

Gatunki z rodzaju *Arnica* – tradycyjne zastosowania i obecne kierunki badań biotechnologicznych

Małgorzata Jeziorek¹, Robert Księżopolski², Iwona Arabas², Agnieszka Pietrosiuk¹

¹Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska

²Pracownia Historii Nauk Przyrodniczych i Medycznych Instytutu Historii Nauki, Polska Akademia Nauk, Polska

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

Adres do korespondencji

Robert Księżopolski, Pracownia Historii Nauk
Przyrodniczych i Medycznych Instytutu Historii
Nauki, Polska Akademia Nauk, ul. Nowy Świat 72,
00-330 Warszawa, Polska;
e-mail: robertx@ihnpn.pl

Źródła finansowania

Nie wskazano źródeł finansowania.

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2023.12.21

Zaakceptowano: 2024.02.08

Opublikowano on-line: 2024.03.29

DOI

10.32383/farmpol/183832

ORCID

Małgorzata Jeziorek –  0000-0003-1638-5200

Robert Księżopolski –  0000-0001-7190-0354


Iwona Arabas –  0000-0002-1194-984X

Agnieszka Pietrosiuk –  0000-0001-7165-5336

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC 

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

Species of *Arnica* – traditional uses and current directions in biotechnological research

The medicinal use of mountain arnica (*Arnica montana* L.) has a long tradition in Europe and is currently confirmed by the documented biological activity of extracts from its flowers and helenalin isolated from them. The main groups of specialized metabolites found in *Arnicae flos* include sesquiterpene lactones, flavonoids and phenolic acids. The anti-inflammatory effect that justifies most of the uses of arnica is primarily due to helenalin derivatives, which are currently being studied, among others, in terms of anticancer activity and against selected parasitic protozoa causing tropical diseases. The development of new solutions for obtaining large amounts of arnica material for the pharmaceutical and cosmetics industries, as well as the search for an efficient source of helenalin derivatives, is therefore justified by its biological activity and the expanding range of possible medicinal applications. The high demand for plant raw materials combined with the prohibition on collecting arnica from natural sites, prompted this species' cultivation, the acquisition of plant material with comparable qualitative and quantitative characteristics from other species (primarily meadow arnica), as well as the use of biotechnological methods in plant *in vitro* cultures. The majority of publications in this field concern the development of effective micro-propagation of arnica for cultivation. Biotechnological procedures used to develop methods for obtaining helenalin derivatives from plant *in vitro* cultures benefit both natural science research and economic development, and this potential may also be covered by patent protection. In this study, we present the traditional uses of mountain arnica in Europe in the 20th century and summarize the current directions of research in the 21st century, with particular emphasis on the use of plant *in vitro* cultures. Aside historical documents, the cited works are related to obtaining valuable plant material from arnica based on selected review publications and original research works available in publication databases (PubMed, ScienceDirect). There are also other species belonging to

the Asteraceae family, commonly called „arnica”, mentioned in the regions of Brazil and Mexico (known as Brazilian arnica, Mexican arnica, and false arnica), which are the subject of research works on detailed phytochemical analysis and biological activity, including their anti-inflammatory effect.

Keywords: plant biotechnology, mountain arnica, Chamisso arnica, *Arnica montana*, *Arnica chamissonis*.

© Farm Pol, 2023, 79(12): 779–787

Wprowadzenie

Arnica montana L. jest gatunkiem rośliny leczniczej objętej na świecie coraz szerszą ochroną gatunkową, a jako źródło surowca farmaceutycznego jest coraz trudniej dostępna. Alternatywą dla rośliny tradycyjnie pozyskiwanej ze stanowisk naturalnych może być rozwój badań i technik hodowli *in vitro*, które współcześnie służą głównie celom naukowym oraz mikrorozmnażaniu. Dalszy rozwój tych technik może jednak w przyszłości pozwolić na hodowlę *in vitro* surowca roślinnego w sposób wydajny dla celów użytkowych.

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie przeglądu piśmiennictwa z zakresu kultur *in vitro* *Arnica* sp., ze szczególnym uwzględnieniem publikacji ostatniej dekady i przeglądem stosowanych technik z zakresu biotechnologii roślin oraz celów, dla których są prowadzone i wykorzystywane kultury *in vitro* arniki. Autorzy postanowili zwrócić również uwagę na teksty historyczne, dokumentujące tradycję zastosowań arniki górskiej w XIX i XX w., które przyczyniły się do konieczności rozwoju badań dotyczących analizy fitochemicznej oraz aktywności biologicznej surowców roślinnych. W tekście wskazano również gatunki nazywane potocznie „arniką” w regionach Ameryki Północnej i Południowej, które nie należą do rodzaju *Arnica*, a stanowią lokalne źródło stosowanych tradycyjnie leczniczych surowców roślinnych oraz są poddawane szczegółowym badaniom.

Przegląd źródeł historycznych i etnobotanicznych, poświęconych zastosowaniu *A. montana* w lecznictwie, konfrontuje tradycyjne zastosowania terapeutyczne tej rośliny w farmacji i medycynie z aktualnymi i potencjalnymi kierunkami rozwoju badań naukowych w tym zakresie. Poza dokumentami historycznymi, cytowane oryginalne prace badawcze oraz publikacje poglądowe zostały wybrane z dostępnych międzynarodowych baz publikacyjnych (PubMed, ScienceDirect). Zostały one w pierwszej

kolejności wyszukane w streszczeniowej bazie publikacji Scopus, a następnie wybrane w celu przedstawienia najczęściej występujących kierunków badawczych i różnicowanych technik biotechnologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem badań ostatniej dekady. Hasłami, które stanowiły kryteria ograniczające tematykę poszukiwań były: „arnica” oraz „*in vitro* culture”, „micropropagation”, „callus”, „suspension culture”, „hairy roots”, „transgenic roots”, „transformed roots”, a także „helenalin” oraz „biological activity”.

Występowanie oraz botaniczna charakterystyka *Arnica montana* L. i *Arnica chamissonis* Less.

