ponadto inne badania mówią o nietoksycznym efekcie ekstraktów z nadziemnych części *N. damascena* [22]. Jednakże w literaturze nie ma doniesień dotyczących wpływu ekstraktów z nasion gatunków *N. damascena* i *N. orientalis* na linię komórkową keratynocytów.



Wykres 4. Cytotoksyczność.

Figure 4. Cytotoxicity.

Źródło: badania własne.

Source: own research.

Podsumowanie

Na podstawie analizy wyników z przeprowadzonych badań oraz przytoczonej literatury wyciągnięto następujące wnioski:

Największą zawartość związków fenolowych posiada ekstrakt z nasion *N. damascena*, a najmniejszą *N. sativa*. Największą zawartość flawonoidów posiada ekstrakt z nasion *N. damascena*, a najmniejszą ekstrakt *N. orientalis*. Najlepszą zdolność do zmiatania wolnych rodników przy ekstraktach powyżej 1% wykazuje *N. orientalis*, natomiast przy ekstraktach poniżej 1% najlepszą – *N. damascena*. Ekstrakty w stężeniu 0,05% nie wykazują cytotoksyczności komórkowej. Natomiast ekstrakty z nasion *N. damascena* w stężeniach 0,1% i 0,5% oraz *N. orientalis* w stężeniu 0,5% doprowadziły do śmierci części z komórek (HaCaT). Najbardziej toksyczne okazały się nasiona *N. damascena*, podczas gdy nasiona *N. sativa* w żadnym z badanych stężeń nie doprowadziły do śmierci komórek. W przypadku formułowania kosmetyków, w których stosowane są ekstrakty z nasion *N. damascena* oraz *N. orientalis*, należy zwrócić uwagę na stosowane stężenie, aby nie wywołać negatywnego wpływu na komórki skóry.

Literatura

- [1] Burdock G.A., Assessment of black cumin (*Nigella sativa* L.) as a food ingredient and putative therapeutic agent, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2022, 128, s. 105088.
- [2] Begum S., Abdul M., A review on *Nigella sativa*: a marvel herb, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2020, 10(2), s. 213–219.
- [3] Kaushik N., Aradhita B., A Study on Physicochemical Properties and Nutritional Profile of an Indigenous Cultivar-Black cumin (*Nigella sativa* L.), *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 2022, 7, s. 379–391.
- [4] Bashir O., Food applications of *Nigella sativa* seeds, [w:] *Black cumin (Nigella sativa) seeds: Chemistry, technology, functionality and applications*, (red.) M.F. Ramadan, Springer, Cham, 2021, s. 191–207.
- [5] Silva A.F.C., Parvez I.H., Pacheco R., Serralheiro M.L., Mechanism of action and the biological activities of *Nigella sativa* oil components, *Food Bioscience*, 2020, 38, s. 100783.
- [6] Mukhtar H., Raza S.A., Composition of *Nigella sativa* seeds, [w:] *Black cumin (Nigella sativa) seeds: chemistry, technology, functionality, and applications*, Springer, Cham 2021, s. 45–57.
- [7] Benazzouz-Smail L., Achat S., Brahmi F., Bachir-Bey M., Arab R., Lorenzo J.M., Benbouriche A., Boudiab K., Hauchard D., Boulekbache L., Biological Properties, Phenolic Profile, and Botanical Aspect of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. Seeds: A Comparative Study, *Molecules*, 2023, 28(2), s. 571.
- [8] Kıralan M., Changes in Volatile Compounds of Black Cumin (*Nigella Sativa* L.) Seed Oil During Thermal Oxidation, *International Journal of Food Properties*, 2014, 17(7), s. 1482–1489.
- [9] Bhavikatti S.K., Zainuddin S.L.A., Ramli R.B., Nadaf S.J., Dandge P.B., Khalate M., Karobari M.I., Insights into the antioxidant, anti-inflammatory and anti-microbial potential of *Nigella sativa* essential oil against oral pathogens, *Scientific Reports*, 2024, 14(1), s. 11878.
- [10] Çınar İ., Gıdık B., Dirican E., Determination of anti-cancer effects of *Nigella sativa* seed oil on MCF7 breast and AGS gastric cancer cells, *Molecular Biology Reports*, 2024, 51(1), s. 491.
- [11] Raad A.K., Javed A., Phytochemical analysis and Anticancer Potency of Black Cumin Oil (*Nigella sativa* Linn.) Against Osteosarcoma, *Journal of Angiotherapy*, 2024, 8(5), s. 1–6.
- [12] Khattak N., The hepatoprotective potential of *Nigella sativa* oil against cypermethrin-induced hepatotoxicity in rats: A histomorphological investigation, *Professional Medical Journal*, 2024, 31(8), s. 1140–1146.
- [13] El-Tantawy W., Temraz A., Mohamed S., Herbal Extracts Acting as Diuretics: A Comprehensive Review, *Egyptian Journal of Chemistry*, 2024, 67(3), s. 387–399. doi: 10.21608/ejchem.2024.254378.8972.