Gatunki roślin z rodzaju *Arnica* należą do rodziny astrowatych (Asteraceae). *Arnica montana* L. – arnika górską (**rycina 1**), jest gatunkiem europejskim borealno-górskim, który obejmuje zwartym zasięgiem Europę Środkową i Zachodnią, południowo-wschodnią część Półwyspu Skandynawskiego oraz Alpy i Karpaty. Na wschodzie Europy występuje na Wyżynie Wołyńskiej [1]. *A. montana* jest byliną kwitnącą od maja do sierpnia. Roślina osiąga wysokość od 20 do 60 cm. Łodygę i liście ma owłosione. Liście przyziemne są całobrzegie, odwrotnie jajowate, zebrane w rozetkę. Natomiast liście łodygowe są siedzące, naprzeciwległe. Na łodydze rozwija się zwykle 1–5 koszyczków o kwiatach żółtopomarańczowych. Kwiaty środkowe są obupłciowe, rurkowate, brzeżne żeńskie, jęczyczkowate, podczas przekwitania zwisające. Owocem jest wydłużona niełupka opatrzona puchem kielichowym. *A. montana* jest gatunkiem coraz rzadszym w Polsce i innych krajach Europy, dlatego w naszym kraju jest objęta ścisłą ochroną gatunkową [1]. W „Polskiej Czerwonej Księdze Roślin” oraz „Czerwonej Księdze Karpat” [2], a także na „Czerwonej liście roślin” z 2016 r. [3] takson ten został zaliczony do grupy narażonych na wyginięcie (ang. vulnerable, VU). Na terenie polskich Karpat stanowiska tej rośliny odnotowuje się współcześnie jedynie w Bieszczadach Zachodnich [2].

Gatunkiem często wymienianym obok *A. montana*, pochodzącym z Ameryki Północnej, jest *Arnica chamissonis* Less. (arnika łąkowa, arnika Chamissa). Roślina ta swoim zasięgiem obejmuje większość obszaru Kanady, w tym Yukon, oraz Alaskę (plants.usda.gov) [4]. *A. chamissonis* jest wieloletnią rośliną o żółtych kwiatach, ujętych w koszyczki, i naprzeciwległych siedzących liściach. Dojrzała roślina dorasta do ponad 70 cm wysokości, aktywnie wzrasta wiosną i latem.

Tradycyjne zastosowania *Arnica montana* L. w europejskiej farmacji, medycynie i ziołolecznictwie ludowym XIX i XX w.

W piśmiennictwie XIX i XX w. poświęconym roślinom leczniczym, arnika górska jest wymieniana stosunkowo często, zarówno w publikacjach popularnych, jak i w doniesieniach naukowych z dziedzin medycyny i farmacji [5, 6]. Od czasów Linneusza nazywana jest *Arnica montana* L. (od arnos, po grecku jagnię na górach się pasące...); od nazw synonimicznych tej rośliny, określanej w języku polskim popularnie „arniką”, należały w przeszłości inne nazwy, w tym: pomornik górski, kupalnik lub kupalnik górski [6, 7]. Ta ostatnia nazwa była używana jeszcze w Farmakopei Polskiej III z roku 1954, w monografii surowca leczniczego otrzymanego z *Arnica montana* L., czyli *Flos Arnicae*, który został opisany w języku polskim jako kwiat kupalnika.

Zakres wskazań leczniczych dotyczący arniki, jak też części tej rośliny, które były w przeszłości wykorzystywane w recepturze farmaceutycznej do przygotowania preparatów leczniczych, znacząco różnią się od wykorzystywanych współcześnie w farmacji europejskiej. Współcześnie stosowany jest dla celów farmakopealnych niemal wyłącznie *Flos Arnicae*. Natomiast w przeszłości używano do celów leczniczych nie tylko kwiatów *Arnica montana* L., ale także soku z kwiatów, kwiatostanów, ziela, korzeni lub całych roślin. W XIX w. surowce te były wykorzystywane nie tylko w medycynie ludowej, ale również w medycynie i farmacji oficjalnej, a tradycja ich stosowania przetrwała w medycynie polskiej do połowy wieku XX. Świadczyć o tym może informacja zawarta w „Zarysie fitoterapii”, autorstwa dr. Wojciecha Roeske, wydanej przez PZWL w roku 1955, gdzie autor podaje jako typowe surowce z kupalnika (arniki): *Arnica Flos* i *Arnica Radix*, a jako typowe zastosowania *Arnica montana*: „*dermaticum i antirheumaticum*” [8, 9].

Arnika wymieniana jest w wielu publikacjach i źródłach o charakterze etnograficznym z różnych regionów współczesnej oraz przedwojennej Polski. Pisze o niej między innymi Adam Paluch w publikacji „Świat roślin w tradycyjnych praktykach leczniczych wsi polskiej” [10]. Autor potwierdza używanie przez mieszkańców polskiej wsi właściwie wszystkich wymienionych powyżej synonimów *Arnica montana* L., stosowanych w polskim piśmiennictwie medycznym, jako nazw ludowych arniki górskiej (arnika, kupalnik, pomornik) oraz wymienia także inną nazwę lokalną – arlika. Opisując stanowiska naturalnego występowania arniki, autor pisze: „Występowanie: łąki, poloniny,

widne lasy. U nas występuje w górach, rzadziej na niżu”. W opisie „Zastosowanie w lecznictwie” zawiera następujące informacje dotyczące używania arniki w medycynie ludowej: „najczęściej stosowana jest przy urazach ciała (41%): zranienia, zwichnięcia, stłuczenia. Wtedy to najczęściej stosuje się okłady z odwaru kwiatu arniki lub niekiedy nalewki spirytusowej robionej na korzeniu. Wewnętrznie odwar z suszonego kwiatu tej rośliny stosowany bywa przy katarze żołądka (20,6%). Kwiat stosuje się także przy zapaleniu oczu (10,5%) i chorobach zakaźnych (10,5%),(...)”.

O stosowaniu wewnętrznym preparatów arniki oraz jej podawaniu drogą doustną świadczą zarówno XIX-wieczne źródła medyczne, mówiące o próbach leczenia arniką zapaleń płuc [5], jak również doniesienia etnograficzne, z kręgu kultury ukraińskiej, mówiące o zastosowaniu tej rośliny w leczeniu gruźlicy u księcia Daniła Halickiego [11]. Historia skutecznego wyleczenia arniką księcia Daniła została m.in. przytoczona



Rycina 1. Kwitnąca *Arnica montana* L. – Czarnohora, Karpaty Wschodnie, Ukraina (fot. dr Yuriy Nesteruk, Lwów, Ukraina).

Figure 1. Flowering *Arnica montana* L., Chornohora, Eastern Carpathians, Ukraine (photo: dr Yuriy Nesteruk, Lviv, Ukraine).

przez znaną badaczkę medycyny ludowej Ukrainy – Zorianę Boltarowicz, w publikacji „Ukraińska narodna medicina”, w której podaje ona wiele innych nazw ludowych tej rośliny, funkcjonujących na terenie Ukrainy, w tym na terenie Karpat Wschodnich. Badaczka wymienia m.in. nazwę „skusiwnyk”, która była używana przez Huculów oraz może być traktowana jako językowy ślad zastosowania tej rośliny w medycynie ludowej tego regionu do leczenia „skusy”, czyli „konwulsji nerwowych u dzieci” [12]. Ciekawe, że podobne wskazanie „zastosowania wewnętrznego” arniki znajdujemy w poradniku dr. A. Simona z 1860 roku, zatytułowanym „Medycyna ludowa”, gdzie autor pisze: „Środki wewnętrzne. W kontuzji zwyczajnej kiedy urzędy organiczne zostają jakby zawieszonymi lub znacznie osłabionymi, trzeba podtrzymać siły, ożywić system nerwowy. Wtedy zapisują wewnątrz arnikę (...). W wstrząśnięciu mózgowym także to zapisujemy (...)” [13].

W popularnym „Zielniku lekarskim” dr. Augusta Czarnowskiego (pierwsze wydanie – Berlin 1905 r.) znajdujemy dość obszerny opis rośliny *Arnica montana* L. Jako podstawową, najczęściej stosowaną nazwę polską, autor podaje „Pomornik górski, czyli lekarski”. Wśród działań arniki, wymienia następujące efekty: „moczopędne i napotne, przyspiesza tętno i oddech, podnieca nerwy”. Dr A. Czarnowski, opisując części rośliny stosowane w lecznictwie, pisze: „UŻYTEK z soku kwiatów, korzenia, łodygi, liści i kwiatów, z nastoju spirytusowego (1 na 10). Wewnętrznie stosowany bywa nieczęsto, chyba przy wstrząśnięciach mózgowych, porażeniach, kurczach, małymi dawkami tylko z polecenia lekarza. Razem z syropem ślazu lekarskiego stosuje się przy zapaleniach opłucnej (...). Zewnętrznie używa się przy uderzeniach, stłuczeniach, zgnieceniach, zwichnięciach, na rany otwarte (słaby rozczyń), na gojące się (mocniejszy). W rozczyń (20–40 kropeł nastoju na litr wody) umaczać płatek, przykładając i odnawiać, gdy tylko wyschnie”. Autor cytuje również inne sposoby stosowania oraz rekomendacje lekarzy i farmaceutów dotyczące arniki, pisze m.in.: „Według dra Walsera („arnika” – przyp. autora artykułu) oddaje ważne usługi jako środek wysysający krwawiące obrzmienia, gdyż posiada własności odkażające i przeciwnie. [...] Kwiat ten zeszywa rany złotymi nitkami, bez ropienia”. [...] Według Kneippa na otwarte rany trzeba 20 kropeł nastoju na 1 litr wody; na zdrową skórę można używać podwójnej ilości” [14]. Bardzo obszerny opis sposobów stosowania, przypadków i okoliczności wykorzystania arniki górskiej zawierają niezwykle popularne na przełomie XIX i XX w. publikacje, cytowanego powyżej za dr. A. Czarnowskim, księdza Sebastiana Kneippa,

który w jednym z jego poczytniejszych poradników „Tak żyć potrzeba” wykorzystuje i opisuje wiele różnych postaci preparatów otrzymanych z arniki, które są przez niego zalecane przede wszystkim do stosowania zewnętrznego. We fragmencie poświęconym arnice, a zatytułowanym „Zranienie i zatrucie”, S. Kneipp pisze: “[...] Często rośnie w naszej okolicy, zwyczajnie na krańcu lasu, albo i w lesie, żółty kwiat o silnym zapachu, nazywa się Arniką (pomornik). Roślina ta zasługuje na pierwsze miejsce między lekami na zranienia, z tej rośliny robi się nalewka-tynkтура arnikowa [...]. Tynkturę arnikową uważam za pierwsze lekarstwo w zranieniu i polecam ją gorąco!” [15].

W klasycznej dla polskiej farmacji, fitoterapii i ziołolecznictwa naukowego publikacji, pod redakcją prof. Aleksandra Ożarowskiego „Ziołolecznictwo. Podręcznik dla lekarzy” (Warszawa 1980), znajdujemy syntetyczny opis zastosowań *Arnica montana* – arniki górskiej, a także następującą charakterystykę jej działań: „Zewnętrznie – antioedematicum, anticoagulans, doustnie – vasotonicum, cardiacum” oraz opis wskazań zewnętrznych i wewnętrznych arniki: „Zastosowanie. Zewnętrznie – na krwiaki, stłuczenia, obrzęki pourazowe, oparzenia 1 i 2 stopnia, wylewy podskórne, uszkodzenia naskórka, owrzodzenia troficzne i czyraki [...], w zapaleniu nerwu lub stawu, bólu barku, owrzodzeniu żyłkowym, ukłuciu owadów [...] i w bólach pooperacyjnych. Doustnie – w zaburzeniach wieńcowego i mózgowego krążenia krwi, w tzw. sercu starczym [...], w bolesnej parestezji, żyłakach odbytu [...] oraz w krwawieniach po porodzie [...]”. Jednocześnie sam autor przytacza w swojej książce objawy zatrucia arniką, we fragmencie opisu *Arnica montana*, zatytułowanym: „Działania uboczne. Po zastosowaniu miejscowym na otwarte rany może nastąpić podrażnienie, podwyższenie temperatury ciała, a nawet zropienie. Po podaniu doustnym zbyt dużych dawek organizm reaguje bólem głowy i brzucha, wymiotami, biegunką, osłabieniem pracy serca i oddechu, zwężeniem źrenic”. Objawy opisane przez prof. A. Ożarowskiego, traktuje się współcześnie jako objawy zatrucia arniką, mogące wystąpić w efekcie przedawkowania lub jako przejaw indywidualnej nadwrażliwości na substancje czynne zawarte w roślinie. Ryzyko przedawkowania i zatrucia doprowadziło w konsekwencji do znaczącego ograniczenia sposobów wewnętrznego stosowania preparatów z arniki w lecznictwie w latach 80. XX w. Współcześnie preparaty arniki (z wyjątkiem preparatów homeopatycznych), przeznaczone są przede wszystkim do stosowania zewnętrznego, w postaci maści lub żelów na nieuszkodzoną skórę [16].