- [14] Moloud F., Yousofpour M., Moosazadeh M., Fatahian A., Determination of the effect of *Nigella sativa* on blood pressure; a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials, *Journal of Nephropathology*, 2024, 13(1), s. 2127–235.
- [15] Kumar S.L., Naik Z., Panwar A., M.S., Keluskar V., Kumar R.S., Comparative evaluation of the efficacy of *Nigella sativa* (75% v/v) cream and clobetasol propionate (0.05% w/w) gel in oral lichen planus-a double-blinded randomized control trial, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2024, 28(1), s. 225–234.
- [16] Bival Š.M., *Astragalus membranaceus*, *Nigella sativa*, and *Perilla frutescens* as Immunomodulators-Molecular Mechanisms and Clinical Effectiveness in Allergic Diseases, *Curr Issues Molecular Biology*, 2024, 46(8), s. 9016–9032.
- [17] AlSuhaymi N., Therapeutic Effects of *Nigella sativa* Oil and Whole Seeds on STZ-Induced Diabetic Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2024, 10, s. 5594090.
- [18] Meghamala G., Bonthagarala B., Yohan G., Formulation development and evaluation natural hair oil, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2024, 13(7), s. 1006–1016.
- [19] Rugayyah A., Ramadhani R., Santi E., Awaluddin N., Alydrus N.L., Formulation and Activity Test of Oil Spray Deodorant Preparations in Black Cumin Seeds (*Nigella Sativa* L.) Against *Staphylococcus Epidermidis* Causes Of Body Odor, *Jurnal EduHealth*, 2024, 15(1), s. 735–752.
- [20] Haque M., Singh R., *Nigella sativa*: A promise for industrial and agricultural economic growth, [w:] *Black seeds (Nigella sativa)*, Elsevier, 2022, s. 439–460.
- [21] Badalamenti N., Modica A., Bazan G., Marino P., Bruno M., The ethnobotany, phytochemistry, and biological properties of *Nigella damascena* – A review, *Phytochemistry*, 2022, 198, s. 113165.
- [22] Scognamiglio M., Maresca V., Basile A., Pacifico S., Fiorentino A., Bruno M., Badalamenti N., Kapelusz M., Marino P., Capasso L., Bontempo P., Bazan G., Charakterystyka fitochemiczna, właściwości antyoksydacyjne i antyproliferacyjne dzikich i uprawianych gatunków *Nigella damascena* zebranych na Sycylii (Włochy), *Antyoksydanty*, 2024, 13(4), 402, s. 1, 10.
- [23] Ogawa K., Nakamura S., Hosokawa K., Ishimaru H., Saito N., Ryu K., Fujimuro M., Nakashima S., Matsuda H., New diterpenes from *Nigella damascena* seeds and their antiviral activities against herpes simplex virus type-1, *Journal of Natural Medicines*, 2018, 72, s. 439–447.
- [24] Sieniawska E., Michel P., Mroczek T., Granica S., Skalicka-Woźniak K., *Nigella damascena* L. essential oil and its main constituents, damascenine and β -elemene modulate inflammatory response of human neutrophils *ex vivo*, *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 125, s. 161–169.
- [25] Bright Y., Maas D.A., Verheij M.M.M., Paladini M.S., Amatlajais-Groenen HIV, Molteni R., Riva M.A., Martens G.J.M., Homberg J.R., The Natural Protoalkaloid Methyl-2-Amino-3-Methoxybenzoate (MAM) Alleviates Positive as well as Cognitive Symptoms in Rat and Mouse Schizophrenia Models, *Current Neuropharmacology*, 2024, 22(2), s. 323–338.