Wymagania farmakopealne dla substancji roślinnej *Arnicae flos*

Obecnie, Farmakopea Europejska 10 (EurPh 10), a zatem również Farmakopea Polska XII (FP XII) podają w definicji monografii „Kwiatu arniki” (łac. *Arnicae flos*; ang. *Arnica flower*, fr. *Arnica (fleur d’)*) „wysuszone, całe lub częściowo rozpadnięte koszyczki *Arnica montana* L.” [17]. Określona jest konieczna zawartość sumy laktonów seskwiterpenowych, w przeliczeniu na tiglinian dihydrohelenaliny, jako nie mniejsza niż 0,40% (m/m) w wysuszonej substancji roślinnej. Kolejna monografia FP XII opisuje „Nalewkę z kwiatu arniki” (łac. *Arnicae tinctura*, ang. *Arnica tincture*, fr. *Arnica (teintur d’)*), przygotowaną z farmakopealnej substancji *Arnicae flos* i zawierającą nie mniej niż 0,04% laktonów seskwiterpenowych, w przeliczeniu na tiglinian dihydrohelenaliny. Farmakopea Europejska oraz Farmakopea Polska wskazują zatem tylko jeden gatunek rodzaju *Arnica* – arnikę górską, jako źródło substancji leczniczej [17].

Aktywność biologiczna ekstraktów z arniki, zwłaszcza helenaliny

Obszerne zestawienie aktualnych informacji dotyczących składu wyspecjalizowanych metabolitów *Arnicae flos* oraz udokumentowanej aktywności biologicznej tego surowca, prezentują m.in. prace przeglądowe Krauze-Baranowskiej i Kimel (2022) oraz Kriplani i wsp. (2017; 2020) [18–20]. Główne grupy wyspecjalizowanych metabolitów znajdujących się w *Arnicae flos* to: laktony seskwiterpenowe, flawonoidy i kwasy fenolowe. Na biologiczną aktywność ekstraktów z kwiatów i ziela arniki mogą mieć również wpływ pozostałe zidentyfikowane w nich związki – poliacetyleny, karotenoidy, pochodne kumaryny, fitosterole, irydoity, żywice, a także alkaloidy pirolizydynowe. Z kwiatów arniki otrzymuje się wieloskładnikowy olejek eteryczny, którego jednym ze składników jest tymol – związek z grupy terpenoidów. Za przeciwzapalne działanie, uzasadniające większość zastosowań arniki, odpowiadają przede wszystkim pochodne helenaliny, która należy do grupy laktonów seskwiterpenowych [20]. Jest ona klasyfikowana jako pseudoguaianolid, a jej efekty działania w komórkach polegają m.in. na zdolności hamowania aktywności enzymów i czynników transkrypcji poprzez ich alkilację [21]. Do udokumentowanych aktywności ekstraktów z arniki oraz pochodnych helenaliny należą m.in.: działanie przeciwozłonowe, przeciwrheumatyczne, przeciwbólowe i przeciwdrobnoustrojowe. Badania ekstraktów z arniki,

helenaliny oraz wybranych preparatów żelowych zawierających nalewkę arnikową prowadzono na modelach *in vitro*, *in vivo* oraz w kilku testach klinicznych [18–21]. Helenalina jest obecnie analizowana m.in. pod kątem działania przeciwozłonowego oraz przeciw wybranym pasożytniczym pierwotniakom (np. *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum*), wywołującym groźne tropikalne choroby. Ograniczenia w stosowaniu helenaliny związane są z jej toksycznością. Badania kolejnych pochodnych helenaliny skupiają się m.in. na poszukiwaniu związków o korzystniejszym profilu farmakologicznym [18, 19, 21].

Opracowanie nowych rozwiązań w pozyskiwaniu znacznych ilości arniki dla przemysłu farmaceutycznego oraz kosmetycznego, a także poszukiwanie wydajnego źródła otrzymywania pochodnych helenaliny jest więc uzasadnione udokumentowaną aktywnością biologiczną i poszerzającym się zakresem możliwych zastosowań leczniczych. Wysokie zapotrzebowanie na surowiec roślinny oraz zabroniony zbiór ze stanowisk naturalnych objętej ścisłą ochroną *A. montana*, przyczyniły się do optymalizacji upraw tego gatunku, pozyskiwania materiału roślinnego o porównywalnych cechach jakościowych i ilościowych z innych gatunków, przede wszystkim arniki łąkowej (*Arnica chamissonis* Less.), a także z zastosowania roślinnych kultur *in vitro* [22–26].

Kultury *in vitro* arniki górskiej

Arnika górską jest gatunkiem zagrożonym wyginięciem, objętym ścisłą ochroną gatunkową [27]. Przy ograniczonym z tego powodu dostępie do materiału roślinnego, techniki biotechnologiczne umożliwiają wydajne otrzymywanie organów i tkanek wyselekcjonowanych jakościowo, bez konieczności eksploatacji stanowisk naturalnych gatunku. Opisywane w piśmiennictwie naukowym hodowle *in vitro* w odniesieniu do arniki górskiej dotyczą przede wszystkim jej mikropropagacji. Otrzymane tą metodą rośliny *A. montana* stanowią wyselekcjonowany i jednorodny materiał wyjściowy do upraw polowych. Poza mnożeniem roślin, część prac badawczych opisuje uzyskanie tkanki kalusowej i kultur zawieszinowych, a także korzeni transformowanych *A. montana* w celu hodowli materiału roślinnego alternatywnego dla tego zbieranego z upraw. Zdolność wytwarzania helenaliny w hodowanych *in vitro* tkankach *A. montana* była od początku badań biotechnologicznych celem towarzyszącym wydajnej mikropropagacji roślin, stosowanych następnie do rozwijania upraw tego gatunku

[28]. Podsumowanie zabiegów biotechnologicznych prowadzonych wobec arniki górskiej opisuje zespół Petrovej i wsp. w pracy przeglądowej z 2012 r. [29]. Poniżej autorzy cytują wybrane wyróżniające się publikacje z ostatnich dekad ilustrujące najważniejsze kierunki z zakresu kultur *in vitro* organów i tkanek arniki.

Mikrorozmnażanie arniki górskiej

Opracowanie wydajnej metody masowego mnożenia *A. montana in vitro* pozwala na zastosowanie otrzymanych wyselekcjonowanych klonów roślin do produkcji materiału nasadzeniowego, przyczyniając się do rozwoju upraw i tym samym do ochrony gatunku w miejscach jego naturalnego występowania. Poza namnażaniem *in vitro* roślin do upraw polowych, przeznaczają się je również do wzbogacenia liczebności populacji na stanowiskach naturalnych zagrożonego wyginięciem gatunku oraz konserwacji zasobów cennego materiału roślinnego w formie spowolnionej kultury *in vitro*. Ostatni wspomniany cel należy do jednej z technik stosowanych w bankach genów gromadzących kolekcje danych genetycznych zwierząt i roślin wartościowych dla gospodarki i badań naukowych [26, 30, 31].

Petrova i wsp. w badaniach z 2014 r. porównywali trzy systemy hodowli *in vitro* w celu ustalenia najbardziej wydajnego mikrorozmnażania *A. montana*. Zastosowano podłoże z agarem, podłoże płynne i system tymczasowego zanurzenia (ang. temporary immersion system, TIS). We wszystkich doświadczeniach stosowano pożywkę MS (Murashige i Skoog, 1962) uzupełnioną regulatorami wzrostu (BA i IAA). Najwyższy współczynnik mnożenia (18,2 pędów/eksplantat przez 5 tygodni) uzyskano w hodowli TIS. Uzyskane pędy pomyślnie ukorzeniano *in vitro* i adaptowano *ex vitro*. Tak uzyskane rośliny wykazywały wyższą zawartość laktonów seskwiterpenowych niż rośliny pochodzące z pozostałych badanych systemów [30].

Badania roślin *A. montana in vitro* i *in vivo*, rozmnażanych z nasion pochodzenia niemieckiego, ukraińskiego oraz austriackiego i uprawianych na dwóch polach doświadczalnych prowadzili Todorova i wsp. (2016). Stwierdzono, że 2-letnie rośliny rozmnażane *in vitro*, w fazie pełnego kwitnienia akumulowały większą ilość laktonów seskwiterpenowych w porównaniu z roślinami 3-letnimi rozmnażanymi *in vivo*, będącymi w fazie tworzenia nasion. Pochodne helenaliny dominowały w roślinach 2-letnich rozmnażanych *in vivo* i 3-letnich rozmnażanych *in vitro*. Wyniki wykazały, że warunki środowiskowe na jednym z pól uprawnych również

wpłynęły na wyższą zawartość laktonów seskwiterpenowych [31].

Petrova i wsp. (2021) opublikowali wyniki badań dotyczących opracowanej metody namnażania pędów *A. montana*, ukorzenienia ich *in vitro* i uprawy *ex vitro*. Zaobserwowano prawidłowy wzrost i rozwój tak otrzymanych roślin, które zakwitły w drugim lub trzecim roku uprawy. Równocześnie opracowano podłoże, które pozwoliło na spowolniony rozwój pędów w kulturze *in vitro*, umożliwiając długoterminowe przechowywanie cennego materiału roślinnego – do 6 miesięcy bez pasażowania [26]. Autorzy w eksperymencie ocenili skuteczność różnych kombinacji regulatorów wzrostu roślin w klonowaniu pędów *A. montana*. Jako eksplantaty wyjściowe wykorzystano łodygi sadzonek. Spośród 12 zbadanych modyfikacji pożywek hodowlanych, optymalna pożywka (MS z dodatkiem BAP i IAA) pozwoliła docelowo na uzyskanie średnio $12,32 \pm 0,82$ pędów na jeden eksplantat początkowy. Ukorzenienie pędów *in vitro* było w 100% skuteczne na pożywce MS o zmniejszonej do połowy zawartości składników ($1/2$ MS) i suplementowanej IBA. Rośliny przenoszone *ex vitro* wykazały 90% przeżywalności i zostały następnie aklimatyzowane w dwóch górskich kolekcjach *ex situ*, gdzie zakwitły w drugim lub trzecim roku po wysadzeniu. Opracowany protokół przechowywania pędów *A. montana* w spowolnionej kulturze *in vitro* wskazał na najlepsze podłoże $1/2$ MS zawierające 3% sorbitolu i 2% sacharozy, które umożliwiło 6-miesięczny okres hodowli pomiędzy pasażami [26]. Tak opracowane protokoły hodowli *in vitro* mają znaczącą wartość dla komercyjnego rozmnażania oraz zrównoważonej ochrony zagrożonych roślin leczniczych.

Kultury kalusowe i zawiesinowe arniki górskiej

Kultury tkanki kalusowej zakładane są m.in. w celu indukowania regeneracji pędów z tej tkanki (pośrednia organogeneza), wydajnego ich namnażania, następnie aklimatyzacji i wprowadzenia uzyskanych klonów roślin do upraw polowych. Większość opublikowanych prac dotyczących arniki górskiej z etapem hodowli kalusowej dotyczy wydajnej mikropropagacji roślin, bardziej szczegółowo opisanej we wcześniejszym rozdziale. Innym celem prowadzenia hodowli kalusa *in vitro* jest wykorzystanie tej tkanki jako źródła wyspecjalizowanych metabolitów lub jako materiału wyjściowego do założenia kultury zawiesinowej, wytwarzającej pożądane związki aktywne. Uzyskane kultury zawiesinowe wyselekcjonowanych linii komórek posiadające

pożądane cechy dynamicznego wzrostu i wydajnego wytwarzania metabolitów wtórnych są inicjowane m.in. ze względu na stosunkowo dużą łatwość zwiększenia skali hodowli, nawet w bioreaktorach przemysłowych. Tylko nieliczne opublikowane prace dotyczą badań kultur zawieszonych arniki [24, 32].

Nieto-Trujillo i wsp. (2021) udowodnili, że hodowla zawieszona komórek arniki górskiej może być zrównoważonym źródłem materiału roślinnego wytwarzającego metabolity wtórne o aktywności biologicznej [24]. Zastosowany w hodowli pikloram (organiczny związek chemiczny, należący do herbicydów opartych na strukturze pirydyny) indukował tworzenie się kalusa z eksplantatów liściowych. W połączeniu z kinetyną, umożliwił założenie hodowli zawieszonych komórek wykazującej szybki przyrost biomasy i wytwarzającej kwasy fenolowe i flawonoidy oraz laktony seskwiterpenowe. Uzyskana kultura zawieszona komórek w 30 dniu hodowli miała najwyższą całkowitą zawartość metabolitów wtórnych. Trzy frakcje ekstraktu metanolewego uzyskanego z tkanki roślinnej *A. montana* wykazały zróżnicowaną zawartość wymienionych metabolitów wtórnych oraz aktywność cytotoksyczną wobec komórek chłoniaka, przeciwbakteryjną wobec *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, hamującą alfa-amylazę oraz przeciwutleniającą (wymiatanie wolnego rodnika DPPH). Tak uzyskana zawieszona komórek *A. montana* jest przykładem kultury roślinnej, wytwarzającej związki o aktywności biologicznej, otrzymanej bez konieczności eksploatacji naturalnych populacji arniki i stanowiącej alternatywę dla upraw polowych tego gatunku.

Kultury korzeni włośnikowatych arniki górskiej

Korzenie włośnikowate charakteryzują się często odmiennym metabolizmem w porównaniu z korzeniami niezmienionymi genetycznie, jak również dynamicznym przyrostem tkanki w czasie, co skutkuje znacznie większą wydajnością otrzymywania wyspecjalizowanych metabolitów w hodowli *in vitro*. Opublikowano wyniki kilku prac dotyczących tego typu hodowli dla arniki górskiej.

Weremczuk-Jeżyna i wsp. (2006) otrzymały metodą agroinfekcji genetycznie transformowane korzenie *A. montana*. Autorki przeprowadziły transformację liści czterotygodniowych roślin z zastosowaniem szczepu *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402. Po raz pierwszy wyizolowano z tak otrzymanych korzeni włośnikowatych *A. montana* pięć znanych pochodnych

wspomnianego wcześniej tymolu [33]. Następnie autorki szczegółowo porównały składniki olejków zawartych w korzeniach włośnikowatych oraz korzeniach dwuletnich roślin z uprawy polowej *A. montana* [34]. Korzenie włośnikowate otrzymano tą samą metodą agroinfekcji, opisaną w publikacji Weremczuk-Jeżyna i wsp. w 2006 r. [33]. Olejki, z wydajnością 0,6% i 0,4% suchej masy, uzyskano metodą hydrodestylacji, odpowiednio dla korzeni włośnikowatych i niezmienionych genetycznie. W obu przypadkach, w uzyskanych olejkach eterycznych zidentyfikowano pięćdziesiąt sześć związków, głównie pochodnych tymolu oraz węglowodorów seskwiterpenowych. Dwoma głównymi składnikami w obu olejkach były: izomaślan 10-izobutyryloksy-8,9-didehydrotymolu oraz eter metylowy 10-izobutyryloksy-8,9-didehydrotymolu.

Korzenie włośnikowate *A. montana* uzyskali również Petrova i wsp. (2013) [35]. W tym celu autorzy zastosowali metodę agroinfekcji szczepem *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Jako eksplantaty do transformacji stosowano liście *A. montana* L. Spośród trzech testowanych podłoży hodowlanych: MS (Murashige & Skoog, 1962), B5 (Gamborg, 1968) oraz SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), pożywka MS miała najkorzystniejszy wpływ na przyrost biomasy korzeni włośnikowatych. W 40-dniowej hodowli *in vitro* zaobserwowano ponad 7-krotnie większy przyrost świeżej masy korzeniowej wybranego klonu korzeni włośnikowatych (T4) w stosunku do korzeni nietransformowanych, regenerujących z hodowanych *in vitro* pędów. Tego typu kultury korzeni włośnikowatych stanowią doskonały system, który można wykorzystać do wydajnego wytwarzania wtórnych metabolitów syntezowanych w korzeniach arniki [35]. Warunkiem sukcesu jest jednak otrzymanie klonu korzeni wytwarzających pożądaną grupę związków. W kolejnym badaniu prowadzonym przez zespół Petrovej i wsp. analizowano wpływ źródeł węgla (sacharozy, maltozy i glukozy) w różnych stężeniach (1%, 3%, 5%, 7% i 9%) na przyrost biomasy i profil metabolitów wytwarzanych przez korzenie włośnikowate *A. montana*. Optymalne przyrosty biomasy korzeni zaobserwowano na pożywce MS zawierającej 3% lub 5% sacharozy. Analiza GC-MS ekstraktu z tkanki korzeniowej wykazała obecność ok. 60 związków należących do różnych klas metabolitów: flawonów, kwasów fenolowych, kwasów organicznych, kwasów tłuszczowych, aminokwasów, cukrów, alkoholi cukrowych, węglowodorów itp. Spośród zidentyfikowanych metabolitów, stężenie źródeł węgla w podłożu hodowlanym miało wpływ jedynie na zawartość cukrów i alkoholi cukrowych w tkance korzeniowej [36].

Inne badane gatunki rodzaju *Arnica* i tzw. „falszywe” arniki

Poza arniką górską, najczęściej opisywaną, porównywaną i również uprawianą dla przemysłu, jest pochodząca z Ameryki Północnej arnika łąkowa (arnika Chamissa – *Arnica chamissonis* Less.) [23, 37, 38]. Nieliczne prace badawcze dotyczące innych gatunków niż *A. montana* i *A. chamissonis* – jak np. *Arnica sachalinensis*, *Arnica mollis* i *Arnica anplexicaulis* – są także poświęcone zawartości metabolitów w materiale roślinnym [39, 40].

Wśród publikacji anglojęzycznych pojawiają się również takie, pochodzące głównie z rejonu Brazylii, które opisują cechy i zastosowania lecznicze gatunków nie należących do rodzaju *Arnica*, ale potocznie nazywanych na tych terenach arniką (ang. *arnica*, *false arnica*, *port. arnica-brasileira*, *arnica-da-serra*). Należą one do innych rodzajów z rodziny Asteraceae i są to m.in.: *Calea uniflora* Less., *Chaptalia nutans* (L.) Polák, *Lychnophora ericoides* Mart., *Lychnophora pinaster* Mart., *Lychnophora salicifolia* Mart., *Lychnophora passerina* (Mart. ex DC.) Gardner, *Lychnophora trichocarpa* Spreng., *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B.Jones, *Porophyllum ruderales* (Jacq.) Cass., *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) R.M.King & H.Rob., *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski i *Solidago chilensis* Meyen (syn. *Solidago microglossa*) [41–45]. Prace badawcze dotyczą szczegółowej analizy fitochemicznej i aktywności biologicznej tych gatunków, m.in. w aspekcie działania przeciwzapalnego [41, 42, 44]. W rejonie Meksyku również gatunek *Heterotheca inuloides* Cass. jest nazywany meksykańską arniką (ang. *mexican arnica*) [45].

Podsumowanie

Duże zapotrzebowanie na wysokowartościowy materiał roślinny pochodzący z arniki oraz pochodne helenaliny do zastosowań leczniczych i kosmetycznych powoduje rozwój wielokierunkowych badań. Stale doskonalone są uprawy *A. montana* oraz *A. chamissonis*. Arnika łąkowa (arnika Chamissa) jest coraz dokładniej badana i wskazywana jako alternatywne źródło materiału roślinnego wobec arniki górskiej [23, 25, 38]. Prace z zakresu biotechnologii roślin ukierunkowane są zarówno na wydajne otrzymywanie wybranych linii pędów arniki, dających uprawy roślin o wysokiej zawartości aktywnych biologicznie metabolitów, jak również na utrzymywanie hodowli *in vitro* arniki górskiej, jako zabezpieczenia cennego materiału genetycznego rośliny

zagrożonej wyginięciem [26, 30]. Zabiegi biotechnologiczne stosowane do opracowania metod otrzymywania pochodnych helenaliny z kultur *in vitro* arniki mają wartość poznawczą i zdolność publikacyjną, jak również znaczenie gospodarcze i jako wynalazki o potencjale aplikacyjnym mogą być obejmowane ochroną patentową [24, 28, 30, 46].

Podziękowania

Autorzy składają serdeczne podziękowania dla dr Yuriy Nesteruk (Lwów, Ukraina) za udostępnienie fotografii *Arnica montana* L.

Piśmiennictwo

- Zaluski T, Wołkowycki D, Gawęda-Kempczyńska D. *Arnica montana* L. Arnika górską. In: Kaźmierczakowa R, Zarzycki K, Mirek Z. Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Instytut Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk, Kraków; 2014. 525–527.
- Mirek Z, Piękoś-Mirkowa H. Czerwona Księga Karpat Polskich. Rośliny Naczyniowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera Polskiej Akademii Nauk, Kraków; 2008.
- Kaźmierczakowa R, Bloch-Orłowska J, Celka Z, et al. Polska czerwona lista paprotników i roślin kwiatowych. Instytut Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk, Kraków; 2016.
- United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. PLANTS Database. (online) 2023. Dostępny w internecie: <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=ARCH3>. Dostęp 21.01.2024.
- Bernstein J. Użyteczność środków pobudzających w zapaleniach u niektórych osobników. *Pamiętnik Towarzystwa Lekarskiego* 1841; 5: 12–13.
- Sygiercz E. Pomornik górny po staropolsku “Kupalnik” *Arnica montana* L. *Czasopismo Towarzystwa Aptekarskiego* 1878; 7: 47–48.
- Farmakopea Polska III. Warszawa; 1954.
- Wąsowicz-Dunin M. Notatki Farmakologiczne. *Czasopismo Towarzystwa Aptekarskiego* 1878; 5: 109–155.
- Roeske W. Zarys fitoterapii. Warszawa; 1955.
- Paluch A. Świat roślin w tradycyjnych praktykach leczniczych wsi polskiej. Wrocław; 1984.
- Żajvoronok V. Arnika. Znaki ukraińskiej etnokultury. *Słownik-dowidnik*. Kijów; 2006.
- Bołtarowicz Z. *Ukraińska narodna medicina*. Kijów; 1994.
- Simon AA. *Medycyna ludowa czyli treściwy pogląd na środki ochronne, poznawanie i leczenie chorób. Poradnik lekarski dla wszystkich stanów według najnowszych źródeł*. Warszawa; 1860.
- Czarnowski A. *Zielnik Lekarski*. Warszawa; 1939.
- Kneipp S. *Tak żyć potrzeba. Wskazówki i rady dla zdrowych i chorych*. Kempten; 1891.
- Ożarowski A. *Zioloolecznictwo. Podręcznik dla lekarzy*. Warszawa; 1980.
- Farmakopea Polska XII. Warszawa; 2020.
- Krauze-Baranowska M, Kimel K. *Arnica montana* and its medicinal value in the light of scientific research. *Farm Pol.* 2022; 78(9): 491–502. doi: 10.32383/farmpol/156952.
- Kriplani P, Guarve K, Baghael US. *Arnica montana* L. – a plant of healing: review. *J Pharm Pharmacol.* 2017; 69: 925–945. doi: 10.1111/jphp.12724.
- Kriplani P, Guarve K, Baghael US. Helenalin : An Anti-Inflammatory and Anti-Neoplastic Agent : A Review. *Current Bioactive Compounds* 2020; 16(8): 1134–1146. doi: 10.2174/1573407216666191226121004.
- Drogosz J, Janecka A. Helenalin – A Sesquiterpene Lactone with Multidirectional Activity. *Current Drug Targets* 2018; 20(4): 444–452. doi: 10.2174/1389450119666181012125230.
- Sugier D. Plon i skład chemiczny surowca arniki górskiej (*Arnica montana* L.) w zależności od sposobu zakładania plantacji i terminu zbioru koszyczków kwiatowych. *Agronomy Science* 2013; 68(3): 51–62. doi: 10.24326/as.2013.3.6.
- Sugier D, Sugier P, Kowalski R, et al. Foliar boron fertilization as factor affecting the essential oil content and yield of oil components from flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica*

- chamissonis* Less. cultivated for industry. *Ind Crops Prod.* 2017; 109: 587–597. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.014.
24. Nieto-Trujillo A, Cruz-Sosa F, Luria-Pérez R, et al. *Arnica montana* cell culture establishment, and assessment of its cytotoxic, antibacterial, α -amylase inhibitor, and antioxidant *in vitro* bio-activities. *Plants* 2021; 10(11): 1–21. doi: 10.3390/plants10112300.
25. Olesińska K, Sugier D, Kaczmarski Z. Yield and chemical composition of raw material from meadow arnica (*Arnica chamissonis* Less.) depending on soil conditions and nitrogen fertilization. *Agriculture* 2021; 11(9): 1–17. doi: 10.3390/agriculture11090810.
26. Petrova M, Zayova E, Geneva M, et al. Multiplication and conservation of threatened medicinal plant *Arnica montana* L. by *in vitro* techniques. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 2021; 86(1): 57–65. Dostępny w internecie: <https://hrcak.srce.hr/file/370585>. Dostęp 21.01.2024.
27. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin. Dziennik Ustaw Rzeczpospolitej Polskiej. (online) 2014; Dostępny w internecie: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20140001409/O/D20141409.pdf> Dostęp 21.01.2024.
28. Malarz J, Stojakowska A, Dohnal B, Kisiel W. Helenalin acetate in *in vitro* propagated plants of *Arnica montana*. *Planta Med.* 1993; 59(1): 51–53. doi: 10.1055/s-2006-959603.
29. Petrova M, Zayova E, Vassilevska-Ivanova R, Vlahova M. Biotechnological approaches for cultivation and enhancement of secondary metabolites in *Arnica montana* L. *Acta Physiol Plant.* 2012; 34: 1597–1606. doi: 10.1007/s11738-012-0987-x.
30. Petrova M, Zayova E, Todorova M, Stanilova M. Enhancement of *Arnica montana in-vitro* shoot multiplication and sesquiterpene lactones production using temporary immersion system. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research* 2014; 5(12): 5170–5176. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(12).5170-76.
31. Todorova M, Trendafilova A, Vitkova A, et al. Developmental and environmental effects on sesquiterpene lactones in cultivated *Arnica montana* L. *Chem Biodivers.* 2016; 13(8): 976–981. doi: 10.1002/cbdv.201500307.
32. Stefanache C, Danila D, Necula R, et al. *In vivo* and *in vitro* phytochemical studies of *Arnica montana* species from Romanian Eastern Carpathians. *Acta Horticulturae* 2012; 955: 143–148. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.955.19.
33. Weremczuk-Jeżyna I, Kisiel W, Wysokińska H. Thymol derivatives from hairy roots of *Arnica montana*. *Plant Cell Rep.* 2006; 25: 993–996. doi: 10.1007/s00299-006-0157-y.
34. Weremczuk-Jeżyna I, Wysokińska H, Kalembe D. Constituents of the essential oil from hairy roots and plant roots of *Arnica montana* L. *Journal of Essential Oil Research* 2011; 23(1): 91–97. doi: 10.1080/10412905.2011.9700432.
35. Petrova M, Zayova E, Vlahova M. Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Cent Eur J Biol.* 2013; 8(5): 470–479. doi: 10.2478/s11535-013-0157-6.
36. Petrova M, Zayova E, Dincheva I, et al. Influence of carbon sources on growth and GC-MS based metabolite profiling of *Arnica montana* L. Hairy roots. *Turkish J Biol.* 2015; 39: 469–478. doi: 10.3906/biy-1412-37.
37. Kowalski R, Sugier D, Sugier P, Kołodziej B. Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry. *Ind Crops Prod.* 2015; 76: 857–865. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.029.
38. Kimel K, Krauze-Baranowska M, Godlewska S, Pobłocka-Olech L. HPLC-DAD-ESI/MS comparison of the chemical composition of flowers from two *Arnica* species grown in Poland. *Herba Polonica* 2020; 66(2): 1–10. doi: 10.2478/hepo-2020-0008.
39. Merfort I, Paßreiter CM, Willuhn G. Flavonoid glycosides from *Arnica amplexicaulis* and *Arnica mollis*. *Biochem Syst Ecol.* 1995; 23(6): 681–682. doi: 10.1016/0305-1978(95)00057-7.
40. Passreiter CM, Weber H, Bläser D, Boese R. Stereochemistry and oxidative degradation of a dimeric thymol derivative from *Arnica sachalinensis*. *Tetrahedron* 2002; 58(2): 279–282. doi: 10.1016/S0040-4020(01)01139-5.
41. Capelari-Oliveira P, Paula CA, Rezende SA, et al. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “arnica”). *J Ethnopharmacol.* 2011; 135(2): 393–398. doi: 10.1016/j.jep.2011.03.034.
42. Ferrari FC, Ferreira LC, Souza MR, et al. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpa* Spreng. (Brazilian Arnica). *Phytother Res.* 2013; 27(3): 384–389. doi: 10.1002/ptr.4736.
43. Athayde AE de, Richetti E, Wolff J, et al. “Arnicas” from Brazil: comparative analysis among ten species. *Rev Bras Farmacogn.* 2019; 29(4): 401–424. doi: 10.1016/j.bjp.2019.02.006.
44. Vogas RS, Pereira MTM, Duarte LS, et al. Evaluation of the anti-inflammatory potential of *Solidago microglossa* (Arnica-brasileira) *in vivo* and its effects on PPAR γ activity. *An Acad Bras Cienc.* 2020; 92(2): 1–16. doi: 10.1590/0001-3765202020191201.
45. Vargas-León EA, Soto-Islas M, Díaz-Batalla L, et al. *In vitro* screening of Mexican arnica (*Heterothea inuloides* Cass.) inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme as a hypotensive mechanism. *J Herb Med.* 2022; 33: 100563. doi: 10.1016/j.hermed.2022.100563.
46. Kromer K, Gamian A. Sposób pozyskiwania helenaliny i dihydrohelenaliny oraz estrów tych substancji z kultur *in vitro* *Arnica* - PL 237 808 B1. PL 237 808 B1; (online) 2017. Dostępny w internecie: <https://api-ewyszukiwarka.pue.uprp.gov.pl/api/collection/9a6b-f929dccc7d32afcabeef78b4131d6>. Dostęp 21.01.2024.